

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg**

**Lehrstuhl Virologie**

**Vorstand: Professor Dr. med. A. Rethwilm**

## **AZT-Resistenz bei Foamyviren**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Benedikt Kretzschmar**

**aus München**

**Würzburg, März 2008**

Referent: Prof. Dr. A. Rethwilm

Koreferent: Prof. Dr. H. Klinker

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2008

Der Promovend ist Arzt

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Retroviren</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Generelle Eigenschaften .....	1
1.1.2	Aufbau des retroviralen Partikels.....	2
1.1.3	Genom .....	3
1.1.4	Genexpression und virale Proteine.....	5
1.1.4.1	Gag.....	5
1.1.4.2	Pol.....	5
1.1.4.3	Env.....	6
1.1.4.4	Regulatorische und akzessorische Proteine .....	7
1.1.5	Replikationszyklus .....	8
<b>1.2</b>	<b>Foamyviren</b> .....	<b>11</b>
1.2.1	Generelle Eigenschaften .....	11
1.2.2	Aufbau des foamyviralen Partikels .....	15
1.2.3	Genom .....	15
1.2.4	Genexpression und virale Proteine.....	18
1.2.4.1	Gag.....	18
1.2.4.2	Pol.....	19
1.2.4.3	Env.....	20
1.2.4.4	Tas .....	21
1.2.4.5	Bet.....	21
1.2.4.6	Env-Bet.....	22
1.2.5	Replikationszyklus .....	22
1.2.6	Medizinische Bedeutung von Foamyviren .....	25
1.2.6.1	Foamyviren als apathogene Retroviren .....	25
1.2.6.2	Übertragung von Foamyviren auf den Menschen .....	26
1.2.6.3	Einsatz von foamyviralen Vektoren in der Gentherapie.....	27
<b>1.3</b>	<b>Antiretrovirale Substanzen</b> .....	<b>28</b>

1.3.1	Möglichkeiten und Grenzen der Inhibition von Retroviren.....	28
1.3.1.1	Angriffspunkte von antiretroviralen Substanzen.....	28
1.3.1.2	Resistenzentwicklung .....	30
1.3.2	Zidovudin (AZT).....	30
1.3.2.1	Eigenschaften und Einsatz bei HIV-Infektion .....	30
1.3.2.2	AZT-Resistenz-Mutationen bei HIV-1 .....	32
1.3.2.3	Mechanismen der AZT-Resistenz bei HIV.....	34
1.3.2.4	Wirksamkeit von AZT bei Foamyviren.....	34
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>36</b>
2.1.1	Verbrauchsmaterial .....	36
2.1.2	Chemikalien .....	36
2.1.3	Enzyme und Reaktionspuffer.....	36
2.1.4	Kits .....	37
2.1.5	Antibiotika und Virustatika .....	37
2.1.6	Antikörper .....	38
2.1.7	Bakterienstämme .....	38
2.1.8	Virus .....	38
2.1.9	Zelllinien.....	38
2.1.10	Plasmide.....	39
2.1.11	Oligonukleotide.....	39
2.1.12	Größenmarker .....	44
2.1.13	Puffer und Lösungen .....	44
2.1.13.1	Bakterienkultur .....	44
2.1.13.2	Analyse und Klonierung von DNA .....	45
2.1.13.3	Zellkultur und Zellbiologie .....	47
2.1.13.4	Proteinbiochemie.....	49
2.1.13.5	Standardlösungen und Puffer .....	51
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>52</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	52

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.1.1	Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i> .....	52
2.2.1.2	Transformation von DNA in kompetente <i>E. coli</i> .....	52
2.2.1.3	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	54
2.2.1.4	Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen .....	55
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	56
2.2.1.6	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	56
2.2.1.7	Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	56
2.2.1.8	Hybridisierung von Oligonukleotiden .....	57
2.2.1.9	Restriktionsverdau von DNA .....	57
2.2.1.10	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten .....	58
2.2.1.11	Ligation von DNA-Fragmenten .....	59
2.2.1.12	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	59
2.2.1.13	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	61
2.2.1.14	Sequenzierung von DNA .....	61
2.2.1.15	Zielgerichtete Mutagenese .....	62
2.2.2	Zellbiologische und virologische Methoden .....	64
2.2.2.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien .....	64
2.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	64
2.2.2.3	Vermehrung von Viren in Zellkultur .....	65
2.2.2.4	Zellzahlbestimmung und Aussäen von Zellen .....	65
2.2.2.5	Transfektion und Induktion .....	65
2.2.2.6	Ernte von Viruspartikeln .....	68
2.2.2.7	<i>lacZ</i> -Färbung .....	68
2.2.2.8	Virustitration .....	69
2.2.2.9	AZT-Resistenz-Test mit Transfektionsversuchen .....	69
2.2.2.10	Herstellung von Zelllysaten .....	70
2.2.2.11	Viruspartikelpräparation .....	71
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	71
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	71
2.2.3.2	Western Blot .....	72
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>75</b>
3.1	Untersuchung eines AZT-resistenten SFVmac .....	75

3.1.1	Genotypische Analyse von SFVmac <sub>AZTres</sub> .....	75
3.1.1.1	Selektion von SFVmac <sub>AZTres</sub> in Zellkultur .....	75
3.1.1.2	DNA-Sequenzierung des <i>gag</i> - und <i>pol</i> -Gens von SFVmac <sub>AZTres</sub> .....	76
3.1.1.3	Auswirkungen der Mutationen in SFVmac <sub>AZTres</sub> auf Aminosäureebene 77	
3.1.1.4	Abgleich der Sequenz von SFVmac <sub>AZTres</sub> mit veröffentlichten Genbank-Sequenzen von SFVmac .....	78
3.1.1.5	Vergleich der SFVmac- und SFVmac <sub>AZTres</sub> -Sequenzen mit Genbank- Sequenzen anderer Foamyviren .....	78
3.1.1.6	Vergleich von SFVmac und HIV bezüglich AZT-Resistenz-Mutationen 81	
3.1.2	Klonierung von AZT-Resistenz-Mutationen in pSFV-1 .....	82
3.1.2.1	PCR-Amplifikation von AZT-Resistenz-Mutationen enthaltenden Fragmenten aus SFVmac <sub>AZTres</sub> und Klonierung in pSFV-1 .....	82
3.1.2.2	Klonierung der AZT-Resistenz-Mutationen einzeln und in Kombinationen in pSFV-1 durch zielgerichtete Mutagenese .....	85
3.1.3	Vergleich von biologisch selektiertem SFVmac <sub>AZTres</sub> mit klonierten Derivaten .....	88
3.1.4	Optimierung eines Testsystems für AZT-Resistenz.....	91
3.1.5	Überprüfung der Proteinexpression der proviralen SFVmac-Konstrukte	97
3.1.6	AZT-Resistenz der mutierten proviralen SFVmac-Konstrukte .....	102
<b>3.2</b>	<b>Versuche zur Gewinnung eines AZT-resistenten PFV .....</b>	<b>108</b>
3.2.1	Einfügen möglicher AZT-Resistenz-Mutationen in pczHSRV2 .....	108
3.2.2	AZT-Resistenz der mutierten proviralen PFV-Konstrukte.....	112
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>115</b>
<b>4.1</b>	<b>Das AZT-resistente Foamyvirus SFVmac<sub>AZTres</sub> .....</b>	<b>115</b>
4.1.1	Vier Aminosäuresubstitutionen in Pol als Ursache der AZT-Resistenz von SFVmac <sub>AZTres</sub> .....	115
4.1.2	Auswirkung der vier einzelnen Aminosäureaustausche im Pol-Protein von SFVmac <sub>AZTres</sub> auf die virale Fitness in Abwesenheit und in Anwesenheit von AZT .....	119
4.1.2.1	K211I .....	119

4.1.2.2	I224T.....	121
4.1.2.3	S345T.....	124
4.1.2.4	E350K.....	126
4.1.3	Mögliche Reihenfolge des Auftretens der Mutationen in SFVmac <sub>AZTres</sub>	128
<b>4.2</b>	<b>Keine AZT-Resistenz bei PFV.....</b>	<b>132</b>
<b>4.3</b>	<b>AZT-Resistenz und Reverse Transkriptase bei Foamyviren und HIV..</b>	<b>134</b>
4.3.1	Pyrophosphorylyse in Anwesenheit von ATP bei HIV-1, HIV-1 mit TAMs, HIV-2, PFV, SFVmac und SFVmac <sub>AZTres</sub> .....	134
4.3.2	AZT-Resistenz bei anderen Foamyviren als SFVmac und PFV .....	138
4.3.3	Offene Fragen und Ausblick.....	138
<b>4.4</b>	<b>Zeitpunkt der Reversen Transkription bei Foamyviren .....</b>	<b>142</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>182</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	182
7.2	Tabellenverzeichnis .....	185
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	186

# 1 Einleitung

## 1.1 Retroviren

### 1.1.1 Generelle Eigenschaften

Die Familie der *Retroviridae* oder Retroviren umfasst eine Gruppe von viralen Erregern, die sich durch Besonderheiten in Genom, Struktur und Replikationszyklus auszeichnen. Sie rufen bei Mensch und Tier teilweise schwerwiegende Krankheiten hervor, besonders Immunschwächen und Tumorerkrankungen (Vogt 1997a; Modrow et al. 2003).

Namensgebend für die Retroviren ist eine Besonderheit in ihrem Replikationszyklus, in dem das Genom mittels des Enzyms Reverse Transkriptase von RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben wird und danach durch die Integrase als sogenanntes Provirus in das Wirtsgenom eingebracht wird. Die Entdeckung der reversen Transkription (Baltimore 1970; Temin et Mizutani 1970) widerlegte seinerzeit die damals vorherrschende Ansicht, dass der Informationsfluss stets von DNA zu RNA und niemals umgekehrt stattfindet. Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA in Plusstrangorientierung und ist je nach Virustyp etwa 7-13 kb lang. Es zeigt einen charakteristischen Aufbau und kodiert bei allen infektiösen Retroviren für die Produkte Gag, Pol und Env, das sind gruppenspezifische Antigene, enzymatische Aktivitäten sowie mit der Hüllmembran assoziierte Glykoproteine. Werden weitere regulatorische und akzessorische Proteine kodiert, spricht man von komplexen, andernfalls von einfachen Retroviren (Vogt 1997b).

Den *Retroviridae* werden insgesamt sieben Genera zugerechnet, die sich auf die zwei Subfamilien der *Orthoretrovirinae* und *Spumaretrovirinae* aufteilen (Tabelle 1). Dabei bilden die Lentiviren sowie die Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilonretroviren die Subfamilie der Orthoretroviren, während das Genus der Spumaviren oder Foamyviren (FV) als einziges der Subfamilie der Spumaretroviren zugeteilt wird (Modrow et al. 2003; Büchen-Osmond 2006).

Humanmedizinische Bedeutung erlangten die Retroviren durch die Entdeckung der humanen T-Zell-Leukämie-Viren (Poiesz et al. 1980) und besonders der humanen Immundefizienzviren HIV-1 (Barre-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1983) und HIV-2 (Clavel et al. 1986). Die Infektion mit HIV mündet in der tödlichen

Immunschwächekrankheit AIDS (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*). Im Jahr 2006 lag die Gesamtzahl der HIV-Infizierten bei 39,5 Millionen; 4,3 Millionen infizierten sich neu mit HIV und 2,9 Millionen starben an AIDS (UNAIDS/WHO 2006). In Deutschland stieg die Zahl der neu Infizierten auf über 2600 (Robert-Koch-Institut 2007).

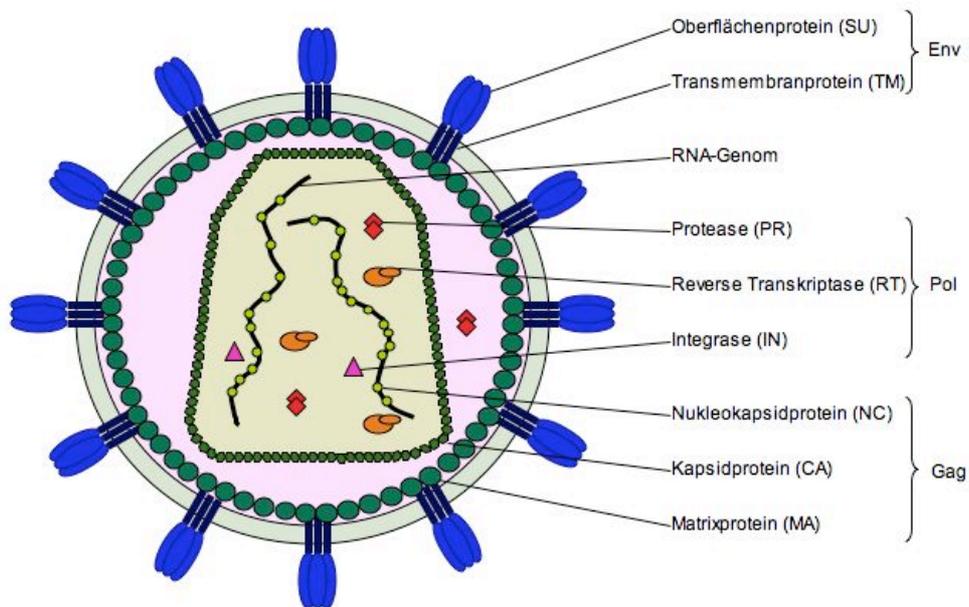
Unterfamilie	Genus	Prominente Vertreter	Genom	Morphologie
Orthoretroviren	Alpharetroviren	Aviäre Leukoseviren (ALV) Rous-Sarkomvirus (RSV)	einfach	Kapsid sphärisch, zentral Typ C
	Betaretroviren	Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	einfach	Kapsid zylindrisch Typ D
		Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV)	komplex	Kapsid sphärisch, exzentrisch Typ B
	Gammaretroviren	Mausleukämieviren (MLV)	einfach	Kapsid sphärisch, zentral Typ C
	Deltaretroviren	Humane T-Zell-Leukämieviren (HTLV-1, HTLV-2) Bovines Leukosevirus (BLV)	komplex	Kapsid sphärisch, zentral
	Epsilonretroviren	Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus (WDSV)	komplex	Kapsid sphärisch, zentral Typ C
Lentiviren		Humane Immundefizienzviren (HIV-1, HIV-2) Simiane Immundefizienzviren (SIV) Felines Immundefizienzvirus (FIV) Virus der infektiösen Anämie der Pferde (EIAV)	komplex	Kapsid konusförmig
Spumaretroviren	Spumaviren (Foamyviren)	Prototypisches Foamyvirus (PFV) <i>siehe auch Tabelle 3</i>	komplex	Kapsid sphärisch, zentral

**Tabelle 1: Klassifizierung der Retroviren nach ICTV**

### 1.1.2 Aufbau des retroviralen Partikels

Bei Retroviren handelt es sich um sphärische Partikel mit einem Durchmesser von etwa 80 bis 130 nm. Äußere Begrenzung bildet eine Hüllmembran, die sich von der Zytoplasmamembran der virusproduzierenden Zelle ableitet und mit der virale Glykoproteine, die durch *env* kodiert werden, assoziiert sind. Das transmembrane Protein (TM) ist dabei über eine Region von hydrophoben Aminosäuren in der Membran verankert, während das externe Glykoprotein (SU, engl. *surface* = Oberfläche) nicht kovalent mit dem äußeren Teil des TM verbunden ist und als

Trimer vorliegt (*Abbildung 1*). Mit der Innenseite der Membran sind bei den Orthoretroviren die durch *gag* kodierten Matrixproteine (MA) über aminoternale Myristinsäurereste verbunden. Im Inneren des Partikels liegt das Viruskapsid, das je nach Virustyp eine sphärisch-ikosaedrische oder konische Form aufweist (*Tabelle 1*) und aus den ebenfalls durch *gag* kodierten Kapsidproteinen (CA) aufgebaut ist. Innerhalb des Kapsides befindet sich das Genom, das bei den Orthoretroviren in Form zweier Moleküle von einzelsträngiger plusstrangorientierter RNA vorliegt, und das an die gleichfalls durch *gag* kodierten Nukleokapsidproteine (NC) komplexiert ist. Weiterhin befinden sich im Partikel die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) sowie gegebenenfalls akzessorische Proteine (Vogt 1997b).



*Abbildung 1: Aufbau eines Retrovirus*

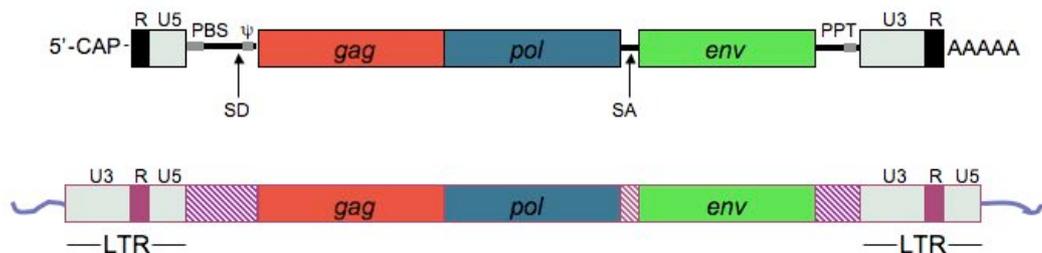
### 1.1.3 Genom

Das Genom der Orthoretroviren (*Abbildung 2*) liegt in den viralen Partikeln als Einzelstrang-RNA in Plusstrangorientierung vor und besitzt mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung die Charakteristika einer mRNA. Die RNA liegt dabei im Virion diploid vor und umfasst 7-13 kb, bei HIV z. B. etwa 9200 Basen. An die 18 Nukleotide umfassende sogenannte Primer-Bindungsstelle (PBS) im 5'-Bereich des Genoms ist jeweils eine zelluläre tRNA hybridisiert. Die kodierenden Regionen

beinhalten die Leseraster für die kanonischen Produkte Gag, Pol und Env sowie bei den komplexen Retroviren für weitere regulatorische und akzessorische Proteine (Vogt 1997b).

An beiden Enden des Genoms befinden sich außerhalb des kodierenden Bereichs wichtige Kontrollsequenzen für die Regulation des viralen Replikationszyklus. Diese umfassen im 5'-Bereich (5'UTR) auf die Cap-Struktur folgend die R-Region (15-240 bp), die U5-Region (75-240 bp), die Primer-Bindungsstelle (18 bp) sowie die Leader-Region, in der sich zumeist eine Spleißdonorstelle (SD) sowie eine als  $\psi$  bezeichnete Sequenz befinden. Letztere spielt dabei während der Morphogenese eine wichtige Rolle für die Verpackung der RNA in die viralen Partikel. Am 3'-Ende befinden sich, bei manchen Vertretern mit dem kodierenden Bereich überlappend, an regulatorisch wichtigen Elementen ein Polypurintrakt (PPT), d. h. eine Abfolge von mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten, sowie die U3-Region (150-1200 bp), die R-Region und die etwa 200 Adenosinreste umfassende PolyA-Einheit. Die R-Region weist dabei im 5'- und im 3'-Bereich dieselbe Sequenz auf und liegt in gleicher Orientierung vor.

Im Verlauf des Replikationszyklus der Retroviren liegt das Genom auch als doppelsträngige DNA integriert in das Wirtsgenom vor und wird dann als Provirus bezeichnet. Dieses weist sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende eine identische und in gleicher Orientierung vorliegende Sequenzfolge auf, die im Verlauf der reversen Transkription generiert wird. Diese Sequenzfolge besteht aus den Regionen U3, R sowie U5 und wird als LTR (engl. *long terminal repeat*) bezeichnet. Im LTR befindet sich der retrovirale Promotor, unter dessen Kontrolle die Transkription der viralen RNAs stattfindet (Vogt 1997b).



**Abbildung 2: Genom eines einfachen Retrovirus**

*Oben:* genomische RNA mit 5'-Cap-Gruppe und 3'-Polyadenylierung. *PBS:* Primerbindungsstelle;  $\psi$  (*psi*): Verpackungssignal; *SD:* Spleißdonor; *SA:* Spleißakzeptor; *PPT:* Polypurintrakt. *Unten:* integriertes Provirus (DNA). *LTR:* long terminal repeat.

## 1.1.4 Genexpression und virale Proteine

### 1.1.4.1 Gag

Gag kodiert für die gruppenspezifischen Antigene, die bei den Orthoretroviren Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine sowie bei einigen Orthoretroviren zusätzlich Linkproteine umfassen. Diese Proteine werden an freien Ribosomen im Zytoplasma als gemeinsames Vorläuferprodukt (bei HIV 55 kDa) synthetisiert, das im Verlauf der Morphogenese des Virus proteolytisch in die einzelnen Bestandteile gespalten wird (Swanstrom et Wills 1997).

Im aminoterminalen Bereich von Gag befindet sich die Sequenz des Matrixproteins (MA, bei HIV-1 17 kDa), das kotranslational an einem Glycin in Position 2 myristyliert wird. Es ist im reifen Virion an der Innenseite der Hüllmembran zu finden und spielt in der Morphogenese der Partikel eine essentielle Rolle. In der Aminosäuresequenz folgt das Kapsidprotein (CA, bei HIV-1 24 kDa) sowie karboxyterminal das Nukleokapsidprotein (NC, bei HIV-1 7 kDa). Das Nukleokapsidprotein beinhaltet ein CCHC-Motiv, das einem Zinkfinger ähnelt und der Interaktion mit der genomischen RNA dient (Vogt 1997b).

### 1.1.4.2 Pol

Das *pol*-Gen beinhaltet die Informationen für die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) sowie im 5'-Bereich häufig auch die Protease (PR). Bei einigen Retroviren gibt es jedoch für die Protease auch ein eigenes Leseraster (*pro*) oder sie liegt im *gag*-Leseraster (Swanstrom et Wills 1997; Vogt 1997b). Die in *pol* kodierten Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet, im Falle der Orthoretroviren als Gag-Pol-Fusionsprotein, das bei HIV ein Molekulargewicht von 160 kDa hat. Dabei überlappen sich bei den Lentiviren und

Alpharetroviren die Gene für *gag* und *pol*, liegen jedoch in unterschiedlichen Leserastern. Somit kommt es nur zu einer Produktion des Gag-Pol-Vorläuferproteins, wenn sich das Leseraster um -1 verschiebt. Dies geschieht etwa in 5% der Fälle, so dass letztlich ein Verhältnis von Gag-Pol-Fusionsprotein zu Gag-Protein von 1:20 zu Stande kommt. Bei den Beta- und Deltaretroviren liegt *pro* in einem eigenen Leserahmen vor, so dass es insgesamt zu zwei Leserasterwechseln kommt, nämlich zwischen Gag und Protease einerseits und zwischen Protease und Pol andererseits. Bei den Gamma- und Epsilonretroviren schließlich liegen *gag* und *pol* im selben Leserahmen, sind jedoch durch ein Stopcodon getrennt, welches in einem von 20 Fällen unterdrückt wird (Rabson et Graves 1997; Vogt 1997b).

Die Protease ist als Dimer aktiv und besteht bei HIV-1 aus 99 Aminosäuren. Sie besitzt im aktiven Zentrum zwei wichtige Asparaginsäuren und prozessiert im Verlauf der Morphogenese die Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine in ihre einzelnen Bestandteile (Swanstrom et Wills 1997).

Die Reverse Transkriptase ist für die Umschreibung des einzelsträngigen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA verantwortlich. Hierzu besitzt sie sowohl RNA- als auch DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität und zusätzlich getrennt davon eine RNase-H-Aktivität, die den RNA-Anteil von DNA-RNA-Hybriddoppelsträngen abbaut. Bei HIV-1 liegt die RT als Heterodimer vor, wobei die zwei Proteineinheiten ein Molekulargewicht von 66 und 51 kDa besitzen. Die kleinere der beiden Einheiten hat dabei dieselbe Aminosäuresequenz wie der aminoternale Bereich der großen, da sie durch Abspaltung des karboxyterminalen Teils derselben entsteht. Die RT besitzt keine Kontrolllesefunktion und hat eine Fehlerrate von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  (Telesnitsky et Goff 1997).

Die Integrase (bei HIV-1 38 kDa) schließt den *pol*-Leserahmen ab und ist für die Integration des durch die RT synthetisierten doppelsträngigen DNA-Genoms als Provirus in die DNA des Wirtsgenoms verantwortlich. Hierfür besitzt sie die Aktivitäten einer Endonuklease und einer Ligase (Brown 1997).

### 1.1.4.3 Env

Im *env*-Gen sind die Informationen für die viralen Glykoproteine verschlüsselt, die im reifen Virion in die Hülle eingelagert sind (engl. *envelope* = Hülle). Es handelt sich

um ein Oberflächenprotein (SU, bei HIV-1 120 kDa) sowie ein Transmembranprotein (TM, bei HIV-1 41 kDa), die als gemeinsames Vorläuferprotein (bei HIV-1 160 kDa) von einer einfach gespleißten mRNA translatiert werden (Swanstrom et Wills 1997). Im reifen Virion ist das transmembrane Glykoprotein über eine etwa 20 Aminosäuren umfassende hydrophobe Sequenz in der Hüllmembran verankert und mit dem vollständig auf der Außenseite der Membran liegenden Oberflächenprotein assoziiert. Das stark glykosierte externe Protein vermittelt die Adsorption der Viruspartikel an zelluläre Rezeptoren auf der zu infizierenden Zelle, während TM eine Rolle bei der Fusion von Virus- und Zellmembran spielt (Hunter 1997).

#### **1.1.4.4 Regulatorische und akzessorische Proteine**

Komplexe Retroviren besitzen zusätzlich zu den in *gag*, *pol* und *env* kodierten Proteinen noch weitere Proteine mit z. B. regulatorischer Funktion. Diese werden meist im 3'-Bereich des Genoms in sich überlappenden Leserastern kodiert und z. T. von mehrfach gespleißten RNAs translatiert (Vogt 1997b).

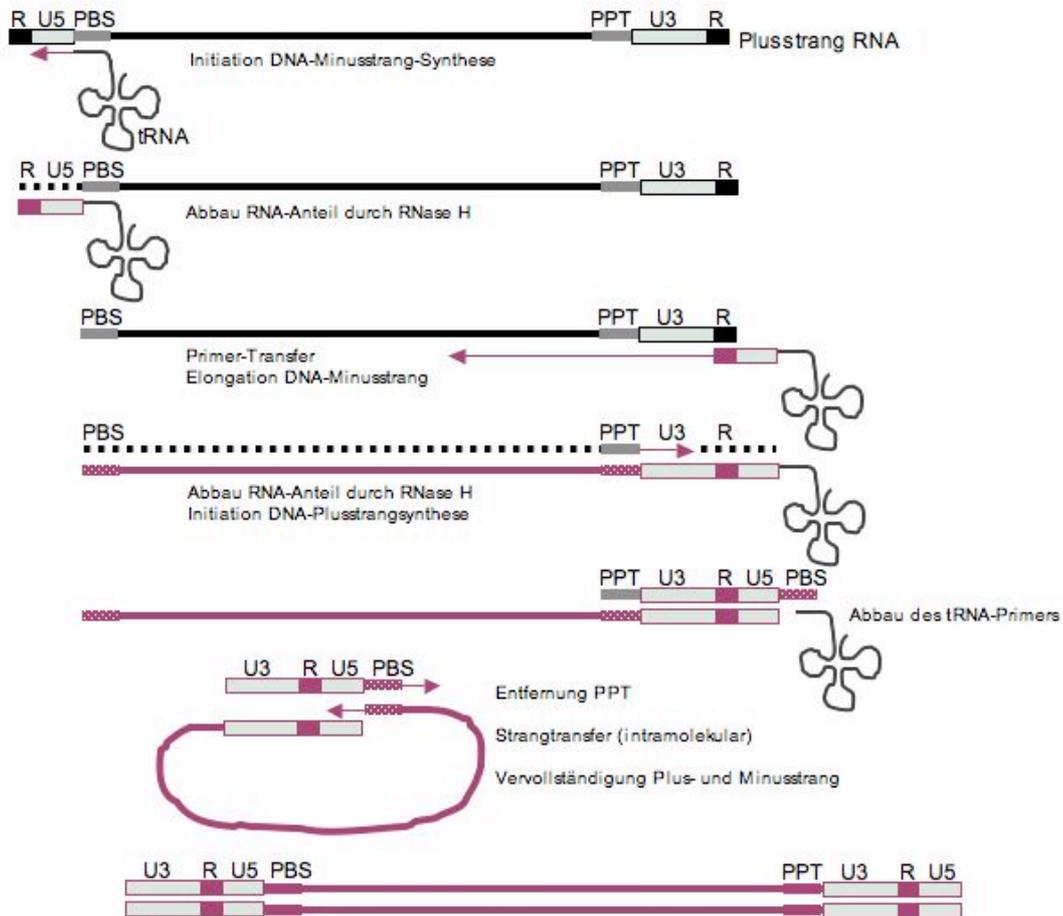
HIV-1 besitzt beispielsweise die zusätzlichen Proteine Tat, Rev, Vif, Nef, Vpr und Vpu. Tat (engl. *transactivator of transcription*) wird in den Kern der infizierten Zelle transportiert und entfaltet dort eine transaktivierende Wirkung, welche die Elongation initiiertes Transkripts vom LTR-Promotor erheblich verstärkt, während es sich bei Rev (engl. *regulator of expression of virion proteins*) um einen posttranskriptionell wirkenden Transaktivator handelt. Nef stellt einen Pathogenesefaktor mit multiplen Funktionen dar, Vpr dient dem Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern und Vpu führt zu einer vermehrten Freisetzung von Viruspartikeln und zu einer Erniedrigung der CD4-Lymphozyten (Cullen 1998; Geyer et al. 2001; McCune 2001). Bei Vif handelt es sich dagegen um ein Protein, das in der virusproduzierenden Zelle den Einbau von Mitgliedern der APOBEC3-Familie in das Virion verhindert, indem es diese komplexiert und dem proteasomalen Abbau zuführt. APOBEC3 dient dem Wirt als natürlicher Abwehrmechanismus gegen retrovirale Elemente, indem es in der Zielzelle bei der reversen Transkription des viralen Genoms Cytosin zu Uracil desaminiert (Cullen 2006).

### 1.1.5 Replikationszyklus

Am Beginn des retroviralen Replikationszyklus (*Abbildung 4*) steht die Kontaktaufnahme von SU in der Hüllmembran des Virus mit einem je nach Virustyp unterschiedlichen Rezeptor auf der Membran der Zielzelle. Bei HIV handelt es sich dabei um das CD4-Protein sowie die Chemokinrezeptoren CCR5 bzw. CXCR4. CD4 und Chemokinrezeptoren finden sich vornehmlich auf T-Helferzellen und Makrophagen und stellen somit die Ursache für den bevorzugten Befall dieser Zellen durch HIV dar. Es folgen Konformationsänderungen der Glykoproteine, die vor allem durch TM vermittelt zu einer Fusion von Virus- und Zellmembran führen und dadurch das Kapsid in das Zytoplasma freisetzen (Hunter 1997).

Nach einer Konformationsänderung des Kapsides beginnt der Vorgang der reversen Transkription zunächst am 3'-OH-Ende des tRNA-Moleküls, das an die Primerbindungsstelle (PBS) der viralen RNA hybridisiert ist (*Abbildung 3*). Es wird also zunächst im Bereich von U5 und R ein komplementärer RNA/DNA-Hybridstrang gebildet.

Im folgenden wird durch die RNase-H-Aktivität der RT der RNA-Anteil des synthetisierten Hybrids abgebaut und die R-Region des daraus entstandenen DNA-Einzelstranges wird an die R-Region am 3'-Ende der viralen RNA gelagert und dient dort als Primer für die Bildung eines dem RNA-Genom komplementären DNA-Stranges, wobei sich am 5'-Ende dieses Stranges noch die kovalent gebundene tRNA befindet. Der RNA-Anteil des synthetisierten Hybrids wird wiederum durch die RNase H abgebaut, mit Ausnahme der Region des Polypurintraktes (PPT), der sich resistent gegenüber der RNase H zeigt. Vom 3'-Ende des PPT ausgehend wird nun ein erster Teil doppelsträngiger DNA gebildet, wobei das neugebildete kurze Stück auch die komplementäre Sequenz zur tRNA, also die PBS, enthält. Daraufhin wird die tRNA abgebaut, so dass am 3'- und am 5'-Ende des teilweise doppelsträngigen DNA-Stranges zueinander komplementäre einzelsträngige Abschnitte vorliegen, die sich über den Bereich des PBS erstrecken. Diese lagern sich aneinander und dienen jeweils als Primer für die Vervollständigung des anderen Stranges, so dass das Virusgenom im Endergebnis als DNA-Doppelstrang vorliegt, dessen kodierender Bereich an beiden Enden vom LTR, bestehend aus U3, R und U5, flankiert ist (Telesnitsky et Goff 1997).



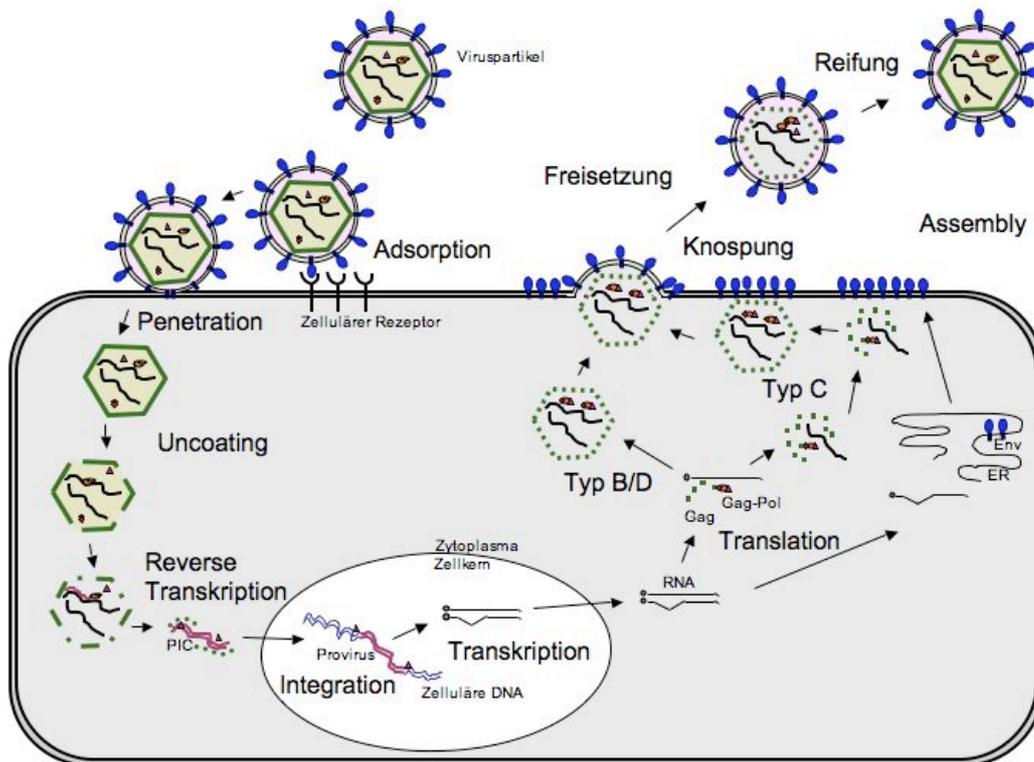
**Abbildung 3: Ablauf der Reversen Transkription (vereinfacht)**

Das nun als doppelsträngige DNA vorliegende virale Genom wird zusammen mit Proteinkomponenten als Präintegrationskomplex (PIC) in den Zellkern überführt und dort der Vorgang der Integration durch die Entfernung von jeweils zwei Nukleotiden an den 3'-Enden durch die virale Integrase eingeleitet. Ebenfalls wird die zelluläre DNA geschnitten, wobei überhängende 5'-Enden von vier bis sechs Basen entstehen. Im Anschluß an die Integration werden die einzelsträngigen Lücken aufgefüllt und die Doppelstränge ligiert (Brown 1997).

Unter Kontrolle des in der U3-Region des 5'-LTR gelegenen Promotors werden jetzt durch die zelluläre RNA-Polymerase II mRNAs transkribiert, die im Anschluss teilweise gespleißt werden, bei komplexen Retroviren unter Umständen auch mehrfach. Die mRNAs werden in das Zytoplasma transportiert und in die entsprechenden (Vorläufer-)Proteine translatiert, also Gag, Gag-Pol, Env sowie die regulatorischen und akzessorischen Proteine (Rabson et Graves 1997).

Env wird vermittelt über ein aminoterminaleres Signalpeptid an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Im Verlauf wird Env glykosiliert, bildet trimere Komplexe aus und wird mittels zellulärer Proteasen in die Bestandteile TM und SU gespalten (Swanstrom et Wills 1997).

Gag und Gag-Pol werden an freien Ribosomen im Zytoplasma gebildet, am aminoterminalen Ende meist myristyliert und zur Zellmembran transportiert. Dort erfolgt auch die Zusammensetzung des Kapsids bei der C-Typ-Morphogenese, während sie bei Morphotyp B/D bereits im Zytoplasma stattfindet. Im Folgenden stülpen sich Vesikel von der Zytoplasmamembran ab, wobei in den noch unreifen Partikeln Gag, Gag-Pol sowie die genomische RNA, die sich über die  $\psi$ -Sequenz an den Nukleokapsidanteil von Gag angelagert hat, anzutreffen sind. Innerhalb der Partikel wird nun die virale Protease aktiv, die Gag und Gag-Pol in die einzelnen Bestandteile spaltet und somit die Reifung zum fertigen Viruspartikel ermöglicht (Swanstrom et Wills 1997; Vogt 1997b).



**Abbildung 4: Replikationszyklus eines (einfachen) Retrovirus**

Der Replikationszyklus beginnt mit der Adsorption an die Wirtszelle, gefolgt von Penetration, Uncoating, reverser Transkription und Integration in der frühen Phase des Zyklus. Zur späten Phase rechnet man die Transkription der genomischen RNA sowie der RNAs für die einzelnen Proteine, gefolgt von Translation, Verpackung und Kapsidaufbau, Knospung, Freisetzung und Reifung. Der unterschiedliche Partikelbau von Morphotyp B/D und C ist angedeutet. PIC: Präintegrationskomplex, ER: Endoplasmatisches Retikulum.

## 1.2 Foamyviren

### 1.2.1 Generelle Eigenschaften

Als *Spumaretrovirinae* bilden die Foamyviren eine eigene Subfamilie innerhalb der Retroviren, da sie sich von den Orthoretroviren durch Besonderheiten ihrer Molekularbiologie und Replikationsstrategie unterscheiden (Linial 1999; Delelis et al.

2004). Zu erwähnen sind hier etwa die Regulation der Genexpression und das Vorhandensein eines internen Promotors, die Verpackung von RNA und Pol, der Kapsidaufbau sowie das Muster der Spaltung durch die virale Protease, die Interaktion von Gag und Env bei der Knospung von der Membran sowie das Vorhandensein eines Leaderpeptids von Env als integraler Bestandteil des Virions und nicht zuletzt das Ereignis einer Reversen Transkription zu einem späten Zeitpunkt im Replikationszyklus, was zum Vorhandensein von DNA im Viruspartikel führt. Manche Aspekte der Foamyviren erinnern dabei an Hepadnaviren, weshalb die Foamyviren auch als Bindeglied zwischen (Ortho-)Retroviren und Hepadnaviren angesehen werden (Lecellier et Saib 2000).

Die Vertreter der Foamyviren (*Tabelle 2*) finden sich, teilweise mit hoher Prävalenz, in Affen (Hooks et Gibbs 1975), Katzen (Riggs et al. 1969; Winkler et al. 1997), Rindern (Malmquist et al. 1969; Holzschu et al. 1998) und Pferden (Tobaly-Tapiero et al. 2000). Sie führen dort unter Antikörperbildung des Wirtes zu persistierenden Infektionen, ohne dass dabei bis heute ein mit Foamyviren assoziiertes Krankheitsbild belegt werden konnte (Hooks et Gibbs 1975; Linial 2000; Meiering et Linial 2001; Murray et Linial 2006).

Wirt	Virus	Abkürzung	Erstbeschreibung
Affen	Simiane Foamyviren	SFV	<i>siehe Tabelle 3</i>
Katzen	Feline Foamyviren	FFV (FeFV, FSV)	(Riggs et al. 1969)
Rinder	Bovine Foamyviren	BFV (BSV)	(Malmquist et al. 1969)
Pferde	Equine Foamyviren	EFV	(Tobaly-Tapiero et al. 2000)

***Tabelle 2: Foamyviren und ihre Wirte***

Verschiedene Foamyviren wurden insbesondere aus diversen Affenarten isoliert (*Tabelle 3*), wie etwa Makaken (Enders et Peebles 1954; Rustigian et al. 1955; Kupiec et al. 1991; Calattini et al. 2006b), Grünen Meerkatzen (Stiles et al. 1964; Renne et al. 1992; Schweizer et al. 1999), Pavianen (Heberling et Kalter 1975; Rhodes-Feuillette et al. 1979; Blewett et al. 2000), Klammeraffen (Hooks et al. 1973), Schimpansen (Rogers et al. 1967; Hooks et al. 1972; Herchenröder et al. 1994; Calattini et al. 2006a), Orang-Utans (McClure et al. 1994; Verschoor et al. 2003), Gorillas (Bieniasz et al. 1995) und vielen weiteren (Hooks et Gibbs 1975; Marczynska et al. 1981;

Broussard et al. 1997; Blewett et al. 2003; Hussain et al. 2003; Murray et Linial 2006).

Affenwirt	Foamyvirus-Isolat(e)	Erstbeschreibung
<b>Trockennasenaaffen: Altweltaffen: Menschenartige</b>		
Mensch <sup>1</sup>	PFV (SFVcpz(hu), SFV-hu, CFV/hu, PFV-1, HFV, HSRV)	(Achong et al. 1971)
Schimpanse	SFVcpz (SFV-6, SFV-7, SFVptr)	(Rogers et al. 1967)
Gorilla	SFVgor (SFVggo, SFVgg)	(Bieniasz et al. 1995)
Orang-Utan	SFVora (SFVpp, SFVppy, SFVpon, SFV-11)	(McClure et al. 1994)
Gibbon	SFVhle, SFVhpi	(Hussain et al. 2003)
<b>Trockennasenaaffen: Altweltaffen: Meerkatzenverwandte</b>		
Makake	SFVmac (SFV-1, SFV-2)	(Enders et Peebles 1954)
Grüne Meerkatze	SFVagm (SFV-3)	(Stiles et al. 1964)
Pavian	SFVbab (SFV-10, SFV10bab, SFVpan)	(Rhodes-Feuillette et al. 1979)
Mandrill	SFVmsp	(Blewett et al. 2000)
Drill	SFVdrl (SFVmle)	(Blewett et al. 2000)
Husarenaffe	SFVpat (SFVepa)	(Broussard et al. 1997)
Haubenlangur	SFVtr	(Hussain et al. 2003)
Eulenkopfmeerkatze	SFVhm	(Broussard et al. 1997)
Sumpfmeerkatze	SFVani	(Hussain et al. 2003)
<b>Trockennasenaaffen: Neuweltaffen</b>		
Totenkopffaffe	SFVsqu (SFV-4)	(Johnston 1971)
Klammeraffe	SFVspm (SFV-8, SFVasp)	(Hooks et al. 1973)
Kapuzineraffe	SFVcap (SFV-9)	(Hooks et Gibbs 1975)
Büschelaffe	SFVmar (FXV)	(Marczynska et al. 1981)
<b>Feuchtnasenaaffen (Halbaffen)</b>		
Galago	SFVgal (SFV-5)	(Johnston 1971)

**Tabelle 3: Auswahl an simianen Foamyviren**

Die Benennung der Foamyviren erfolgte früher nach Serotypen (SFV-1 bis -11), dann nach der englischen Bezeichnung des Wirtes (z. B. SFVmac für Makakenisolate). Daneben gibt es eine Vielzahl weiterer Bezeichnungen, die sich z. B. auf den lateinischen Namen der Gattung, Art oder Unterart beziehen, in dem das Virus gefunden wurde. Die Benennungen in der zweiten Spalte sind daher zum Teil Synonyme (z. B. HFV und PFV), zum Teil Bezeichnungen für unterschiedliche Serotypen aus einer Gattung/Art (z. B. SFV-6 und SFV-7) und zum Teil einander über- bzw. untergeordnete Begriffe (z. B. umfasst SFVcpz im weiteren Sinne jegliches Schimpansen-Foamyvirus, also die SFV-Isolate SFVptr, SFVpvl, SFVpvr aus den verschiedenen Schimpansenunterarten). Zum Teil werden die Benennungen auch je nach Zusammenhang unterschiedlich gebraucht (SFVcpz im engeren Sinne meint z. B. ein "drittes" Schimpansen-Foamyvirusisolat nach SFV-6 und SFV-7).

<sup>1</sup>Kein eigentliches Reservoir, zoonotische Übertragung (siehe Text).

Die Übertragung der Foamyviren geschieht vertikal im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter, z. B. durch Speichel beim Beißen, und die Rate infizierter erwachsener Tiere, besonders bei in Gefangenschaft gehaltenen Primaten, erreicht Werte über 70% oder gar 90% (Broussard et al. 1997; Blewett et al. 2000; Hussain et al. 2003; Calattini et al. 2006b). Der Verwandtschaftsgrad der einzelnen simianen Foamyvirusisolate entspricht in hohem Maße dem der jeweiligen Wirte, was für eine seit langem andauernde Koevolution der Foamyviren und ihrer Wirte spricht (Switzer et al. 2005).

Während verschiedene Foamyviren aus den unterschiedlichsten Affenarten, auch allen Menschenaffen, isoliert werden konnten, scheint es ein eigenes humanes Foamyvirus nicht zu geben (Schweizer et al. 1995; Ali et al. 1996). Bei einem ursprünglich als humanes Foamyvirus (HFV oder HSRV) bezeichneten Isolat aus lymphoblastoiden Zellen, die aus einem Nasopharynxkarzinom eines kenianischen Patienten stammen (Achong et al. 1971), handelt es sich nach heutigen Erkenntnissen um eine SFVcpz-Variante, die vermutlich aus einer Infektion des ursprünglichen Patienten mit einem aus Schimpansen stammenden Foamyvirus herrührt (Meiering et Linial 2001). Diese Annahme, schon früh aufgrund antigenetischer Ähnlichkeiten postuliert (Brown et al. 1978; Nemo et al. 1978), wird vor allem durch Sequenzvergleiche unterstützt (Herchenröder et al. 1994; Schweizer et Neumann-Haefelin 1995). Das "humane" Foamyvirus, an dem viele der grundlegenden Untersuchungen zu Foamyviren durchgeführt wurden, wird heute als prototypisches Foamyvirus (PFV) bezeichnet.

Im Gegensatz zu der Apathogenität und Persistenz von Foamyviren *in vivo* steht ihre Zytopathogenität *in vitro*. Foamyviren können in Zellkultur eine Vielzahl von Zellreihen infizieren (Hooks et Gibbs 1975; Hill et al. 1999; Meiering et Linial 2001) und führen dort häufig, besonders bei verschiedenen Fibroblastenzelllinien, zu einem ausgeprägten zytopathischen Effekt (CPE) mit fusionierten, vakuolisierenden, multinukleären Riesenzellen und einem charakteristischen schaumigen Aussehen, der diesen Viren auch ihren Namen gab (engl. *foamy* = schaumig; lat. *spuma* = Schaum) (Hooks et Gibbs 1975; Mergia et al. 1996; Hill et al. 1999; Meiering et Linial 2001). In einigen anderen, vor allem hämatopoetischen Zelllinien wird dagegen keine

lytische, sondern eine persistierende Infektion ohne CPE etabliert (Mikovits et al. 1996; Yu et al. 1996c).

### 1.2.2 Aufbau des foamyviralen Partikels

Elektronenmikroskopisch zeigen sich Foamyviren als 100-120 nm große Partikel, in deren Hüllmembran sich etwa 15 nm lange ‘Stacheln’ (engl. *spikes*) befinden, die sich aus den *env*-kodierte Glykoproteinen zusammensetzen, die dabei als Trimere vorliegen (Lecellier et Saib 2000; Wilk et al. 2000; Wilk et al. 2001). Das im Inneren enthaltene Kapsid, bestehend aus prozessierten und unprozessierten Gag-Proteinen, sieht unreif aus und mißt etwa 50-60 nm (Hooks et Gibbs 1975; Fischer et al. 1998).

Die Glykoproteine umfassen neben der Oberflächeneinheit (SU, bei PFV gp80) und der transmembranen Einheit (TM, bei PFV gp48) auch ein ungewöhnlich langes Leaderpeptid (LP, bei PFV gp18), welches sich ebenfalls als Bestandteil des Virions findet (Lindemann et al. 2001).

Das sphärische Kapsid der Foamyviren besteht aus unprozessiertem (bei PFV 71 kDa) und prozessiertem (68 kDa) Gag, wobei letzterem gegenüber dem unprozessierten ein durch die virale Protease abgespaltenes, etwa 3 kDa großes Peptid am C-Terminus fehlt (Pfrepper et al. 1999).

Im Viruspartikel befinden sich außerdem das Pol-Protein (bei PFV 127 kDa), bzw. dessen Spaltprodukte PR-RT/RH mit 85 kDa und IN mit 40 kDa (Netzer et al. 1993; Morozov et al. 1997; Pfrepper et al. 1998), sowie das Virusgenom. Dieses liegt, zumindest zu einem gewissen Anteil, in Form von DNA und nicht wie bei den Orthoretroviren als RNA vor (Yu et al. 1996a; Moebes et al. 1997; Yu et al. 1999).

### 1.2.3 Genom

Das Genom der Foamyviren (*Abbildung 5*) stellt mit einer Länge von etwa 12 bis 13,3 kb der linearen RNA das längste unter den Retroviren dar (Lecellier et Saib 2000). Es zeigt prinzipiell den typischen retroviralen Aufbau mit LTR-Sequenzen zu beiden Seiten der kodierenden Region, die wie bei allen Retroviren die Informationen für Gag, Pol und Env enthält (Maurer et al. 1988; Linial 1999). Als komplexe Retroviren

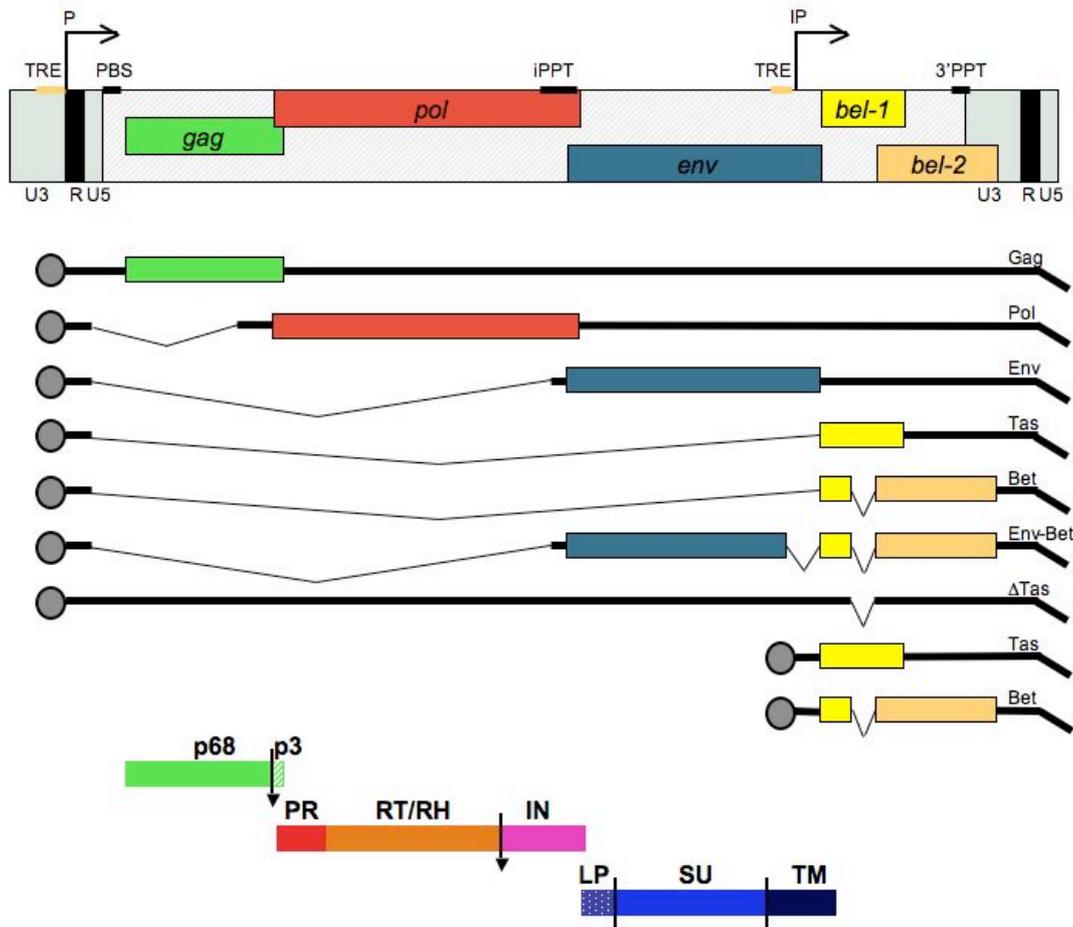
enthalten die Foamyviren weitere offene Leseraster im 3'-Bereich, zwischen *env* und dem LTR (Flügel et al. 1987). Sie kodieren für die Proteine Tas und Bet.

Foamyviren weisen darüberhinaus im Genom die auch bei Lentiviren vorhandenen regulatorischen Sequenzen auf, namentlich einen Promotor in der U3-Region, eine Primerbindungsstelle (PBS) im 5'-Bereich (Maurer et al. 1988), einen Polypurintrakt (3'PPT) im 3'-Bereich (Flügel et al. 1987) und einen weiteren, internen, Polypurintrakt (iPPT) im Bereich des *pol*-Gens (Kupiec et al. 1988).

Neben dem Promoter im U3-Bereich des 5'-LTRs besitzen die Foamyviren einen internen Promotor (IP) im Bereich des *env*-Gens, unter dessen Kontrolle die Transkripte für Tas und Bet stehen (Löchelt et al. 1993; Campbell et al. 1994). Interner Promotor, der eine gewisse basale Aktivität besitzt, und U3-Promotor werden von Tas, einem DNA-bindenden Protein, aktiviert (Löchelt et al. 1994; Kang et al. 1998; Kang et Cullen 1998; Meiring et al. 2001).

In zwei *cis*-aktiven Sequenzen (CAS I und II) des foamyviralen Genoms, die sich in der RU5-Region des 5'LTR bis in *gag* hineinreichend und im 3'-Bereich des *pol*-Gens (Erlwein et al. 1998; Heinkelein et al. 1998; Wu et al. 1998) befinden, sind ferner Bereiche enthalten, die für die Genomverpackung und die Enkapsidierung der viralen Polymerase essentiell sind (Peters et al. 2005).

Foamyviren synthetisieren neben einer vollständigen (prä-)genomischen RNA auch eine defekte Variante,  $\Delta$ Tas (Saib et al. 1993). Dem entsprechenden Provirus fehlen die entscheidenden Abschnitte des für Tas kodierenden Gens, wobei der herausgeschnittene Teil dem bei der Synthese von Bet herausgepleißtem Material entspricht. Die Bedeutung von  $\Delta$ Tas könnte, z. B. über eine Veränderung des Verhältnisses von Bet zu Tas, in der Etablierung einer persistierenden Infektion liegen (Saib et al. 1995).



**Abbildung 5: Genom, Genexpression und Proteinprozessierung der Foamyviren**

Oben: Genomorganisation P: LTR-Promotor, IP: Interner Promotor, TRE: Tas-responsives Element, PBS: Primer-Bindungsstelle, 3'PPT: 3'-Polypurintrakt, iPPT: interner Polypurintrakt. Mitte: Genexpression. Die ungespleißte RNA dient sowohl als mRNA für die Translation von Gag als auch als (prä-)genomische RNA. Unten: Spaltung der foamyviralen Proteine Gag, Pol und Env durch die virale Protease (senkrechter Pfeil) bzw. zelluläre Proteasen (senkrechter Strich).

## 1.2.4 Genexpression und virale Proteine

### 1.2.4.1 Gag

Das Gag-Protein wird im 5'-Bereich des Genoms, im Anschluss an den 5'-LTR sowie eine kurze untranslatierte Region, kodiert (Maurer et al. 1988). Die Translation erfolgt von einer ungespleißten RNA (prä-)genomischer Länge (*Abbildung 5*).

Im Gegensatz zum orthoviralen Gag, das während der Maturation in die Bestandteile Matrix, Kapsid und Nukleokapsid gespalten wird, wird vom foamyviralen Gag durch die virale Protease nur ein Peptid von 3 kDa am Karboxyterminus abgespalten. Dieser Schritt ist essentiell und führt zu einem Verhältnis des unprozessierten pr71 zum prozessierten p68 von etwa eins zu vier (Konvalinka et al. 1995; Enssle et al. 1997; Zemba et al. 1998; Cartellieri et al. 2005b). Weiter prozessierte Gag-Proteine finden sich nur in geringen Mengen (Netzer et al. 1990; Hahn et al. 1994; Giron et al. 1997; Pfrepper et al. 1999). Die weitere Prozessierung scheint allerdings bei frühen Replikationsschritten wie dem Abbau des Kapsids und der Freisetzung dessen Inhalts (engl. *uncoating*) eine Rolle zu spielen (Lehmann-Che et al. 2005).

Dem foamyviralen Gag fehlen zudem die bei Orthoretroviren konservierten Motive wie etwa die Cystein-Histidin-Boxen, die der Interaktion mit der viralen RNA dienen. Stattdessen finden sich bei den Foamyviren der Primaten im karboxyterminalen Bereich drei an Glycin und Arginin reiche Sequenzabschnitte, die sogenannten GR-Boxen (Schliephake et Rethwilm 1994). GR-Box I kann sowohl RNA als auch DNA binden und ist essentiell für den viralen Replikationszyklus, in dem sie die Inkorporation der viralen RNA in das Partikel vermittelt (Yu et al. 1996b; Stenbak et Linial 2004). Ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) findet sich in GR-Box II, die sich somit verantwortlich für den Transport von Gag in den Zellkern zeigt (Schliephake et Rethwilm 1994). Weitere Abschnitte von Gag, deren Funktion zum Teil identifiziert werden konnte, umfassen ein YXXLGL-Motiv vor den GR-Boxen, das beim Zusammenbau des Kapsids essentiell ist (Patton et al. 2005; Mannigel et al. 2007) sowie verschiedene Bereiche am Aminoterminus von Gag, die ebenfalls beim Kapsidaufbau (Eastman et Linial 2001), bei der Knospung der Viruspartikel von der Membran (Stange et al. 2005) und bei der Interaktion von Gag mit Env (Cartellieri et al. 2005a) eine wichtige Rolle spielen.

Weiterhin befinden sich in Gag einige Bereiche, die zumindest bei den Foamyviren der Primaten Coiled-Coil-Motive enthalten. Eines davon, das die Aminosäuren (AS) 130-160 umfasst, ist wichtig für Gag-Gag-Interaktionen (Tobaly-Tapiero et al. 2001), ein anderes (AS 160-180) für die Interaktion von Gag mit Mikrotubuli beim Transport innerhalb des Zytoplasmas (Petit et al. 2003).

### 1.2.4.2 Pol

Foamyvirales Pol wird nicht, wie bei den Orthoretroviren, als Gag-Pol-Vorläuferprotein synthetisiert, sondern von einer eigenen gespleißten mRNA (*Abbildung 5*) translatiert (Enssle et al. 1996; Jordan et al. 1996; Löchelt et Flügel 1996; Yu et al. 1996a). Das Pol-Vorläuferprotein hat bei PFV eine Masse von 127 kDa und umfasst die Aktivitäten der Protease (PR), der Reversen Transkriptase (RT) und RNase H (RH), sowie der Integrase (IN). Es wird von der viralen Protease in einem für die Virusreplikation essentiellen Schritt hauptsächlich einmal gespalten, nämlich zwischen PR-RT/RH (p85) einerseits und IN (p40) andererseits (Netzer et al. 1993; Pfrepper et al. 1998; Roy et Linial 2007).

Die für die Virusinfektivität essentielle Aktivität der Protease, die anders als bei den übrigen Retroviren nicht von der RT gespalten wird, erstreckt sich in Pol über etwa die ersten 100-150 Aminosäuren und beinhaltet das Motiv DSG, bzw. beim feline Foamyvirus als Besonderheit DSQ, im aktiven Zentrum (Konvalinka et al. 1995; Winkler et al. 1997; Pfrepper et al. 1998). Die Protease wird vor allem an zwei Stellen substratspezifisch aktiv, nämlich in Pol zwischen PR-RT/RN und IN sowie in Gag zwischen p68 und p3 (Pfrepper et al. 1998; Pfrepper et al. 1999; Pfrepper et al. 2001). Die Reverse Transkriptase umfasst die Aktivitäten einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase bzw. RT im engeren Sinne und einer RNase H. Die beiden räumlich getrennten Aktivitäten sind  $Mn^{2+}$ -abhängig und voneinander zu einem gewissen Grade abhängig (Scolnick et al. 1970; Parks et al. 1971; Liu et al. 1977; Benzair et al. 1982; Benzair et al. 1983; Kögel et al. 1995a; Kögel et al. 1995b; Boyer et al. 2004). Die Polymerase-Aktivität mit dem Motiv YVDD im aktiven Zentrum weist eine deutlich höhere Prozessivität auf als die anderer Retroviren und scheint diese auch im Replikationszyklus zu benötigen (Rinke et al. 2002; Boyer et al. 2004).

Das Vorhandensein einer Integrase ist eines der Merkmale, das die Foamyviren mit den Orthoretroviren teilen und sie beide von den Hepadnaviren unterscheidet (Linial 1999; Lecellier et Saib 2000). Die Integrase ist für den Replikationszyklus der Foamyviren essentiell und enthält in Homologie zu anderen bekannten Integrasen im aminoterminalen Bereich einen HHCC-Finger sowie im aktiven Zentrum das DD<sub>35</sub>E-Motiv, zeigt jedoch funktionell einige Besonderheiten wie z. B. die unvollständige Generierung eines 5'-überhängenden Endes am Minusstrang im U3-Bereich (Pahl et Flügel 1993; Pahl et Flügel 1995; Enssle et al. 1999; Juretzek et al. 2004). Auch das Integrationsmuster der Foamyviren unterscheidet sich von dem anderer Retroviren, bei denen dieses untersucht wurde, wie HIV oder MLV, und bevorzugt weniger als diese aktiv transkribierte Gene und Promotorregionen (Nowrouzi et al. 2006; Trobridge et al. 2006).

### 1.2.4.3 Env

Das bei PFV 130 kDa große Env-Vorläuferprotein wird wie bei allen Retroviren von einer gespleißten mRNA translatiert. Env wird am rauen ER zunächst als Typ-III-Transmembran synthetisiert und dann posttranslational auf dem Weg zur Zelloberfläche durch Furin-ähnliche zelluläre Proteasen in die Bereiche Leaderpeptid (LP, gp18), Oberflächen- (SU, gp80) und Transmembraneinheit (TM, gp48) gespalten, die alle glykosiliert sind (Bansal et al. 2000; Lindemann et al. 2001; Duda et al. 2004; Lüftenegger et al. 2005).

Das Leaderpeptid ist mit 126 Aminosäuren (PFV) ungewöhnlich lang und stellt, wiederum eine Besonderheit der Foamyviren, einen integralen Bestandteil des Virions dar, in dem es als Typ-II-Transmembranprotein in der Membran verankert ist und mit dem N-Terminus von Gag Kontakt aufnimmt (Lindemann et al. 2001; Wilk et al. 2001). Die Interaktion von Env mit Gag ist bei der Formation der Viruspartikel essentiell, so dass auch Gag allein nicht, wie bei anderen Retroviren, für eine Membranknospung und Partikelfreisetzung ausreicht und Foamyviren nicht durch Glykoproteine anderer Viren pseudotypisiert werden können (Baldwin et Linial 1998; Fischer et al. 1998; Pietschmann et al. 1999).

Wie bei anderen Retroviren ist die Oberflächeneinheit SU mit der Transmembraneinheit assoziiert und dient der Kontaktaufnahme mit dem zellulären

Rezeptor (Duda et al. 2006). TM ist ein Typ-I-Transmembranprotein und enthält Bereiche, die für die Partikelfreisetzung und die Fusion mit der Zellmembran der Zielzelle essentiell sind, sowie mit der Ausnahme von EFV im zytoplasmatischen Abschnitt ein Dilysinmotiv als ER-Retentionssignal (Goepfert et al. 1997; Goepfert et al. 1999; Pietschmann et al. 2000; Tobaly-Tapiero et al. 2000).

### **1.2.4.4 Tas**

Tas, der Transaktivator der Spumaviren, wird im ersten der akzessorischen offenen Leseraster (ORF-1) kodiert und steht unter Kontrolle des von ihm selbst aktivierten internen Promotors (Rethwilm et al. 1991). Das von einer einfach gespleißten mRNA translatierte Protein umfasst bei PFV 300 Aminosäuren (36 kDa) und ist für die Virusreplikation essentiell (Löchelt et al. 1991; Baunach et al. 1993). Es aktiviert über sogenannte Tas-responsive Elemente (TRE) speziesspezifisch den Promotor im 5'-LTR und den internen Promotor, kann daneben aber auch zelluläre Gene aktivieren (Erlwein et Rethwilm 1993; Campbell et al. 1994; Wagner et al. 2000; Kido et al. 2002). Tas besitzt dabei die Eigenschaft, direkt an bestimmte Erkennungssequenzen der DNA zu binden, wobei es zum IP die höhere Affinität zeigt (He et al. 1996; Zou et Luciw 1996; Kang et al. 1998). Die Domäne, die für die DNA-Erkennung zuständig ist, befindet sich im zentralen Bereich der Aminosäureabfolge von Tas, hinter einer mit dem N-Terminus von Bet identischen Region (He et al. 1993). Am C-Terminus finden sich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) sowie die Domäne, die sich für die Aktivierung der Genexpression verantwortlich zeigt (He et al. 1993; Venkatesh et Chinnadurai 1993; Chang et al. 1995). Einige zelluläre Faktoren wie die Histonacetyltransferasen p300 und PCAF interagieren mit Tas und erhöhen die Transaktivierung, während andere wie NFI negativ regulierend wirken (Kido et al. 2003; Bannert et al. 2004; Bodem et al. 2007).

### **1.2.4.5 Bet**

Bet, dessen Transkription ebenfalls unter Kontrolle des internen Promotors steht, wird von einer zweifach gespleißten mRNA translatiert (*Abbildung 5*), die den Anfang von ORF-1 sowie den gesamten ORF-2 enthält (Muranyi et Flügel 1991). Bet (bei PFV 60

kDa) wird im Zellkern und im Zytoplasma vorgefunden, kann sekretiert und von anderen Zellen aufgenommen werden und ruft eine Antikörperreaktion des Wirtes hervor (Hahn et al. 1994; Lecellier et al. 2002). Obwohl einige Hinweise auf gewisse Funktionen von Bet vorliegen und sich die Belege für einzelne Eigenschaften dieses Proteins stetig mehren, ist ein allgemein anerkanntes Gesamtkonzept für die Bedeutung von Bet im foamyviralen Replikationszyklus noch nicht verfügbar. So scheinen die Bereiche von Bet, die sich nicht mit Tas oder regulatorischen Sequenzen wie dem PPT und dem LTR überlappen, für die Replikation der Foamyviren in Zellkultur entbehrlich bzw. zumindest nicht absolut essentiell zu sein und bei einem mit SFVagm infiziertem Menschen wurde ein defekter ORF-2 festgestellt (Baunach et al. 1993; Yu et Linial 1993; Callahan et al. 1999; Alke et al. 2001). Insgesamt scheint Bet aber die Eigenschaft aufzuweisen, eine lytische Infektion zu verhindern und vielmehr eine latente oder persistierende zu etablieren, und damit gewissermaßen als Gegenspieler von Tas zu agieren (Meiering et Linial 2002). Damit in Zusammenhang stehen möglicherweise auch Beobachtungen, dass die Expression von Bet mit einer Resistenz gegenüber einer Superinfektion assoziiert ist, sowie die im Zusammenhang mit  $\Delta$ Tas aufgezeigten Ergebnisse (Saib et al. 1995; Bock et al. 1998).

In welchem Maße eine dem Vif-Protein von HIV ähnliche Fähigkeit von Bet, Effekte von APOBEC3 zu vermindern, bei der Vermehrung der verschiedenen Foamyviren in ihren jeweiligen Wirten eine Rolle spielt, kann noch nicht abschließend beurteilt werden (Löchelt et al. 2005; Russell et al. 2005; Delebecque et al. 2006).

### **1.2.4.6 Env-Bet**

Env-Bet ist ein Glykoprotein von 160 kDa, das von einer mehrfach gespleißten RNA (*Abbildung 5*) translatiert wird (Giron et al. 1998; Lindemann et Rethwilm 1998). Das Protein, dem Abschnitte der transmembranen Einheit und das ER-Signal fehlen, wird in nicht unerheblichen Mengen nachgewiesen und in den Überstand sekretiert. Es ist jedoch kein Bestandteil des Virions und seine Funktion ist unbekannt.

### **1.2.5 Replikationszyklus**

Der foamyvirale Replikationszyklus entspricht zwar in vielen Punkten dem der übrigen Retroviren, weist aber auch einige sehr charakteristische Unterschiede auf,

die zum Teil eher an Hepadnaviren erinnern, und in ihrer Gesamtheit nicht zuletzt dazu führten, dass die Foamyviren durch Bildung einer eigenen Subfamilie von allen übrigen Retroviren abgegrenzt werden (Linial 1999; Lecellier et Saib 2000; Rethwilm 2003).

Zunächst erfolgt die Kontaktaufnahme bestimmter Abschnitte der Oberflächeneinheit des Env-Glykoproteins mit dem Rezeptor der Wirtszelle, gefolgt von der Partikelaufnahme und der Freisetzung des Kapsids in die Wirtszelle durch Endozytose und einen pH-abhängigen Fusionsprozess (Picard-Maureau et al. 2003; Duda et al. 2006). Der zelluläre Rezeptor der Foamyviren ist dabei unbekannt, scheint jedoch weit verbreitet zu sein, da Foamyviren in Zellkultur eine ganze Reihe von Zelllinien, auch solche die sich von Vogel- oder Reptiliengewebe ableiten, infizieren können (Hill et al. 1999). Das Kapsid wird im Folgenden über Interaktionen mit dem Mikrotubulus-Netzwerk der Zelle zum Zentrosom transportiert, wo es längere Zeit verharren kann, dann teilweise abgebaut und der noch nicht genau definierte Präintegrationskomplex in den Zellkern überführt (Saib et al. 1997; Petit et al. 2003; Lehmann-Che et al. 2005; Lehmann-Che et al. 2007). Hier erfolgt die Integration in das Wirtsgenom, wobei bestimmte chromosomale Abschnitte gegenüber anderen bevorzugt werden (Juretzek et al. 2004; Nowrouzi et al. 2006; Trobridge et al. 2006).

In Abhängigkeit von der Art der infizierten Zelle erfolgt nach der Integration des Provirus eine gewisse basale Transkription vom internen Promotor, die zur Produktion von Tas und Bet führt (Löchelt 2003). In einer positiven Feedback-Schleife kann Tas seine eigene Synthetisierung steuern und schließlich in ausreichenden Mengen produziert werden, um auch den Promotor im LTR zu aktivieren. Es erfolgt die Transkription von genomischer RNA, die auch der Synthese von Gag dient, sowie der mRNAs für Pol, Env und weitere wie  $\Delta$ Tas und Env-Bet, wobei besonders das Vorhandensein einer eigenen mRNA für Pol bzw. das Fehlen eines Gag-Pol-Vorläuferproteins einen entscheidenden Unterschied der Spumaretroviren zu den Orthoretroviren darstellt (Enssle et al. 1996; Löchelt 2003).

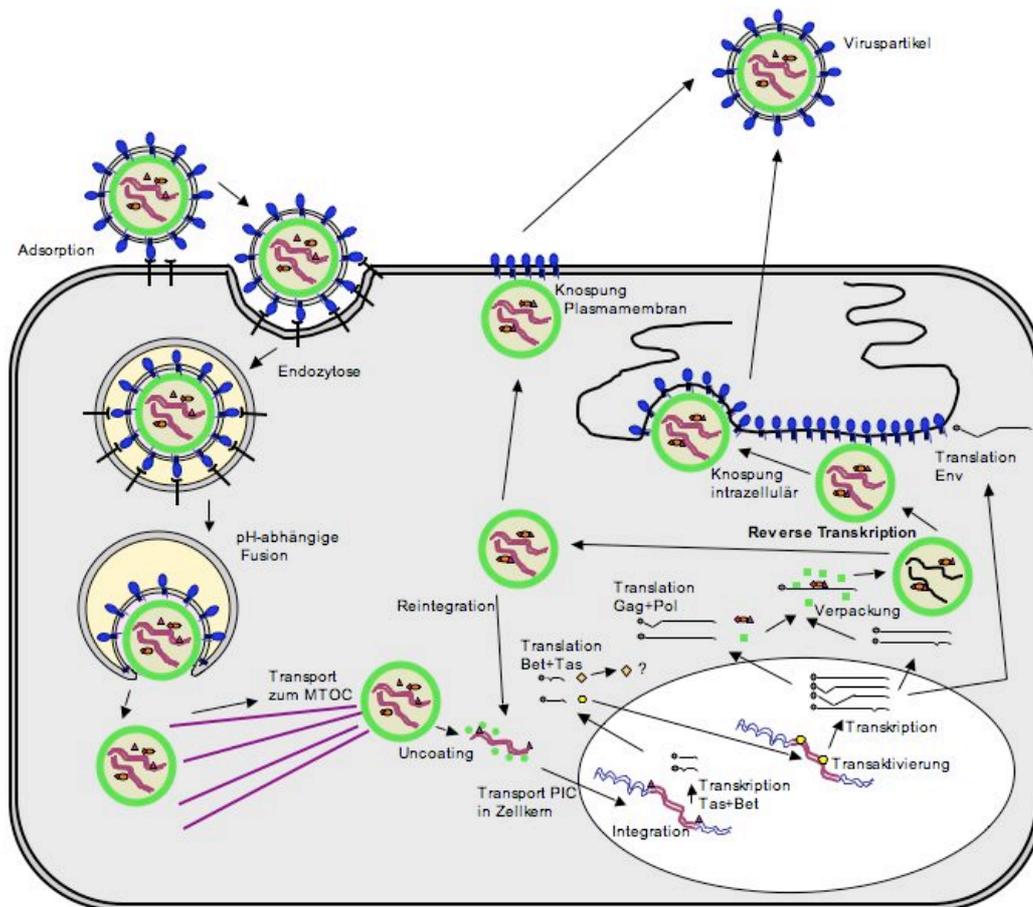
Nach Translation der Proteine werden die Bestandteile des Kapsids im Zytosol zusammgebaut und essentielle Interaktionen von Gag und Env führen zur Knospung des Viruspartikels, wahrscheinlich mit der Ausnahme von EFV an intrazellulären Membranen (Lindemann et Goepfert 2003; Linial et Eastman 2003).

Dabei sind für die adäquate Verpackung von Pol bestimmte Bereiche der genomischen RNA essentiell (Heinkelein et al. 2002b; Peters et al. 2005).

Die virale Protease spaltet das 3-kDa-Peptid am Karboxyterminus von Gag ab sowie Pol in PR-RT/RN einerseits und IN andererseits, jedoch führt sie nicht wie bei anderen Retroviren zu einer Prozessierung von Gag in MA, CA und NC oder zu einer Spaltung der Protease von der RT (Flügel et Pfrepper 2003).

Noch in der virusproduzierenden Zelle erfolgt zumindest in einem Teil der Fälle bereits die reverse Transkription, einer der auffälligsten Unterschiede der Foamyviren zu den Orthoretroviren (Yu et al. 1996a). Dementsprechend findet sich im Viruspartikel in bis zu einem von sechs Fällen DNA statt RNA und es gibt Hinweise, dass dabei die DNA das funktionell relevante Genom der Foamyviren darstellt (Moebes et al. 1997; Yu et al. 1999). Auch kann die DNA der Foamyviren unter bestimmten Bedingungen in den Zellkern zurück gelangen und dort wiederum integriert werden, ähnlich einem Retrotransposon (Heinkelein et al. 2000). Welche Bedeutung dies hat, ist ebenso wenig eindeutig geklärt wie die Rolle der großen Anzahl an unintegrierten viralen DNA-Genomkopien in infizierten Zellen, die durch reverse Transkription spät im Zellzyklus entstehen und teilweise in zirkulärer Form vorliegen (Delelis et al. 2003; Heinkelein et al. 2003; Delelis et al. 2005).

Darüberhinaus ist das Wechselspiel der Komponenten noch unzureichend verstanden, die für die Etablierung einer persistierenden und apathogenen Infektion *in vivo* Bedeutung haben, so auf Seite der Foamyviren möglicherweise die beiden Promotoren (Meiering et al. 2001), die regulatorischen Proteine Tas und Bet (Meiering et Linial 2002) oder das defekte Provirus  $\Delta$ Tas (Saib et al. 1995), sowie auf der Seite des Wirtes Komponenten des Immunsystems wie Antikörper (Cummins et al. 2005), Interferone (Falcone et al. 1999), APOBEC3 (Delebecque et al. 2006) oder microRNA (Lecellier et al. 2005).



**Abbildung 6: Foamyviraler Replikationszyklus**

Die spät im Replikationszyklus stattfindende reverse Transkription ist durch Fettdruck hervorgehoben. MTOC: Mikrotubuli-Organisationszentrum, PIC: Präintegrationskomplex.

## 1.2.6 Medizinische Bedeutung von Foamyviren

### 1.2.6.1 Foamyviren als apathogene Retroviren

Foamyviren gelten heute allgemein als apathogen, sowohl in ihren natürlichen Wirten als auch bei speziesübergreifenden Infektionen, insbesondere bei zoonotischer Infektion des Menschen (Linial 2000; Meiering et Linial 2001). Dennoch gibt es neben der außergewöhnlichen biologischen Relevanz z. B. als Brücke zwischen (Ortho-)Retroviren und Hepadnaviren auch einige Aspekte, die Foamyviren aus medizinischer Sicht interessant machen. So konnten zwar ältere Berichte über die

Assoziation von Foamyviren mit einigen Krankheiten, besonders aus dem autoimmunen Formenkreis, nicht bestätigt werden und diese Berichte werden heute auf die mangelnde Spezifität der damals angewandten Methoden zurückgeführt (Heneine et al. 1995; Schweizer et al. 1995; Meiering et Linial 2001). Es kann aber andererseits nicht ausgeschlossen werden, dass es unter bestimmten Bedingungen doch zu einer human- oder tierpathogenen Infektion kommen könnte, wie etwa einem Virus mit bestimmten Mutationen, Koinfektionen mit anderen Pathogenen, oder bestimmten genetischen Voraussetzungen auf Seiten des Wirtes oder einer Immunsuppression desselben. So ist auch SIV im natürlichen Wirt unschädlich, das aus diesem auf verschiedenen Wegen entstandene HIV jedoch bekannterweise humanpathogen (Hahn et al. 2000). Auch aus anderen Virusfamilien gibt es Berichte über die Entstehung neuer pathogener Virusformen, möglicherweise durch Mutationen oder bei bestimmten speziesübergreifenden Situationen, wie etwa in jüngerer Zeit das SARS-assoziierte Coronavirus (Holmes 2003) oder eine bestimmte Form von Influenzaviren als Erreger der “Vogelgrippe” (Li et al. 2004).

Viele biologische Eigenschaften der Foamyviren allerdings machen eine solche Pathogenitätsentwicklung bei ihnen eher unwahrscheinlich (Linial 2000). Dennoch gibt es auch einige experimentelle Befunde, die auf ein pathogenes Potential von Foamyviren hinweisen könnten. Neben dem ausgeprägten zytopathischen Effekt, den Foamyviren in Zellkultur hervorrufen und der Eigenschaft von Tas, neben den foamyviralen Promotoren auch zelluläre Gene zu aktivieren (Kido et al. 2002), sind hier Versuche an transgenen Mäusen zu nennen, in denen bei Expression von foamyviralen Proteinen neuropathologische Veränderungen in Gehirn und Muskel sowie schwere neurologische Störungen auftraten (Bothe et al. 1991; Aguzzi et al. 1993). Auch gibt es Berichte über bestimmte Interaktionen beispielsweise von PFV mit HIV, wobei allerdings unklar ist, ob solche Situationen *in vivo* eine Rolle spielen könnten (Schiffer et al. 2004).

### **1.2.6.2 Übertragung von Foamyviren auf den Menschen**

Foamyviren können von unterschiedlichen Primaten auf den Menschen übertragen werden, v. a. durch Bisse (Heneine et al. 2003). So wurden beispielsweise Isolate aus Grünen Meerkatzen, Schimpansen, Pavianen, Mandrills und Makaken im Menschen

gefunden (Schweizer et al. 1997; Heneine et al. 1998; Sandstrom et al. 2000; Brooks et al. 2002; Switzer et al. 2004; Wolfe et al. 2004). In Risikogruppen, wie etwa afrikanischen Affenjägern oder mit Affen arbeitenden Tierpflegern und Laborpersonal, erreicht die Rate von mit Foamyviren infizierten Personen etwa ein bis fünf Prozent, womit die Übertragung von SFV auf den Menschen deutlich häufiger stattzufinden scheint als beispielsweise die von SIV (Heneine et al. 1998; Switzer et al. 2004).

Eine weitere mögliche Infektionsquelle könnten Xenotransplantate darstellen, sollten diese eines Tages routinemäßig zum Einsatz kommen. So werden z. B. Paviane als mögliche Spender in der Lebertransplantation angesehen und die Infektion mit Foamyviren ist unter diesen Affen weit verbreitet (Allan et al. 1998; Blewett et al. 2000).

Auch könnten Foamyviren durch Blut oder Blutprodukte von Mensch zu Mensch übertragen werden, wie dies von Affe zu Affe möglich ist (Khan et Kumar 2006; Brooks et al. 2007), wobei es hierfür bisher ebenso keinen Nachweis gibt wie für eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch, z. B. von langjährig infizierten Personen auf ihre Lebensgefährten (Boneva et al. 2002; Switzer et al. 2004).

### **1.2.6.3 Einsatz von foamyviralen Vektoren in der Gentherapie**

Das Interesse an foamyviralen Vektoren hat in den letzten Jahren zugenommen, da einige ihrer biologischen Eigenschaften vorteilhaft erscheinen im Vergleich zu anderen Retroviren, die teilweise bereits im klinischen Einsatz getestet wurden, wie etwa Lentiviren und das Gammaretrovirus MLV (Mergia et Heinkelein 2003). Während der Einsatz von replikationskompetenten foamyviralen Vektoren denkbar ist und auch einige Versuche in dieser Richtung durchgeführt wurden (Schmidt et Rethwilm 1995), richtet sich das Augenmerk in letzter Zeit jedoch verstärkt auf replikationsinkompetente foamyvirale Vektoren und deren Einsatz zum Beispiel im Rahmen der Gentherapie mittels Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen *ex vivo*, wo eine erfolgreiche Entwicklung zu verzeichnen ist (Hirata et al. 1996; Vassilopoulos et al. 2001; Josephson et al. 2002; Kiem et al. 2007). Als Vorteile gegenüber anderen retroviralen Vektoren gelten unter anderem die allgemeine Apathogenität der Foamyviren, die weite Verbreitung des zellulären Rezeptors der

Foamyviren und die Fähigkeit, Zellen der unterschiedlichsten Gewebe, auch hämatopoetische Stammzellen, effizient transduzieren zu können (Russell et Miller 1996; Hill et al. 1999), darüberhinaus das Fehlen eines Gag-Pol-Proteins und damit die Möglichkeit, Gag und Pol getrennt zu exprimieren (Heinkelein et al. 2002a), sowie die Größe des foamyviralen Genoms und die damit einhergehende Verpackungskapazität (Russell et Miller 1996; Trobridge et al. 2002). Außerdem ist zu erwähnen, dass das foamyvirale Genom als doppelsträngige DNA vorliegt, die im Vergleich zu einzelsträngiger RNA widerstandsfähiger ist, dass Foamyviren weniger als das andere Retroviren bei der Integration aktive Gene und Promotorregionen bevorzugen (Nowrouzi et al. 2006; Trobridge et al. 2006) und dass sie zumindest besser als MLV ruhende Zellen transduzieren können (Russell et Miller 1996; Trobridge et Russell 2004). Nachteilig erscheinen dagegen zur Zeit unter anderem noch die mangelhafte Pseudotypisierbarkeit der Foamyviren (Pietschmann et al. 1999; Wu et Mergia 1999), das Vorhandensein einer größeren *cis*-aktiven Sequenz im Bereich von *pol* (Heinkelein et al. 1998) und die gegenüber den Lentiviren verminderte Fähigkeit, in das Genom von Zellen integrieren zu können, die sich in bestimmten Ruhephasen des Zellzyklus befinden (Bieniasz et al. 1997; Trobridge et Russell 2004).

### **1.3 Antiretrovirale Substanzen**

#### **1.3.1 Möglichkeiten und Grenzen der Inhibition von Retroviren**

##### **1.3.1.1 Angriffspunkte von antiretroviralen Substanzen**

Über 20 unterschiedliche antiretrovirale Medikamente, die sich in erster Linie gegen HIV-1 richten, befinden sich heute im klinischen Einsatz (Rote Liste 2006). Man unterscheidet dabei je nach Angriffspunkt im retroviralen Replikationszyklus und Wirkmechanismus die nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), die nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), die Proteasehemmer (PI) sowie die noch recht neuen Fusionshemmer (*Tabelle 4*). An der Entwicklung weiterer Substanzen wird geforscht und einzelne Vertreter neuer Wirkstoffklassen wie beispielsweise Korezeptorantagonisten, Integraseinhibitoren

## Einleitung

und Maturationsinhibitoren stehen teilweise kurz vor ihrer Zulassung (Li et al. 2003; Idemyor 2005; Nair et Chi 2007).

Substanz	Abk.	Handelsname	Anmerkungen
<b>Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (Nukleosidanaloga, NRTIs)</b>			
Abacavir	ABC	Ziagen®	Guanosin-Analogon
Didanosin	DDI	Videx®	Inosin-Analogon (⇒Dideoxyadenosin); zweitältestes Präparat (1991)
Emtricitabin	FTC	Emtriva®	Cytidin-Analogon; seit 2003
Lamivudin	3TC	Epivir®	Cytidin-Analogon; auch bei HBV-Infektionen eingesetzt
Stavudin	4DT	Zerit®	Thymidin-Analogon
Tenofovir	TDF	Viread®	Nukleotidanalogen
Zalcitabin	DDC	HIVID®	Cytidin-Analogon; 1992-2006 (vom Markt)
Zidovudin	AZT	Retrovir®	Thymidin-Analogon; ältestes Präparat (1987); <i>siehe auch Kap. 1.3.2</i>
<b>Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)</b>			
Delavirdin	DLV	Rescriptor®	nur als Import
Efavirenz	EFV	Sustiva®	
Nevirapin	NVP	Viramune®	erster NNRTI (1996)
<b>Proteaseinhibitoren (PI)</b>			
Amprenavir	APV	Agenerase®	
Atazanavir	ATV	Reyataz®	seit 2004
Darunavir	DRV	Prezista®	bisher nur als Import, Zulassung erwartet
Fosamprenavir	FPV	Telzir®	Fortentwicklung von Amprenavir
Indinavir	IDV	Crixivan®	
Lopinavir/r	LPV	Kaletra®	in fester Kombination mit Ritonavir (Boosterung)
Nelfinavir	NFV	Viracept®	
Ritonavir	RTV	Norvir®	zur Boosterung anderer PIs
Saquinavir	SQV	Invirase®	erster PI (1995)
Tipranavir	TPV	Aptivus®	
<b>Fusionsinhibitoren</b>			
Enfuvirtide	T-20	Fuzeon®	seit 2003; Kosten/Jahr >24000 €; s.c.-Präparat
<b>Integraseinhibitoren</b>			
Raltegravir	RGV	Isentress®	seit 2007 Expanded-Access-Programm
<b>Korezeptorantagonisten</b>			
Maraviroc	MVC	Celsentri®	seit 2007 Expanded-Access-Programm; CCR5-Inhibitor
<b>Maturationsinhibitoren</b>			
Beviramat			Phase-IIa-Studien erfolgreich

**Tabelle 4: Antiretrovirale Medikamente** (Auswahl; erweitert und verändert nach <http://hiv.net/2010/haart/klassen.htm>)

NNRTIs wie Efavirenz oder Nevirapin binden direkt und nicht kompetitiv in der Nähe des aktiven Zentrums der RT von HIV-1 und verhindern die weitere Polymerisation (Spence et al. 1995). Dagegen stellen NRTIs Analoga der

normalerweise von der viralen RT genutzten Nukleoside dar und werden nach intrazellulärer Phosphorylierung kompetitiv zu den normalerweise verwendeten dNTPs in die virale DNA eingebaut (Mitsuya et al. 1985). Da NRTIs kein normales 3'-OH aufweisen, führt dies zum Kettenabbruch.

### **1.3.1.2 Resistenzentwicklung**

Begünstigt durch den hohen Turnover von HIV und die hohe Fehlerrate der retroviralen RT entstehen in einem infizierten Individuum ständig neue Virusvarianten (sog. Quasispezies), aus denen unter antiretroviraler Medikation resistente Formen selektiert werden (Meyerhans et al. 1989; Coffin 1995; Najera et al. 1995; Cornelissen et al. 1997; Mansky 1998). Resistenzen entwickeln sich bei Monotherapie innerhalb kurzer Zeit, weshalb eine solche Therapie heute obsolet ist und stattdessen im Rahmen der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) meistens drei Präparate kombiniert werden, z. B. zwei NRTIs mit einem NNRTI oder einem PI (Cameron et al. 1998; Kirk et al. 1998; van Leeuwen et al. 2003).

Bei manchen Substanzen genügt schon eine einzelne Mutation für eine hochgradige Resistenz, so z. B. bei Lamivudin (3TC) die Mutation M184V (Boucher et al. 1993; Schinazi et al. 1993; Tisdale et al. 1993). Relevante Resistenzen gegen andere Medikamente benötigen dagegen eine Akkumulation von mehreren Mutationen, so z. B. bei Abacavir (Harrigan et al. 2000; Brun-Vezinet et al. 2003). Neben der Resistenzvermittlung gegen das eingesetzte Medikament haben viele Mutationen in unterschiedlichem Ausmaß noch weitere Auswirkungen, so z. B. einen Einfluß auf die Replikationskompetenz des Virus, eine Kreuzresistenz gegenüber mehr oder weniger ähnlichen Substanzen oder auch eine (Re-)Sensibilisierung gegenüber bestimmten anderen Medikamenten (Nijhuis et al. 2001; Whitcomb et al. 2003).

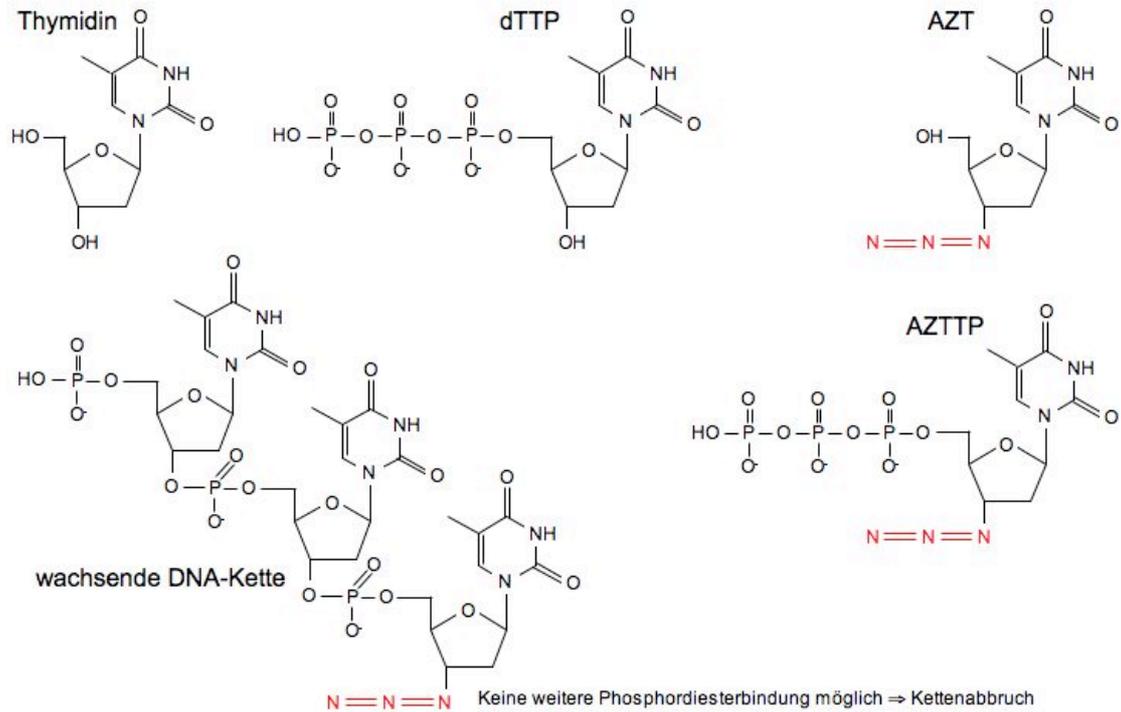
## **1.3.2 Zidovudin (AZT)**

### **1.3.2.1 Eigenschaften und Einsatz bei HIV-Infektion**

Zidovudin (ZDV) oder Azidothymidin (AZT), ursprünglich 1964 als Krebsmittel synthetisiert, war 1987 als Retrovir® das erste antiretrovirale Medikament im Einsatz gegen HIV und Aids (Mitsuya et al. 1985; Fischl et al. 1987). Zunächst wurde es als

Monotherapie, dann in Kombination mit anderen NRTIs eingesetzt (Fischl et al. 1990; Volberding et al. 1990; Eron et al. 1995; "Delta" 1996). Nach Einführung der Proteaseinhibitoren 1995 war es lange Zeit Komponente der meisten HAART-Schemata, z. B. in der klassischen Kombination mit 3TC und einem PI wie Indinavir oder Nelfinavir (Gulick et al. 1997; Hammer et al. 1997; Cameron et al. 1998; Saag et al. 2001; Gulick et al. 2003), mit 3TC und einem NNRTI wie Efavirenz (Staszewski et al. 1999; Robbins et al. 2003; Shafer et al. 2003) oder als Bestandteil einer Tripel-NRTI-Therapie (Staszewski et al. 2001; Matheron et al. 2003). Zidovudin bleibt als Retrovir® bzw. in den Kombinationspräparaten Combivir® (AZT+3TC) und Trizivir® (AZT+3TC+ABC) auch nach 20 Jahren ein wichtiges Element in der Behandlung von HIV-Infektionen, wenngleich es langsam etwas an Bedeutung verlieren zu scheint, da es sich im Vergleich mit neueren NRTIs in gewissen Aspekten als etwas ungünstiger erweist und somit manch moderne HAART kein AZT mehr enthält (DeJesus et al. 2004; Gallant et al. 2006; Pozniak et al. 2006).

Azidothymidin, oder genauer 3'-Azido-3'-Deoxythymidin, ist ein Thymidinanalogon, bei dem sich an der 3'-Position des Riboseringes eine Azidogruppe statt der Hydroxylgruppe befindet (Mitsuya et al. 1985). Wie die anderen Nukleosidanaloga wird es unverändert von der Zelle aufgenommen und intrazellulär schrittweise phosphoryliert. Das wirksame Triphosphatderivat (AZTTP) konkurriert mit dTTP an der entsprechenden Stelle in der RT und führt, wenn es statt dTTP in den wachsenden DNA-Strang eingebaut wird, wegen des fehlenden 3'-OHs zum Kettenabbruch.



**Abbildung 7: Thymidin und das Thymidinanalogon Zidovudin (AZT)**

Oben links das Nucleosid Thymidin und rechts daneben das entsprechende Triphosphatderivat, dTTP. Rechts oben AZT, dessen Azidogruppe am 3'-OH rot gekennzeichnet ist, und darunter das durch intrazelluläre Phosphorylierung entstehende wirksame AZTTP. Links unten eine DNA-Kette mit zwei Thymidinen und einem zum Kettenabbruch führenden AZT.

### 1.3.2.2 AZT-Resistenz-Mutationen bei HIV-1

Schon bald nach der Einführung von AZT wurde die Resistenzentwicklung von HIV-1 gegen dieses Medikament als Problem erkannt und einige Mutationen in dem für die RT kodierenden Bereich von *pol* konnten als ursächlich identifiziert werden (Larder et Kemp 1989; Larder et al. 1989; Kellam et al. 1992; Harrigan et al. 1996). Da diese Mutationen, die zu den Aminosäuresubstitutionen M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F und K219Q/E führen, auch unter Stavudin (D4T) selektiert werden (Calvez et al. 2002), bezeichnet man sie heute als Thymidinanaloga-Mutationen (TAMs). TAMs verleihen, gegebenenfalls im Zusammenhang mit weiteren

Mutationen, auch gegenüber anderen NRTIs eine gewisse Kreuzresistenz unterschiedlich starker Ausprägung (Whitcomb et al. 2003).

Eine hochgradige AZT-Resistenz wird durch das Vorhandensein von vier oder mehr TAMs erreicht, während die Resistenz von Einzelmutationen unterschiedlich ist (Whitcomb et al. 2003). M41L, D67N, L210W und K219Q/E vermitteln alleine jeweils keine oder nur eine sehr geringe Resistenz, sind aber relevant beim Auftreten mehrerer TAMs, während K70R bereits als solches eine moderate Resistenz verursacht und T215Y als Einzelmutation den stärksten Effekt hat und damit die Schlüsselmutation der Resistenz gegenüber Thymidinanaloga darstellt (Larder et al. 1991b; Kellam et al. 1992; de Jong et al. 1996; Harrigan et al. 1996). TAMs haben unterschiedlichen Einfluss auf die virale Fitness (Harrigan et al. 1998; Hu et al. 2006) und werden bevorzugt in bestimmten Kombinationen gefunden, nämlich im TAM-1-Muster T215Y mit M41L und L210W oder im TAM-2-Muster T215F mit D67N, K70R und K219Q (Yahi et al. 1999; Hanna et al. 2000; Marcelin et al. 2004). Dabei treten die Mutationen oft in bestimmten Abfolgen auf, beispielsweise handelt es sich bei K70R um eine frühe Mutation, die von einer Mutation am Kodon 215 abgelöst wird, während sich D67N und K219Q/E meist erst nach längerer Therapie entwickeln (Boucher et al. 1992; Cleland et al. 1996; de Jong et al. 1996; Hanna et al. 2000). Manche Kombinationen von TAMs treten kaum oder gar nicht auf und haben negative Auswirkungen auf die virale Replikationskompetenz, so etwa L210W und K70R (Yahi et al. 2000) oder M41L und K70R in Abwesenheit weiterer TAMs (Jeeninga et al. 2001).

Besonders in der Kombinationstherapie mit bestimmten NRTIs wie DDI kommt es unter AZT gelegentlich auch zu einem anderen Muster an Mutationen, dem Q151M-Komplex. Zu diesem zählt man A62V, V75I, F77L, F116Y und als Schlüsselmutation Q151M (Shirasaka et al. 1995). Diese Mutationen finden sich bei HIV-1 nur in etwa 5% der Fälle, während sie bei HIV-2 den bevorzugten Pfad für die Resistenzentwicklung darzustellen scheinen (Boyer et al. 2006).

Neben den beschriebenen TAMs und dem Q151M-Komplex gibt es noch eine Anzahl weiterer Mutationen, die Einfluss auf das Ansprechen von HIV auf AZT in der HAART haben. E44D, V118I und vermutlich eine Vielzahl weiterer Mutationen etwa erhöhen bei gemeinsamen Auftreten mit TAMs die AZT-Resistenz von HIV (Hanna et al. 2000; Svicher et al. 2006). Dagegen führen andere Mutationen, die unter

Therapie mit anderen NRTIs oder NNRTIs auftreten, zu einer (Re-)Sensitivierung gegenüber AZT. Zu nennen sind hier beispielsweise K65R, das besonders unter Abacavir (ABC) und Tenofovir (TDF) auftritt oder die Schlüsselmutation der 3TC-Resistenz im aktiven Zentrum der RT, M184V (Naeger et al. 2001; Whitcomb et al. 2003; White et al. 2005).

### **1.3.2.3 Mechanismen der AZT-Resistenz bei HIV**

Prinzipiell können Mutationen der RT auf zwei verschiedenen Wegen eine Resistenz gegenüber NRTIs vermitteln. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die RT das NRTI-Triphosphat vom dNTP unterscheidet und es vermindert einbaut. Dieser Mechanismus der sterischen Inhibition ist für die Resistenz gegenüber 3TC bei der M184V-Mutation im aktiven Zentrum verantwortlich und auch der Q151M-Komplex wirkt auf diese Weise (Sarafianos et al. 1999; Deval et al. 2002).

Die durch TAMs vermittelte AZT-Resistenz dagegen beruht auf einer selektiven Exzision des bereits eingebauten AZT, nicht mittels einer eigenen Nukleaseaktivität, sondern gewissermaßen durch eine Umkehrung des Polymerisationsvorganges mit ATP als Pyrophosphatdonor (Meyer et al. 1998; Meyer et al. 1999; Boyer et al. 2001; Sarafianos et al. 2002).

### **1.3.2.4 Wirksamkeit von AZT bei Foamyviren**

Zidovudin ist der einzige NRTI, der PFV in ähnlichen Dosen wie HIV gesichert inhibiert (Rosenblum et al. 2001; Rinke et al. 2002). Die  $IC_{50}$ , also die Konzentration, unter der sich eine Inhibition von 50% zeigt, wird dabei mit 0,01 bis 0,1  $\mu\text{M}$  angegeben (Santillana-Hayat et al. 1996; Rosenblum et al. 2001; Yvon-Groussin et al. 2001). Die Fähigkeit von AZT, die reverse Transkription in Foamyviren zu hemmen, hat man sich bei der Frage nach dem funktionellen Genom zu Nutze gemacht und schließlich damit zeigen können, dass es sich wohl um DNA und nicht um RNA handelt (Moebes et al. 1997; Yu et al. 1999). Andere Nukleosidanaloga wie 3TC, DDC, DDI, D4T, ABC und FTC zeigen eine Wirkung erst bei deutlich höherer Dosis und je nach Präparat und verwendetem Assay auch selbst dann nicht oder nur in geringer Ausprägung (Santillana-Hayat et al. 1996; Rosenblum et al. 2001; Yvon-

Groussin et al. 2001; Rinke et al. 2002). SFVmac und SVFcpz lassen sich ebenfalls effizient durch AZT inhibieren, scheinen aber im Ansprechen auf andere NRTIs einige Unterschiede aufzuweisen, was besonders in Anbetracht der engen Verwandtschaft von PFV und SFVcpz Fragen aufwirft (Rosenblum et al. 2001). FFV weist möglicherweise eine gewisse intrinsische Resistenz auf (Roy et al. 2003).

### **1.4 Zielsetzung**

Diese Arbeit umfasst eine erste Charakterisierung des AZT-resistenten Foamyvirusisolates SFVmac<sub>AZTres</sub>, das in Zellkultur selektiert wurde und das erste beschriebene Foamyvirus mit einer Resistenz gegenüber AZT darstellt. Zunächst soll eine genotypische Analyse dieses resistenten Foamyvirus durchgeführt werden, um mögliche Mutationen aufzuzeigen, die als Ursache für die Resistenz gegenüber AZT in Frage kommen. Im Weiteren wird untersucht, ob diese Mutationen tatsächlich für die Resistenz verantwortlich sind und welchen Beitrag die einzelnen Mutationen zur Resistenz leisten bzw. welche Eigenschaften im Sinne von Replikationsfähigkeit und Teilresistenz Viren mit Einzelmutationen und verschiedenen Kombinationen der gefundenen Mutationen aufweisen. Daneben soll im Sequenzvergleich mit den bei HIV bekannten Resistenzmutationen nach Analogien und Unterschieden gesucht werden. Schließlich sollen Mutationen, die SFVmac<sub>AZTres</sub> eine AZT-Resistenz verleihen, soweit möglich in einen infektiösen PFV-Klon eingebracht werden und untersucht werden, ob das generierte Virus ebenfalls eine AZT-Resistenz aufweist. Diese Arbeiten stellen Grundlage für weitere Untersuchungen dar, z. B. eine biochemische Charakterisierung des Mechanismus der AZT-Resistenz bei Foamyviren, und können einerseits dazu beitragen, das Wissen um allgemeine Mechanismen der Nukleosidanalogenresistenz bei Retroviren zu erweitern und andererseits helfen, die Eigenschaften der Reversen Transkriptase von Foamyviren zu verstehen, die bisher wenig untersucht sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Hybond™-ECL™-Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences
Sterilfilter 0,22 µm und 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Polyallomer Ultrazentrifugentubes	Beckmann
Qiashredder	Qiagen
BrightStar®-Plus-Nylonmembran	Ambion
Röntgenfilme X-ray Retina XBD	Fotochemische Werke GmbH

Darüberhinaus wurde standardmäßiges Plastikmaterial (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten jeweils unterschiedlicher Größen etc.) von den Firmen Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Hartenstein, Nunc und Roth bezogen.

#### 2.1.2 Chemikalien

Standardchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem, MBI Fermentas, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Wurde bei einem Produkt auf die Herkunft von einem bestimmten dieser Hersteller geachtet, ist dies an entsprechender Stelle im Methodenteil erwähnt, ebenso wie einzelne Chemikalien anderer Hersteller.

#### 2.1.3 Enzyme und Reaktionspuffer

SAP ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )	Roche
CIAP ( <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> )	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	NEB, MBI Fermentas
Taq-Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> )	MBI Fermentas
Pwo-Polymerase ( <i>Pyrococcus woesei</i> )	Peqlab

<i>Pfu</i> -Polymerase ( <i>Pyrococcus furiosus</i> )	Stratagene
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Ribonuklease A	Roche
Proteinase K	MBI Fermentas

Ein entsprechender Reaktionspuffer wird jeweils vom Hersteller mitgeliefert.

### 2.1.4 Kits

QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
NucleoBond® PC500	Macherey-Nagel
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Ambion
Polyfect® Transfection Reagent	Qiagen
Expand Long Template PCR System	Roche
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

### 2.1.5 Antibiotika und Virustatika

	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
<b>Antibiotika</b>		
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Penicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml	100 µg/ml
G418	100 mg/ml	1 mg/ml
<b>Virustatika</b>		
Zidovudin (Retrovir®, GlaxoSmithKline)	10 mg/ml	je nach Versuch

### 2.1.6 Antikörper

$\alpha$ -SFVmac/Pol	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das Pol-Antigen von SFVmac (BioGenes GmbH)
$\alpha$ -SFVmac/Gag	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das Gag-Antigen von SFVmac
goat- $\alpha$ -rabbit	kommerzieller, polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt (DAKO, #PO448)

### 2.1.7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Invitrogen
<i>E. coli</i> JM109	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Blue supercompetent cells	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Novagen

### 2.1.8 Virus

SFVmac <sub>AZT<sup>res</sup></sub>	AZT-resistentes SFVmac-Isolat, das durch zweimonatige Passage in Zellkultur gewonnen wurde, während die AZT-Konzentration bis auf 1 mM gesteigert wurde (Ottmar Herchenröder)
-------------------------------------	---

### 2.1.9 Zelllinien

293T	(HEK-)293-Zellen aus humanen embryonalen Nieren (Graham et al. 1977) mit stabiler Expression des großen T-Antigen von SV 40 (DuBridge et al. 1987)
BHK/LTR(PFV) <i>lacZ</i>	Hamsternierenfibroblasten (BHK-21, engl. <i>baby hamster kidney cells</i> ) mit einem <i>lacZ</i> -Gen unter Kontrolle der LTR von PFV (Schmidt et Rethwilm 1995)

BHK/LTR(SFVmac)*lacZ* BHK-21 mit einem *lacZ*-Gen unter Kontrolle der LTR von SFVmac (Roy et al. 2003)

### 2.1.10 Plasmide

#### provirale Konstrukte

pchHSRV2 Expressionsplasmid für ein PFV-Provirus auf der Basis von pHSRV2 (Schmidt et Rethwilm 1995), mit einem CMV-Promotor anstelle der U3-Region im 5'LTR (Moebes et al. 1997)

pSFV-1 Expressionsplasmid für ein SFVmac-Provirus (Mergia et Wu 1998)

pSK29 pSFV-1 ohne *KpnI*-Schnittstelle im Polylinker (Sylvia Kanzler)

pSK39 pSK29 mit den Pol-Mutationen S34 5T und E350K (Sylvia Kanzler)

pSK50 pSK29 mit der Pol-Mutation S345T (Sylvia Kanzler)

pSK51 pSK29 mit der Pol-Mutation E340K (Sylvia Kanzler)

#### sonstige Plasmide

pUC18 Fermentas

pCRII Invitrogen

pET28c Novagen

### 2.1.11 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei Invitrogen bestellt, mit sterilem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt und bei -20 °C gelagert. Für PCRs wurden kleinere Mengen mit 10 pmol/μl aliquotiert und eingefroren.

Oligo	5'-3' Sequenz	Bindungsstelle/ Verwendungszweck
#378	tatgagtatatttgctg	<i>pol</i> (PFV) sense Sequenzierprimer
#379	caagtcggcggcctataattaagg	<i>pol</i> (PFV) antisense Sequenzierprimer

<b>Oligo</b>	<b>5'-3' Sequenz</b>	<b>Bindungsstelle/ Verwendungszweck</b>
#385	agccactcttttaaaaattgcc	<i>pol</i> (PFV) sense Sequenzierprimer
#639	aagcaataatgctggcatggaata	<i>pol</i> (PFV) sense Sequenzierprimer
#1844	ccaccttactaccactttgggg	<i>pol</i> (PFV) antisense Sequenzierprimer
#1859	gagaaattcctatgtggattgg	<i>gag</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1860	ccagtgggctttaatttagttc	<i>gag</i> (SFVmac) antisense Sequenzierprimer
#1862	aggacaaaaccttagagtatcc	<i>gag</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1863	caggtcaaaatggatcctctac	<i>gag</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1864	taaccagcattgagcaatatgg	<i>pol</i> (SFVmac) antisense Sequenzierprimer
#1865	atgctggttatgtggtttcac	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1866	caggcttaagttgtaaaccattc	<i>pol</i> (SFVmac) antisense; Sequenzierprimer
#1867	gaaatcaatagctgaatgtttac	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1868	gttacattttcaagtgcttgatg	<i>pol</i> (SFVmac) antisense Sequenzierprimer
#1869	ctaggccacaaaaacaatatcc	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1870	gttctataaaagctatggacc	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1871	ccaccatcgaatggttatttac	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1886	ccccatggatcctctacaactcctcc	<i>pol</i> (SFVmac) sense; mutagener Primer zur Klonierung von pBK1 (fügt <i>Nco</i> I-Schnittstelle am <i>Pol</i> - Startcodon ein)

Oligo	5'-3' Sequenz	Bindungsstelle/ Verwendungszweck
#1891	gccgtcgacagtgcttgatgtgcttg	<i>pol</i> (SFVmac) antisense; mutagener Primer zur Klonierung von pBK1 (entfernt Pol-Stopcodon, fügt <i>Sall</i> -Schnittstelle ein)
#1892	gatgctgccagaatagtttctttg	<i>pol</i> (SFVmac) sense Primer für die Klonierung von pBK3
#1893	ggtctccaattagcagtttag	<i>pol</i> (SFVmac) antisense Primer für die Klonierung von pBK3
#1911	cgcgaaattaatagcactcac	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1912	gtggaagcagaagtactc	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1913	gccattatatacaattgttgct	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1914	taccctccagggtatccaa	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1915	ggtatgatctactacgtt	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1916	ggccaactagtcaggaga	<i>pol</i> (SFVmac) sense Sequenzierprimer
#1943	aggatccaatgattcctcttcagctgta	<i>pol</i> (PFV) sense Sequenzierprimer
#1944	tgtgtcgacttcatttttccaaatga	<i>pol</i> (PFV) antisense Sequenzierprimer
#1951	ccactagcccagtggtgcttt	<i>pol</i> (SFVmac) sense Mutageneseprimer (Protease D→A)
#1952	actgggctagtgagctac	<i>pol</i> (SFVmac) antisense Mutageneseprimer (Protease D→A)
#1954	ccagatggaaggtggag	<i>pol</i> (PFV) sense Sequenzierprimer

Oligo	5'-3' Sequenz	Bindungsstelle/ Verwendungszweck
#1955	gttttgggcagctgtaatg	<i>pol</i> (PFV) antisense Sequenzierprimer
#1956	ggtcgtggcctaacagac	<i>pol</i> (PFV) sense Sequenzierprimer
#1957	ctccatcagcaggatag	<i>pol</i> (PFV) sense Sequenzierprimer
#1989	ctagagctaatgcattaaatgatgacgtgtaattaattaagagtcggtac	Oligonukleotid zum Einfügen einer <i>PacI</i> - und <i>SwaI</i> -Schnittstelle in pUC18, sense
#1990	cgactctaattaattacacgcatcatttaaatgcattagct	Oligonukleotid zum Einfügen einer <i>PacI</i> - und <i>SwaI</i> -Schnittstelle in pUC18, antisense
#1991	cctgttcctaaaccagatggaatatggagaatggtattag	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (R211I)
#1992	ctaataccattctccatattccatctggttaggaacagg	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (R211I)
#1993	ggatatgtagtatctttgaaaaaatcaaaaattggtcaaaaaactgtag	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (E350K)
#1994	ctacagtttttgaccaattttgatttttcaaagatactacatatcc	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (E350K)
#1995	gtacaaaacctgatggtatatggagaatggtgttgac	<i>pol</i> (SFVmac) sense Mutageneseprimer (K211I)
#1996	gtccaacaccattctccatataccatcaggttttgtag	<i>pol</i> (SFVmac) antisense Mutageneseprimer (K211I)
#1997	ctacaggcaggatatgtagtatctttggagaaatcagaaattggtc	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (K347E)
#1998	gaccaatttctgatttctcaaagatactacatatcctgcctgtag	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (K347E)
#1999	gtatcctgttcctaaaccaaattggaaggtggagaatgg	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (D209N)

Oligo	5'-3' Sequenz	Bindungsstelle/ Verwendungszweck
#4001	ccattctccacctccattggtttaggaacaggatac	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (D209N)
#4020	ctacaggcaggatatgtagtaacttgaaaaaatcagaaattggc	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (S345T)
#4021	gaccaatttctgatttttcaaagttactacatatcctgcctgtag	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (S345T)
#4022	ctacaggcaggatatgtagtaacttgaaaaaatcaaaaattggc	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (S345T, E350K)
#4023	gaccaatttttgatttttcaaagttactacatatcctgcctgtag	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (S345T, E350K)
#4024	ctacaggcaggatattatgtatctttgaaaaaatcagaaattggc	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (V343Y, K347Q)
#4025	gaccaatttctgatttttgcaaagatacataatatcctgcctgtag	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (V343Y, K347Q)
#4026	ctacaggcaggatattttgtatctttgaaaaaatcagaaattggc	<i>pol</i> (PFV) sense Mutageneseprimer (V343F)
#4027	gaccaatttctgatttttcaaagatacaaaatatcctgcctgtag	<i>pol</i> (PFV) antisense Mutageneseprimer (V343F)
#4041	ctatagagaggccaataaaaactattccattaatagcagcac	<i>pol</i> (SFVmac) sense Mutageneseprimer (I224T)
#4042	gtgctgctattaatggaatagttttattgacctctctatag	<i>pol</i> (SFVmac) antisense Mutageneseprimer (I224T)

**Tabelle 5: verwendete Oligonukleotide**

## 2.1.12 Größenmarker

### Proteinmarker

RPN Rainbow Marker          Amersham Biosciences

### DNA-Marker

$\lambda$ -*Hind*III                      eigene Herstellung

$\lambda$ -*Pst*I                              eigene Herstellung

Wird DNA des Phagen  $\lambda$  mit *Hind*III oder *Pst*I verdaut, entstehen DNA-Fragmente charakteristischer Größe. Da die erwarteten Größen dieser Fragmente bekannt sind, können sie in einer Agarosegelelektrophorese als Größenstandard verwendet werden. Für die Herstellung von 1 ml Marker werden 333  $\mu$ l  $\lambda$ DNA, 10  $\mu$ l *Hind*III bzw. *Pst*I, 50  $\mu$ l jeweiliger Restriktionsnukleasenpuffer und Aqua dest. ad 500  $\mu$ l über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 167  $\mu$ l 6x BPB sowie 333  $\mu$ l TE zugegeben und der Marker aliquotiert.

## 2.1.13 Puffer und Lösungen

### 2.1.13.1 Bakterienkultur

#### 5x LB

LB Broth Base Lennox L      100 g

NaCl                                  25g

$\alpha$ -D-Glucose                      5 g

H<sub>2</sub>O                                      ad 1000 ml

autoklavieren, ggf. Antibiotikum zugeben

#### SOA

NaCl                                  10 mM

in 1x LB

SOB

KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
in SOA	

SOC

Glucose	20%
in SOB	

LB-Agar

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

autoklavieren, abkühlen auf etwa 60° C, Antibiotikum zugeben, Lösung in Petrischalen gießen, erstarren lassen und bei 4° C aufbewahren.

**2.1.13.2 Analyse und Klonierung von DNA**

Transformationspuffer 1

Kaliumacetat	30 mM
RbCl <sub>2</sub>	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
Glycerin	15%

Mit 10% Essigsäure auf pH 5,8 einstellen

Transformationspuffer 2

MOPS	10 mM
RbCl <sub>2</sub>	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glycerin	15%

mit 1 M KOH auf pH 6,5 einstellen und 0,2 µm sterilfiltrieren

Plasmidpräparationslösung 1

Glucose	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Tris pH 8,0	25 mM

Plasmidpräparationslösung 2

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Plasmidpräparationslösung 3

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

mit Eisessig auf pH 5,4 einstellen

Lysis Puffer

Tris	100 mM
EDTA	50 mM
SDS	0,2%
NaCl	200 mM
Proteinase K	10 µl/ml, jeweils vor Gebrauch frisch zugeben

TE/RNase

RNase A	100 µg/ml
---------	-----------

in 0,1x TE

10x Hybridisierungspuffer

NaCl	1M
Tris pH 8,0	100 mM
EDTA pH 8,0	1mM

in Aqua dest.

Tris/MgCl<sub>2</sub>

Tris 200 mM

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

in Aqua dest.

autoklavieren

6x DNA-Probenpuffer (6x BPB)

Sucrose 40%

Bromphenolblau 0,125%

in Aqua dest.

autoklavieren

50x TAE (Tris-Azetat/EDTA)

Tris 2 M

Essigsäure 5,71%

EDTA pH 8,0 50 mM

in Aqua dest.

**2.1.13.3 Zellkultur und Zellbiologie**

MEM (Minimal Essential Medium) mit 5% bzw. 10% FCS (Fetal Calf Serum)

FCS (Biochrom, Berlin) 5% bzw. 10%

Glutamat 0,03%

Penicillin 100 mg/l

Streptomycin 100 mg/l

in MEM (Hausmedium; enthält 9,6 g/l Invitrogen #41500-083 und 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>)

ATV

NaCl 137 mM

KCl 5,4 mM

D-Glucose 5 mM

NaHCO<sub>3</sub> 70 mM

Trypsin 500 mg/l

PEI (Polyethylenimin)

PEI (Polyscience) 1 mg/ml

in Aqua dest.

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

2x HBS

NaCl 280 mM

KCl 10 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 1,5 mM

Hepes 50 mM

Dextrose 12 mM

in Aqua dest.

pH 7,05 mit NaOH einstellen

2 M CaCl<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub> 2 M

in Aqua dest.

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

0,5 M Natriumbutyrat

0,5 M Natriumbutyrat 0,5 M

in sterilem PBS

0,2 µm sterilfiltrieren

PBS(+)

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 4,3 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM

CaCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 1,5 mM

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 1 mM

lacZ-Färbelösung

Ferricyanid	4 mM
Ferrocyanid	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
X-Gal	0,4 g/l

in PBS

Färbelösung jedes Mal frisch ansetzen

lacZ-Fixierlösung

Formaldehyd	2%
Glutaraldehyd	0,2%

in PBS

**2.1.13.4 Proteinbiochemie**

RIPA Puffer

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

20% Sucroselösung

Sucrose	20%
Tris pH 8,0	100 mM
NaCl	100 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

2x Probenpuffer für Proteinproben (2x PPP)

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

Gelpuffer

Tris Base	3 M
SDS	0,3%

pH 8,45 mit HCl einstellen

5x Kathodenpuffer

Tris	500 mM
Tricine	500 mM
SDS	0,5%

10x Anodenpuffer

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

Blotpuffer

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

PBS-Tween

Tween 20	0,5%
----------	------

in PBS(-)

PBS(-)

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

4% Milchpulver

Magermilchpulver 4%

In PBS(-)

**2.1.13.5 Standardlösungen und Puffer**

1 M Tris pH 8,0

Tris 1 M

pH 8,0 einstellen mit HCl

0,5 M EDTA pH 8,0

0,5 M EDTA

in Aqua dest.

pH 8,0 mit NaOH einstellen

autoklavieren

10% SDS

10% SDS

in Aqua dest.

auf etwa 68 °C erhitzen

pH 7,2 mit HCl einstellen

1xTE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung von transformationskompetenten *E. coli*

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.1 und 2.1.13.2)

Als transformationskompetent werden Bakterien bezeichnet, die durch eine entsprechende Behandlung die Eigenschaft besitzen, mit hoher Effizienz Plasmid-DNA durch ihre Zellmembran aufnehmen zu können (Transformation, siehe 2.2.1.2). Eine Möglichkeit kompetente Bakterien herzustellen, besteht in der Behandlung mit Calciumchlorid (Mandel et Higa 1970), das auf noch ungeklärte Weise die Permeabilität der Bakterienmembran für Fremd-DNA erhöht.

- Inkubation einer Bakterienvorkultur über Nacht bei 37 °C im Schüttler (180 rpm)
- 100 ml LB mit 1 ml der Vorkultur animpfen
- Bakterien bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,2-0,3 kultivieren (37 °C, 180 rpm)
- 5 min auf Eis inkubieren
- Pelletierung bei 2500 rpm und 4 °C für 10 min
- Überstand verwerfen, Pellet in 40 ml Transformationspuffer I aufnehmen
- Pelletierung bei 2500 rpm und 4 °C für 10 min
- Überstand restlos absaugen, Pellet in 40 ml Transformationspuffer II aufnehmen
- 15 min auf Eis inkubieren
- aliquotieren, in flüssigen Stickstoff, Lagerung bei -80 °C

#### 2.2.1.2 Transformation von DNA in kompetente *E. coli*

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.1)

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in kompetente Bakterien eingebracht. Dort kann sie vermehrt und in späteren Arbeitsschritten durch eine Plasmidpräparation aufgereinigt werden (siehe 2.2.1.3).

Die klassische Transformation wurde verwendet, wenn das Ausgangsmaterial einer Ligation (siehe 2.2.1.11) oder Mutagenese (siehe 2.2.1.15) entstammte, also in vergleichsweise niedriger Konzentration vorlag. Als Bakterien wurden in diesem Falle

*E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet, die sich durch eine hohe Transformationsrate auszeichnen, bei allerdings eher geringer Plasmidausbeute. Alternativ wurden aus einer Mutagenese stammende Reaktionsprodukte auch in *E. coli* XL1-Blue nach einem eigenen Protokoll transformiert. Auch dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Transformationsrate aus. Die Quick-Transformation dagegen benötigt deutlich weniger Zeit. Als Bakterienstämme wurden dabei *E. coli* JM109 verwendet, die eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA erzielen (Pope et Kent 1996). Jedoch ist die Transformation weniger effizient und kann daher nur angewandt werden, wenn das Ausgangsprodukt bereits aufgereinigt und konzentriert ist, also einer Plasmidpräparation entstammt.

### ***Klassische Transformation***

- ein Aliquot Bakterien (DH5 $\alpha$ ) auf Eis auftauen
- 100  $\mu$ l Bakterien und 10  $\mu$ l Ligationsansatz vorsichtig mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 90 sec Hitzeschock bei 42 °C
- 3 min auf Eis inkubieren
- ad 1 ml 1x LB (ohne Antibiotikum)
- 1 h bei 37 °C inkubieren
- 3 min bei 5000 U/min zentrifugieren, vom Überstand etwa 850  $\mu$ l verwerfen
- Pellet im Rest resuspendieren, 50-100  $\mu$ l auf vorgewärmte Agarplatte (mit entsprechendem Antibiotikum) austreichen
- über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubieren

### ***Transformation in XL1-Blue***

- Bakterien auf Eis auftauen
- 50  $\mu$ l Bakterien (XL1-Blue Supercompetent cells) und 1  $\mu$ l Reaktionsansatz (aus Mutagenese, siehe 2.2.1.15) vorsichtig mischen
- 30 min auf Eis kühlen
- 45 sec Hitzeschock bei 42 °C
- 2 min auf Eis inkubieren
- 500  $\mu$ l SOC dazugeben
- 1 h bei 37 °C inkubieren

- 250 µl auf Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausstreichen
- über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubieren

### ***Quick-Transformation***

- Bakterien (JM109) auf Eis auftauen
- 100 µl Bakterien und 0,5 µg Plasmid vorsichtig mischen
- 10 min auf Eis kühlen
- ausstreichen auf vorgewärmte Agarplatte (mit entsprechenden Antibiotikum)
- über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubieren

### **2.2.1.3 Plasmidpräparation aus *E. coli***

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.1 und 2.1.13.2)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus einer Kultur von transformierten Bakterien (siehe 2.2.1.2) erfolgt durch das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim et Doly 1979). In diesem Verfahren werden Proteine und DNA durch Zugabe von SDS und NaOH denaturiert, anschließend Natriumacetat zugegeben, die Plasmid-DNA von der präzipitierten chromosomalen DNA und den Proteinen durch Zentrifugation getrennt und schließlich durch Ethanol-fällung konzentriert und gereinigt.

### ***Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (Minipräp)***

- eine Einzelkolonie transformierter Bakterien in 2 ml 1x LB (mit je nach Plasmid entsprechendem Antibiotikum) animpfen
- über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubieren
- ca. 1,5 ml der Übernachtskultur 1 min bei 14000 U/min zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 100 µl Plasmidpräparationslösung 1 zum Pellet dazugeben, mischen, 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 100 µl Plasmidpräparationslösung 2 dazugeben, mischen, 5 min bei Raumtemperatur
- 150 µl Plasmidpräparationslösung 3 dazugeben, mischen, ca. 15 min auf Eis
- 15 min bei 14000 U/min zentrifugieren

- Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen, in das zuvor 1 ml Ethanol vorgegeben wurde, 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 15 min bei 13000 U/min zentrifugieren, Überstand verwerfen
- zugeben von 500 µl 70%igen Ethanols, 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Überstand verwerfen, Pellet trocknen
- Resuspension in 50 µl TE/RNase

### ***Plasmidpräparation aus E. coli im präparativen Maßstab (Maxipräp)***

Bei einer Maxipräp wird im Gegensatz zur Minipräp eine größere Menge DNA in reinerer Form gewonnen. Dazu wird eine Einzelkolonie Bakterien in 150 ml 1x LB angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Für die am nächsten Tag folgende Aufreinigung wurde der *Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500* von Macherey-Nagel verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Der alkalischen Lyse folgt in diesem Protokoll die Aufreinigung der Plasmid DNA über Anionenaustauschsäulen.

Nach der Resuspendierung der aufgereinigten DNA in 200 µl H<sub>2</sub>O erfolgte eine Vermessung der DNA-Konzentration und durch Zugabe der errechneten Menge an nötigem H<sub>2</sub>O die Einstellung auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl.

### **2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen**

Genomische DNA aus eukaryotischen Zellen, und damit auch integrierte retrovirale DNA, kann nach dem folgenden Protokoll extrahiert werden, um sie dann mittels PCR zu amplifizieren oder zu sequenzieren (siehe 2.2.1.12 und 2.2.1.14).

- Zellen mit PBS waschen
- Zugabe von 3 ml Lysis Puffer und Zell-Lyse für ca. 3 min
- über Nacht bei 55 °C im Wasserbad inkubieren
- Fällung der DNA durch Zugabe von 3 ml Isopropanol und kräftiges Schütteln
- Entnahme der DNA mittels Glasangel
- Waschen mit 30 µl 70%igem Ethanol
- Trocknen der DNA und Aufnahme in 200 µl 0,1x TE
- über Nacht bei 55 °C lösen
- Resuspendieren, Lagerung bei 4 °C

### **2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese**

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.2)

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente, die beispielsweise aus einer PCR (siehe 2.2.1.12) oder einem Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.9) stammen, der Größe nach aufgetrennt. Dies kann analytisch oder präparativ genutzt werden. Zunächst wird Agarose 0,5- bis 3-prozentig (höherprozentig bei kleineren Fragmenten) in 1x TAE (z. B. 100 ml) gelöst, aufgeköcht und im noch flüssigen Zustand Ethidiumbromid (1 µg/ml) dazugegeben. Nach dem Aushärten des Gels werden die DNA-Proben (20-50 µl) mit einem Bromphenolblau-haltigen Ladepuffer (6x BPB) versetzt und zusammen mit einem DNA-Größenstandard ( $\lambda$ HindIII oder  $\lambda$ PstI) auf das Gel geladen. Als Laufpuffer in der Gelelektrophoresekammer dient 1x TAE. Eine Spannung von 30-90 mV wird angelegt und die negativ geladene DNA wandert zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller als große sind und die DNA dadurch der Größe nach aufgetrennt wird. Die DNA wird dann mit Hilfe des interkalierenden Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Bandenmuster fotografiert, oder die gewünschten DNA-Banden ausgeschnitten und weiter verarbeitet (siehe 2.2.1.6)

### **2.2.1.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Unter schwachem UV-Licht sichtbar gemachte DNA-Banden können mit einem Skalpell ausgeschnitten und dann über Säulen aufgereinigt werden. Hierfür wurde der *QIAquick® Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.2.1.7 Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Um die Konzentration von DNA in einer wässrigen Lösung zu bestimmen, wurde die Extinktion der Probe (z. B. 1:300 verdünnt) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA, gemessen. Dabei entspricht eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA.

Zur Bestimmung der Reinheit dient der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$ . Der Wert sollte 1,8 bis 2,0 betragen. Ein höherer Wert deutet auf Verunreinigung durch RNA hin, ein niedriger auf Verunreinigung durch Proteine oder Phenol.

### 2.2.1.8 Hybridisierung von Oligonukleotiden

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.2)

Zwei Oligonukleotide, die einander bis auf eventuelle kurze Überhänge komplementär sind, können zu einem kurzen Doppelstrang hybridisiert werden. Der so entstandene DNA-Doppelstrang kann dann in einen aufgeschnittenen Vektor ligiert werden (siehe 2.2.1.11), um dort beispielsweise neue Restriktionsschnittstellen einzufügen.

#### Reaktionsansatz

Oligonukleotid 1 (100 pmol/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
Oligonukleotid 2 (100 pmol/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
10x Hybridisierungspuffer	5 $\mu$ l
Aqua dest.	ad 50 $\mu$ l
5 min im Wasserbad bei 92 °C	
über Nacht im Wasserbad abkühlen lassen	

### 2.2.1.9 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte, für die jeweilige Restriktionsendonuklease spezifische, palindromische DNA-Sequenzen und spalten die DNA innerhalb oder in der Nähe dieser Sequenzen. Wird die DNA dabei an den komplementären Strängen um einige Nukleotide versetzt gespalten, entstehen in der Folge DNA-Fragmente mit 3'- bzw. 5'-Überhängen (engl. *sticky ends*). Wird die DNA an beiden Strängen an derselben Stelle geschnitten, entstehen keine Überhänge (engl. *blunt ends*). Dabei sind die verschiedenen Restriktionsendonukleasen in unterschiedlichen Puffern und bei unterschiedlichen Temperaturen optimal aktiv. Ist ein gleichzeitiger Verdau mit zwei Enzymen nötig, aber wegen unterschiedlicher optimaler Reaktionstemperatur oder -puffer nicht möglich, wurde zunächst der Verdau im weniger konzentrierten Puffer durchgeführt.

Analytischer Restriktionsverdau

Restriktionsendonuklease	0,5-1 µl
DNA	0,5-2 µg
Puffer (10x)	2 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

Präparativer Restriktionsverdau

Restriktionsendonuklease	1-2 µl
Puffer (10x)	5 µl
DNA	5 µg
Aqua dest.	ad 50 µl

Inkubation bei für das jeweilige Restriktionsenzym optimaler Temperatur für 2 h bis über Nacht je nach Herstellerangaben.

### **2.2.1.10 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten**

Um bei einer Ligation (siehe 2.2.1.11) zu verhindern, dass die Enden des linearisierten Vektors miteinander ligiert werden, können die 5'-Enden dephosphoryliert werden. Hierzu wurde in dieser Arbeit alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) oder Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP) verwendet. Die Enzyme sind in beinahe allen Reaktionspuffern aktiv, weshalb auf Zugabe des mitgelieferten Reaktionspuffers meist verzichtet wurde. SAP kann bei 65 °C sehr effektiv inaktiviert werden.

- 1-2 µl SAP oder CIAP zum vorhandenen Reaktionsansatz
- 20-30 min bei 37 °C inkubieren
- 10 min inaktivieren (SAP bei 65 °C, CIAP bei 75 °C)
- auf Eis abkühlen

### 2.2.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei oder mehr DNA-Fragmente miteinander verknüpft, indem unter Katalyse der T4-Ligase zwischen dem 3'-OH-Ende der einen DNA und dem 5'-Phosphatende der anderen eine Phosphodiesterbindung ausgebildet wird. Dabei haben die Enden der DNA-Fragmente entweder zueinander komplementäre kurze einsträngige Überhänge (engl. *sticky ends*) oder keine Überhänge (engl. *blunt ends*). Der geöffnete Vektor kann zuvor einer Dephosphorylierung unterzogen werden, um die Selbstligation zu verhindern.

#### Reaktionsansatz

T4-Ligase	1 µl
Ligationspuffer (10x)	2 µl
1. DNA-Fragment (geöffneter Vektor)	10-500 ng
2. DNA-Fragment (Insert)	in zwei- bis vierfachem molarem Überschuß zum Vektor
Aqua dest.	ad 20 µl
Inkubation bei 14 °C mindestens vier Stunden oder über Nacht	

### 2.2.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können von einer Ausgangs-DNA (engl. *template*) DNA-Fragmente in vitro amplifiziert werden (Saiki et al. 1985; Saiki et al. 1988). Dabei wird die DNA zunächst denaturiert, so daß sie einzelsträngig vorliegt. Im nächsten Schritt lagert sich ein Paar von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) über komplementäre Basenpaarung an die Zielsequenz (engl. *annealing*). In der folgenden Elongationsphase synthetisiert eine thermostabile Polymerase das DNA-Fragment zwischen den Primern. Dieser Reaktionszyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird mehrfach (typischerweise 20-35mal) wiederholt, so dass sich die Zielsequenz exponentiell vermehrt. Nach dem Durchlauf der Zyklen kann sich noch eine längere Elongationsphase anschließen, um nicht fertig gestellte Amplimere vollständig zu polymerisieren.

Es können auch Primer verwendet werden, die sich in einigen Nukleotiden von der

Ausgangssequenz unterscheiden. So können Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder Mutationen in die Ausgangs-DNA eingefügt werden.

Für die PCR können unterschiedliche Polymerasen verwendet werden. Die *Taq*-Polymerase ist kostengünstig und zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität aus. Jedoch verfügt sie über keine Korrekturlesefunktion (3'-5' Exonukleaseaktivität) und hat daher eine hohe Fehlerrate. Polymerasen mit 3'-5' Exonukleaseaktivität wie *Pwo* oder *Pfu* weisen eine deutlich geringere Fehlerrate auf und wurden daher bevorzugt eingesetzt, wenn es bei der Synthese der DNA auf eine hohe Zuverlässigkeit ankam.

Für die Synthese von langen DNA-Fragmenten wurde auch das *Expand Long Template PCR System* von Roche eingesetzt, in dem ein Mix aus *Taq* und *Tgo*, einer weiteren Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität, eingesetzt wird.

Die optimale Annealing-Temperatur hängt von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer ab. Sie sollte etwa 5 °C unter dem T<sub>m</sub>-Wert liegen, der durch folgende Formel abgeschätzt werden kann:

$$T_m = 4 \text{ °C} \times (G + C) + 2 \text{ °C} \times (A + T)$$

Reaktionsansatz (auf Eis)

DNA	10-500 ng
Polymerase	1-2 µl
dNTPs	1 µl
Primer <i>sense</i> (10-100 pmol/µl)	1-5 µl
Primer <i>antisense</i> (10-100 pmol/µl)	1-5 µl
10x Reaktionspuffer komplett	1/10 Volumen des Gesamtansatzes
Aqua dest.	ad 25-50 µl

Programm im Thermocycler

(1) 95 °C	2 min	
(2) 95 °C	15-30 sec	(Denaturierung)
(3) 45-60 °C	30-60 sec	(Annealing)
Temperatur abhängig von verwendeten Oligonukleotiden		
(4) 68-72 °C	1-10 min	(Elongation)
Temperatur abhängig von verwendeter Polymerase, Dauer abhängig von Größe		

der Zielsequenz (Syntheserate von ca. 1 kB/min)	
Wiederholung Schritt (2) bis (4) 20 bis 35mal	
(5) 68-72 °C	5-15 min
(6) 4 °C	unbegrenzt

### 2.2.1.13 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die aus der PCR erhaltene DNA muß je nach weiterem Verwendungszweck noch aufgereinigt werden. Hierzu wurde der *Qiaquick PCR Purification Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.1.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA basiert auf der sogenannten Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977). Dabei wird ähnlich wie in einer PCR verfahren, jedoch wird nur ein Primer eingesetzt und statt einem Teil der dNTPs werden mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs eingesetzt. Der Einbau eines ddNTPs, der zufällig und damit an jeder Stelle geschieht, führt zu einem Kettenabbruch. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden im Folgenden aufgetrennt und die Farbstoffe durch Laser angeregt und detektiert. Somit kann festgestellt werden, welches Didesoxynukleotid beim Amplifikat jeder Länge zum Abbruch führte und dadurch die Sequenz des Ausgangsmaterials bestimmt werden.

Für die Sequenzierung wurde der *Big Dye Cycle Sequencing Kit version 1.1* verwendet.

#### Reaktionsansatz

Primer (10 pmol/µl)	0,33 µl
DNA (1µg/µl)	0,5 µl
Tris/MgCl <sub>2</sub>	1 µl
<i>Big Dye</i>	1 µl
Aqua dest.	2,17 µl

Programm im Thermocycler

(1) 95 °C	20 sec
(2) 50 °C	15 sec
(3) 60 °C	4 min
Wiederholung Schritt (1) bis (3) 25mal	
(4) 4 °C	unbegrenzt

Das Reaktionsprodukt wurde anschließend im Haus aufgereinigt und sequenziert.

### **2.2.1.15 Zielgerichtete Mutagenese**

Ziel einer zielgerichteten Mutagenese (engl. *site directed mutagenesis*) ist es, einzelne Basen einer Ausgangssequenz durch andere auszutauschen. In dieser Arbeit wurde dies durch Polymerasekettenreaktionen erreicht, bei denen Primer verwendet wurden, die sich an der gewünschten Stelle in beabsichtigter Weise von der Ausgangssequenz unterscheiden.

#### ***Zweistufige Mutagenese mit vier Primern***

Bei diesem Verfahren wurden zunächst mittels PCR zwei Amplifikationen durchgeführt. Einer der Primer enthielt dabei jeweils die gewünschte Mutation (am 5'-Ende), der andere befand sich in der einen Reaktion proximal, in der anderen distal davon. Die beiden entstandenen Amplifikate, die sich im Bereich der Mutation überlappen, wurden im Anschluß aufgereinigt und als Ausgangs-DNA in einer nächsten PCR eingesetzt. Als Primer kamen dabei der proximale und der distale aus dem ersten Schritt zum Einsatz. Insgesamt entstand ein DNA-Amplifikat, das vom proximalen bis zum distalen Primer reichte, mit der gewünschten Mutation in der Mitte.

#### ***Mutagenese einer Plasmid-DNA mit zwei Primern und anschließendem DpnI-Verdau***

Die Primer, die bei diesem Verfahren zur Anwendung kamen, waren zueinander vollkommen komplementär, vergleichsweise lang und enthielten die geänderten Basen in der Mitte. Als Polymerase wurde *Pfu* oder *Pwo* verwendet, da diese sich durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnen. Um die Fehlerrate weiter zu reduzieren, wurden vergleichsweise wenige Zyklen durchgeführt, da theoretisch eine einzige DNA-Kopie

des mutagenisierten Plasmids ausreichte, die später in Bakterien weitervermehrt wurde. Nach Ablauf der PCR lagen im Reaktionsansatz Ausgangsplasmid und mutagenisiertes Plasmid nebeneinander vor. Um diese zu trennen, wurde das Restriktionsenzym *DpnI* dazugegeben, das die methylierte Ausgangs-DNA schneidet, nicht jedoch die in der PCR entstandene unmethylierte DNA. Somit lag nun alleine das mutagenisierte Plasmid vor und konnte in Bakterien transformiert, vermehrt und anschließend aufgereinigt werden.

### Reaktionsansatz der PCR (auf Eis)

Primer 1	10 pmol
Primer 2	10 pmol
Plasmid-DNA	20 ng
10x Puffer passend zur Polymerase	5 µl
dNTPs	1 µl
Polymerase ( <i>Pwo</i> oder <i>Pfu</i> )	1 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

### Programm im Thermocycler

(1) 95 °C	2 min
(2) 95 °C	30 sec
(3) 55 °C	1 min
Wiederholung Schritt (1) bis (3) 14mal	
(4) 70 °C	1 min pro kb Ausgangsplasmid
(5) 4 °C	unbegrenzt

Nach der PCR folgte der Verdau der methylierten Ausgangs-DNA durch Zugabe von 1 µl *DpnI* zum Reaktionsansatz und Inkubation bei 37 °C für eine Stunde. Daran schloss sich die Transformation in Bakterien der Stämme XL1-Blue oder DH5α (siehe 2.2.1.2) und die Vermehrung und Präparation des mutagenisierten Plasmids an.

## **2.2.2 Zellbiologische und virologische Methoden**

### **2.2.2.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien**

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3)

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen (293T und BHK) wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen gehalten. Adhärenente Zellen wachsen am Boden der Zellkulturflasche in Form eines Monolayers, der alle 3-4 Tage konfluent wird. Zu diesem Zeitpunkt müssen die Zellen verdünnt (gesplittet) werden. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit ATV vom Boden gelöst und in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:20 mit frischem Kulturmedium in die Zellkulturflasche zurückgegeben. Als Kulturmedium wurde für 293T-Zellen MEM mit 10% FCS, für BHK-Zellen MEM mit 5% FCS verwendet. BHK/LTR*lacZ* wurde zur Selektion 1 mg/ml G418 zur Selektion zugegeben.

### **2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3)

Beim Einfrieren von Zellen wurde mit DMSO (Sigma #2650) gearbeitet. Um dessen Toxizität für die Zellen zu verringern, wurden alle Arbeitsschritte mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Beim Auftauen wurden die Zellen vom toxischen DMSO befreit.

#### ***Einfrieren***

- Zellen mit ATV lösen und in Kulturmedium aufnehmen
- 10 min bei 1000 U/min zentrifugieren, Überstand verwerfen
- zum Pellet 50% Kulturmedium, 40% FCS, 10% DMSO (FCS und DMSO zuvor auf Eis ansetzen)
- aliquotieren und in -80 °C verbringen
- nach mind. 24 h in flüssigen Stickstoff überführen

#### ***Auftauen***

- Zellen rasch auftauen und in 10 ml Kulturmedium auf Eis geben
- 10 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugieren, Überstand verwerfen

- 5 ml Kulturmedium zum Pellet, in Zellkulturflasche aussäen

### **2.2.2.3 Vermehrung von Viren in Zellkultur**

Nach der Zugabe des zu vermehrenden Virus zu einer Zellkultur von BHK wurde beim Splitten jeweils ein Anteil der infizierten und ein Anteil frische, nicht infizierte Zellen verwendet. Ebenso wurde z. B. ein Fünftel des infizierten Überstandes übertragen. Sobald sich ein cytopathischer Effekt zeigte, konnten die Viren geerntet werden.

### **2.2.2.4 Zellzahlbestimmung und Aussäen von Zellen**

Die Zelldichte in einem Kulturmedium kann mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Hierzu wurde das zellhaltige Medium gut gemischt, gegebenenfalls etwas verdünnt und 10 µl der Zellsuspension vom Rand her zwischen Zählkammer und das aufgelegte Deckglas gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den Großquadraten ausgezählt. Die Maße des Großquadrats betragen 1 mm x 1 mm und der Abstand zwischen Zählkammer und Deckglas beträgt 0,1 mm, so dass sich die in einem Großquadrat gezählten Zellen auf 0,1 µl verteilen. Damit läßt sich die Anzahl der Zellen pro ml Kulturmedium errechnen, indem man die Gesamtzahl der gezählten Zellen durch die Anzahl der ausgezählten Großquadrate teilt und mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert.

Beim Aussäen von Zellen wurde die Zelldichte in einer Ausgangszellsuspension bestimmt und auf die gewünschte Dichte verdünnt, um so eine definierte Menge an Zellen in einer definierten Menge Medium in die jeweilige Zellkulturschale geben zu können.

### **2.2.2.5 Transfektion und Induktion**

Bei einer Transfektion wird DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. In dieser Arbeit handelte es bei der transfizierten DNA um Plasmide, die ein provirales Genom in sich trugen. Das Ziel war in den folgenden Schritten eine Expression der viralen Gene und eine Produktion von Viruspartikeln. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden für die Transfektion angewandt, die Transfektion mit Calciumphosphat, die

Transformation mit PEI und die Transfektion mit dem *PolyFect Transfection Reagent* von Qiagen. Bei allen angewandten Methoden geht die fremde DNA im Verlauf der Zellteilungen verloren, weshalb es sich ausschließlich um transiente Transfektionen handelt. Als Zielzellen der Transfektion dienten 293T-Zellen, die stabil das große T-Antigen von SV-40 exprimieren (DuBridge et al. 1987). Transfizierte Plasmide, die einen T-Replikationsursprung von SV-40 enthalten, werden dann durch die Expression des T-Antigens in den Zellen effizient amplifiziert und eine stärkere Expression der auf dem Plasmid kodierten Protein erreicht.

### ***Transiente Transfektion mit Calciumphosphat***

Bei dieser schon lange etablierten und kostengünstigen Methode bilden sich Präzipitate aus Calciumphosphat und DNA, die dann per Endozytose aufgenommen werden (Graham et van der Eb 1973). Von Nachteil ist die Toxizität der eingesetzten Substanzen für die Zellen und die deshalb eher geringen Virustiter, die erzielt werden.

- $1,8 \times 10^6$  293T-Zellen in 6-cm-Schalen mit 5 ml Medium aussäen
- über Nacht im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubieren
- Medium abnehmen; 4 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium zugeben
- Transfektionsansatz vorbereiten
  - o 10 µg DNA
  - o 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub>
  - o ad 500 µl Aqua dest. (vorgewärmt)
  - o gut mischen
  - o 500 µl 2xHBS (vorgewärmt) langsam und vorsichtig zugeben, während sich Präzipitate bilden
- Transfektionsansatz 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dann auf die Zellen tröpfchenweise zugeben
- 8 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren
- Medium abnehmen und durch 4 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzen
- Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>, am nächsten Tag Induktion (siehe weiter unten)

### ***Transiente Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)***

Eine höhere Effizienz als durch die Transfektion mit Calciumphosphat wird mit Polyethylenimin (PEI) als Transfektionsreagenz erzielt (Boussif et al. 1995). PEI ist ein kationisches Polymer, das Nukleinsäuren bindet und kondensiert. Der DNA-Polykation-Komplex wird von der Zelle endozytiert und entgeht vermutlich durch seine Eigenschaft als *proton sponge* dem lysosomalen Abbau (Akinc et al. 2005), was zusammen mit der geringen Toxizität die höhere Transfektionseffizienz erklären kann.

- 2 x 10<sup>6</sup> 293T-Zellen in 6-cm-Schalen mit 5 ml Medium aussäen
- über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren
- Medium abnehmen; 2,5 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes MEM mit 12% FCS zugeben
- Transfektionsansatz vorbereiten
  - o 6 µg DNA
  - o 18 µl PEI (1 mg/ml)
  - o 476 µl MEM ohne Zusätze
  - o gut mischen
- 20-30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- auf Zellkulturschalen tröpfeln
- Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>, am nächsten Tag Induktion

### ***Transiente Transfektion mit dem PolyFect Transfection Reagent***

Die Transfektion mit *PolyFect* wurde verwendet, wenn sehr hohe Titer benötigt wurden. Das sphärisch aufgebaute Reagenz bildet mit DNA einen positiv geladenen Komplex, der an negativ geladene Zellrezeptoren bindet und von der Zelle bevorzugt endozytiert wird.

- 1,6 x 10<sup>6</sup> 293T-Zellen in 6-cm-Schalen mit 5 ml Medium aussäen
- über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren
- Medium abnehmen; 4 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium zugeben
- Transfektionsansatz vorbereiten
  - o 6 µg DNA
  - o 30 µl PolyFect
  - o 150 µl MEM ohne Zusätze
  - o gut mischen

- 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zusammen mit 850 µl MEM 10% FCS auf die Zellen geben
- Inkubation über Nacht, am nächsten Tag Induktion

### **Induktion**

Mittels Natriumbutyrat, einem Histondeacetylasehemmer, kann die Genexpression in Zellen angeregt werden. Damit werden auch die transfizierten viralen Gene vermehrt exprimiert, besonders wenn sie unter Einfluß eines CMV-Promotors stehen, und dadurch höhere Virustiter erzielt.

- Natriumbutyrat zu transfizierter Zellkultur zugeben bis zur Endkonzentration von 10 mM
- 8 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubieren
- Medium abnehmen und durch 3 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzen
- Inkubation über Nacht, Ernte (siehe 2.2.2.6) oder Zellysat (siehe 2.2.2.10) am nächsten Tag

### **2.2.2.6 Ernte von Viruspartikeln**

Bei der Ernte von Viruspartikeln, die aus der Vermehrung in Zellkultur (Kap. 2.2.2.3) oder einer Transfektion (Kap. 2.2.2.5) entstammen, wird virushaltiger Überstand abgenommen und durch eine Porentiefe von 0,45 µm gefiltert. Die Viren wurden aliquotiert und sofort weiterverwendet oder bei -80 °C weggefroren.

### **2.2.2.7 lacZ-Färbung**

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3)

Mittels der *lacZ*-Färbung wurde in dieser Arbeit die Infektion der Indikatorzellen BHK/LTR(SFVmac)*lacZ* bzw. BHK/LTR(PFV)*lacZ* mit SFVmac bzw. PFV nachgewiesen. Diese Indikatorzellen haben ein *lacZ*-Gen, das unter der Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen LTR des jeweiligen Virus steht (Yu et Linial 1993; Schmidt et Rethwilm 1995; Roy et al. 2003). Wird eine Indikatorzelle von SFVmac bzw. PFV infiziert, kommt es zur Produktion des viralen Transaktivators Tas, der über die Interaktion mit dem LTR letztlich zur Expression von β-Galaktosidase führt. Durch eine

Färbung mit X-Gal lassen sich anschließend  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierende Zellen blau färben, wodurch die Infektion mit dem entsprechenden Virus angezeigt wird.

- Zellkulturmedium abnehmen
- 1x mit PBS waschen
- Fixierlösung zugeben und mindestens 20 min bei 4 °C inkubieren
- 2-3x mit PBS waschen
- Färbelösung zugeben und 4-6 h bei 37 °C inkubieren

### **2.2.2.8 Virustitration**

Um den Titer eines virushaltigen Überstandes zu bestimmen, wurde dieser in einer Verdünnungsreihe (z. B. dreimal 1:10 bis 1:10000 in 12-well-Platten) auf die entsprechenden Indikatorzellen gegeben und nach 48 h eine LacZ-Färbung durchgeführt, die infizierten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und durch Rückrechnung der Verdünnung der Titer ausgerechnet.

### **2.2.2.9 AZT-Resistenz-Test mit Transfektionsversuchen**

Um die Auswirkungen von Mutationen im Virusgenom auf die AZT-Resistenz des Virus zu untersuchen, wurden provirale SFVmac- bzw. PFV-Konstrukte, in die entsprechende Mutationen zuvor hineinkloniert worden waren, in 293T-Zellen transfiziert (siehe 2.2.2.5), nach Induktion und Viruspartikelproduktion der Überstand geerntet (siehe 2.2.2.6) und der Titer durch *lacZ*-Färbung von Indikatorzellen bestimmt (siehe 2.2.2.7 und 2.2.2.8). Dabei wurde AZT in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, wobei wegen der Besonderheiten des foamyviralen Replikationsszyklus (siehe 1.2.5) eine Zugabe nur in den Zielzellen (BHK-LTR*lacZ*-Indikatorzellen) anders als bei entsprechenden Versuchen mit HIV und anderen Orthoretroviren wenig aussagekräftig ist (Moebes et al. 1997; Roy et al. 2003). Daher wurde AZT bei einigen Versuchen in parallelen Ansätzen entweder nur in der transfizierten Zelle bei der Virusproduktion zugegeben, nur bei der Infektion der Zielzelle oder bei beiden Gelegenheiten. Bei den meisten Versuchen wurde nur letzterer Ansatz herangezogen, also die Zugabe von AZT sowohl in der virusproduzierenden Zelle als auch in der virusaufnehmenden Zelle.

Der Vorteil dieses Systems zur Untersuchung der phänotypischen Resistenz mittels Transfektion von molekularen Klonen und anschließender Infektion von Zielzellen ist die schnelle Durchführung innerhalb einer Woche.

- Aussäen von 293T-Zellen, Transfektion und Induktion (siehe 2.2.2.5); dabei Mediumwechsel mit/ohne AZT
- Ernte der Viruspartikel (siehe 2.2.2.6)
- Aussäen von Indikatorzellen ( $10^4$  in 1 ml Medium, 12-well-Platten)
- Mediumwechsel mit/ohne AZT, 4 weitere Stunden Inkubation
- Zugabe des virushaltigen Überstandes in Verdünnungsreihen (Titration, siehe 2.2.2.8)
- Inkubation für 48 h
- LacZ-Färbung und Auszählung der blauen Zellen (siehe 2.2.2.7)

### **2.2.2.10 Herstellung von Zelllysaten**

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.4)

Eine Möglichkeit, die Expression von z. B. viralen Proteinen in Zellen zu untersuchen, ist die Analyse von Zelllysaten mit Proteingelelektrophorese und Westernblot (siehe 2.2.3.1 und 2.2.3.2). Für die Herstellung derartiger Zelllysate wird RIPA-Puffer verwendet, der Triton X-100 enthält, das für eine Permeabilisierung der Zellmembran sorgt, während SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol die Proteine denaturieren und ihre Wechselwirkungen unterbinden.

- Zellen mit PBS(+) waschen
- Zugabe von RIPA Puffer (z. B. 700  $\mu$ l bei 6-cm-Schalen)
- 10 min auf Eis, dabei gelegentlich schwenken
- gelöste Zellen in QiaShredder überführen und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugieren
- 600  $\mu$ l Eluat mit 600  $\mu$ l 2x PPP mischen
- 5 min bei 95 °C kochen
- Lagerung bei -20/-80 °C

### **2.2.2.11 Viruspartikelpräparation**

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.4)

Um die viralen Proteine aus Viruspartikeln in einem Western Blot (siehe 2.2.3.2) untersuchen zu können, müssen die Viruspartikel aus dem virushaltigen Überstand (siehe 2.2.2.6) zunächst aufgereinigt werden.

- 293T-Zellen aussäen (vier 6-cm-Schalen pro Partikelpräparation), Transfektion und Induktion (siehe 2.2.2.5)
- Überstände abnehmen, sterilfiltrieren (siehe 2.2.2.6) und vereinigen
- 2 ml 20% Sucroslösung in ein Ultrazentrifugenröhrchen vorlegen
- 8 ml Überstand vorsichtig auf das Sucrosekissen schichten
- mit PBS(+) austarieren
- 3 h Ultrazentrifugation bei 25000 rpm und 4 °C
- Medium absaugen, Sucrose dekantieren und Röhrchen umgekehrt stehen lassen
- Flüssigkeitsreste mit RNase-freiem Papier entfernen
- 30 µl 2x PPP und 30 µl PBS zugeben und vortexen
- 5 min auf Eis, vortexen
- 5 min bei 95 °C erhitzen
- Lagerung bei -80 °C

## **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Mit der diskontinuierlichen Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine der Größe nach aufgetrennt werden (Laemmli 1970; Schägger et von Jagow 1987). Dabei werden die Proteinproben zunächst aufgekocht und durch SDS sowie  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert. Die Proteine erhalten durch das anionische SDS eine zu ihrer Größe annähernd proportionale negative Ladung, wodurch die proteinspezifische Ladung überlagert wird. Im Polyacrylamidgel wandern die Proteine dementsprechend zur Anode, die kleinen schneller als die größeren. Die Porengröße des Gels und damit der optimale Trennbereich kann über den Anteil an Acrylamid oder das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid, das die Acrylamidfasern quervernetzt,

variiert werden. In dieser Arbeit wurde mit 8-prozentigen Gelen bei einem Acryl-Bisacrylverhältnis von 37,5:1 gearbeitet (Gel Rotiphorese 30, Roth).

Nach dem Aufbau der vertikalen Gelelektrophoreseapparatur wird das Trenngel angesetzt und die Polymerisation durch Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxysulfat (APS) unter Katalyse von N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) gestartet. Das noch flüssige Trenngel wird dann zwischen zwei Glasplatten der Apparatur gegossen, mit Isopropanol überschichtet und die Polymerisation für etwa eine halbe Stunde abgewartet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das Isopropanol vollständig entfernt, das Sammelgel angesetzt, die Polymerisation desselben wiederum durch Zugabe von APS und TEMED gestartet, das Gemisch zügig oberhalb des Trenngels zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesetzt, der bei der Polymerisation des Sammelgels Taschen für die spätere Beladung mit Proteinproben freihält. Nach der Auspolymerisierung des Sammelgels werden die Pufferkammern der Elektrophoreseapparatur mit Kathoden- bzw. Anodenpuffer gefüllt, der Kamm entfernt, die Taschen mit Kathodenpuffer gründlich gespült und z.B. je 20-80 µl der Proben bzw. 8 µl Rainbow-Marker in die Taschen gegeben. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 25-35 mA pro Gel über Nacht.

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

### **2.2.3.2 Western Blot**

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.4)

In einem Western Blot werden Proteine, die zuvor durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, auf einer

Nitrocellulosemembran fixiert und anschließend durch Antikörper nachgewiesen (Towbin et al. 1979).

Für die Übertragung vom Gel auf die Membran wurde dabei ein elektrisches Feld angelegt, in dem die Proteine senkrecht zu ihrer Laufrichtung in der SDS-PAGE wandern. Hierzu wurde ein Semi-Dry Blot-Verfahren verwendet. Dazu wurden zunächst Blot-Filterpapier und Nitrocellulosemembran 10 Minuten in Blotpuffer getränkt und Anoden- und Kathodenplatte mit Blotpuffer befeuchtet, dann auf die Anodenplatte drei Lagen Blot-Filterpapier, die Nitrocellulosemembran, das Acrylamidgel, wiederum zwei Lagen Blot-Filterpapier und obenauf die Kathodenplatte gelegt und schließlich für 90 Minuten ein Strom von 150 mV angelegt.

Anschließend wurde die Membran nacheinander zwei Antikörpern ausgesetzt. Der primäre Antikörper richtet sich gegen das zu detektierende Protein und bleibt an diesem haften, während er von anderen unspezifischen Proteinen abgewaschen werden kann. Der sekundäre Antikörper stammt von einer anderen Wirtsspezies, erkennt den ersten Antikörper und bindet an diesen.

- Membran mit PBS(-) spülen
- 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd in 4% Milchpulver blocken
- 3x mit PBS-Tween spülen
- 1 h bei RT schüttelnd mit primären Antikörper in 4% Milchpulver (z. B. 1:100) inkubieren
- 3 x 5 min mit PBS-Tween waschen
- 1 h bei RT schüttelnd mit sekundärem Antikörper in 4% Milchpulver (z. B. 1:1000) inkubieren
- 5 x 5 min mit PBS-Tween waschen

An den sekundären Antikörper ist dabei ein Enzym gekoppelt, in dieser Arbeit war dies z. B. Peroxidase. Durch Zugabe einer Luminol-haltigen Detektionslösung (*ECL Western Blot Detection Kit*) wurde eine durch die Peroxidase katalysierte Oxidation ermöglicht, bei der es zu einer Chemolumineszenz kam, die durch die Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden konnte.

Für die Detektion wurde die Nitrocellulosemembran nach dem letzten Waschen mit Blot-Filterpapier getrocknet, auf eine Glasplatte gelegt und für 90 Sekunden mit 4 ml ECL überschichtet. Nach Entfernen der Detektionslösung wurde die Membran auf der

Glasplatte in Frischhaltefolie verpackt und in eine Fotokassette verbracht. In der Dunkelkammer wurden die Röntgenfilme für wenige Sekunden bis 30 Minuten belichtet und anschließend entwickelt, fixiert und getrocknet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung eines AZT-resistenten SFVmac

#### 3.1.1 Genotypische Analyse von SFVmac<sub>AZTres</sub>

##### 3.1.1.1 Selektion von SFVmac<sub>AZTres</sub> in Zellkultur

Die foamyvirale Reverse Transkriptase ist im Vergleich zu vielen orthoretroviralen Enzymen noch recht wenig untersucht. Zu den bisher nachgewiesenen Besonderheiten zählen eine höhere Prozessivität als die RT von HIV (Rinke et al. 2002; Boyer et al. 2004), die Bevorzugung von Mangan an Stelle von Magnesium als Co-Faktor (Scolnick et al. 1970; Liu et al. 1977; Benzair et al. 1982; Kögel et al. 1995a), die fehlende Abspaltung der Protease von der RT (Pfrepper et al. 1998), sowie das Vorhandensein von Valin anstatt Methionin im YXDD-Motiv des aktiven Zentrums (Rinke et al. 2002). Darüberhinaus sind jedoch noch viele Einzelheiten unbekannt.

Ähnlich wie bei HIV, wo die Untersuchung von NRTI-Resistenzen auch einen Beitrag leisten konnte, die normale biologische Funktion und Struktur der Reversen Transkriptase aufzuklären, könnte die Analyse einer AZT-Resistenz bei Foamyviren neben einer Erweiterung der Erkenntnisse über allgemeine Mechanismen von retroviralen NRTI-Resistenzen auch Aufschlüsse über generelle Eigenschaften der foamyviralen Polymerase und ihre Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Vergleich mit den orthoretroviralen Enzymen liefern. Eine Isolation von resistenten Viren aus infizierten und behandelten Patienten wie bei HIV kommt für Foamyviren nicht in Betracht. Jedoch wurde gezeigt, dass in Zellkultur unter Anwesenheit von NRTIs HIV selektiert werden kann, dessen Resistenzmutationen den *in vivo* nachgewiesenen gleichen (Smith et al. 1987; Larder et al. 1991a; Dianzani et al. 1992; Gao et al. 1992). Daher sollte in dieser Arbeit das AZT-resistente Foamyvirus SFVmac<sub>AZTres</sub> untersucht werden, das durch Halten in Zellkultur unter steigenden AZT-Konzentrationen gewonnen worden war.

Um AZT-resistente Foamyviren zu erhalten, waren dabei Plasmid-abgeleitete Virusstämme von PFV, SFVcpz und SFVmac in den entsprechenden Indikatorzellen kultiviert worden. Solange in der Zellkultur ein zytopathischer Effekt anzeigte, dass das entsprechende Virus noch replikationsfähig ist, war über einen Zeitraum von zwei

Monaten die AZT-Konzentration von 0,005  $\mu\text{M}$  ausgehend schrittweise gesteigert worden. Auf diese Weise war ein SFVmac-Isolat gewonnen worden, das noch in Anwesenheit von 1 mM AZT repliziert, SFVmac<sub>AZTres</sub>. Dagegen hatten die Versuche, mit diesem Ansatz AZT-resistentes PFV oder SFVcpz zu erhalten, nicht zum Erfolg geführt.

### 3.1.1.2 DNA-Sequenzierung des *gag*- und *pol*-Gens von SFVmac<sub>AZTres</sub>

Um den genetischen Hintergrund der AZT-Resistenz des diesermaßen biologisch selektierten SFVmac-Isolates zu untersuchen, wurden nun die Gene *gag* und *pol* aus der viralen DNA von SFVmac<sub>AZTres</sub> mittels PCR amplifiziert und die Nukleotidfolge mit der von F. Sanger stammenden Methode sequenziert (siehe 2.2.1.14). Im Vergleich mit der Ausgangssequenz, also dem Konstrukt pSFV-1, das als Grundlage für die Gewinnung des AZT-resistenten Isolates gedient hatte und dessen *gag*- und *pol*-Gen zuvor ebenfalls sequenziert worden waren, zeigten sich dabei auf Nukleinsäureebene sieben Mutationen (Tabelle 6). Zwei dieser Mutationen fanden sich im 3'-Bereich von *gag* und fünf in der ersten Hälfte des *pol*-Gens. Bei allen Mutationen handelt es sich um die Veränderung einer einzelnen Base, während andere Veränderungen wie Deletionen oder Insertionen nicht nachgewiesen wurden. Viermal fand sich die Transition von Guanin zu Adenin, einmal die Transition von Thymin zu Cytosin, sowie je einmal die Transversion von Adenin zu Thymin und von Thymin zu Adenin.

Gen	<i>gag</i>	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>pol</i>	<i>pol</i>	<i>pol</i>	<i>pol</i>
Position	1604	1786	632	671	1033	1048	1614
Mutation	G → A	G → A	A → T	T → C	T → A	G → A	G → A

**Tabelle 6: *gag*- und *pol*-Mutationen in SFVmac<sub>AZTres</sub>**

*In der DNA-Sequenzanalyse des gag- und pol-Gens von SFVmac<sub>AZTres</sub> festgestellte Mutationen im Vergleich mit der wildtypischen Ausgangssequenz bzw. dem proviralen Konstrukt pSFV-1.*

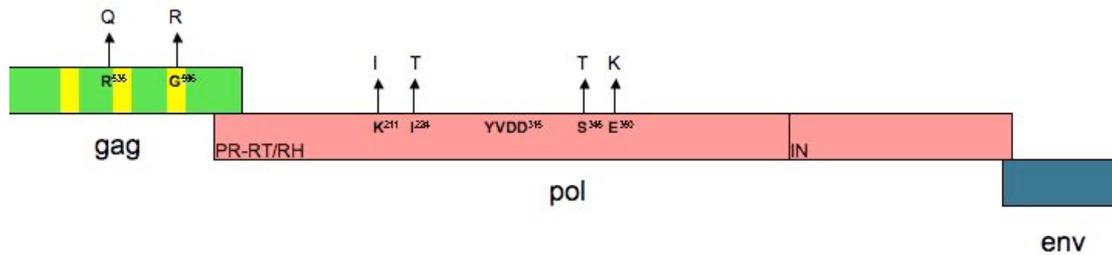
### 3.1.1.3 Auswirkungen der Mutationen in SFVmac<sub>AZTres</sub> auf Aminosäureebene

Auf Aminosäureebene führten sechs der sieben Nukleotidsubstitutionen zu Veränderungen, während sich die siebte Mutation als stumm erwies (*Tabelle 7*). Zwei Aminosäureaustausche fanden sich dabei in Gag, vier in Pol. Im Einzelnen kam es in Gag an Position 535 zu einem Wechsel von Arginin zu Glutamin (R535Q) und an Position 596 von Glycin zu Arginin (G596R), in Pol an Position 211 von Lysin zu Isoleucin (K211I), an Position 224 von Isoleucin zu Threonin (I224T), an Position 345 von Serin zu Threonin (S345T) und an Position 350 von Glutamat zu Lysin (E350K). Am Codon 538 von Pol führte die Mutation von CCG zu CCA zu keiner Aminosäureveränderung, da beide Triplets für Prolin codieren.

Position		SFVmac			SFVmac <sub>AZTres</sub>		
		Codon	Aminosäure	Abk.	Codon	Aminosäure	Abk.
Gag	535	CGA	Arginin	Arg / R	CAA	Glutamin	Glu / Q
Gag	596	GGA	Glycin	Gly / G	AGA	Arginin	Arg / R
Pol	211	AAA	Lysin	Lys / K	ATA	Isoleucin	Ile / I
Pol	224	ATT	Isoleucin	Ile / I	ACT	Threonin	Thr / T
Pol	345	TCA	Serin	Ser / S	ACA	Threonin	Thr / T
Pol	350	GAA	Glutamat	Glu / E	AAA	Lysin	Lys / K
Pol	538	CCG	Prolin	Pro / P	CCA	Prolin	Pro / P

**Tabelle 7: Aminosäuresubstitutionen in SFVmac<sub>AZTres</sub>**

R535Q in Gag befindet sich direkt vor der GR-Box II, die als NLS dient, während G596R sich innerhalb der GR-Box III befindet, deren Funktion bisher unbekannt ist (Schliephake et Rethwilm 1994). Alle vier Aminosäureveränderungen in Pol betreffen den Bereich der Reversen Transkriptase, wobei sich K211I und I224T stromaufwärts, S345T und E350K dagegen stromabwärts des aktiven Zentrums (YVDD-Motiv, Aminosäuren 312 bis 315) befinden (*Abbildung 8*).



**Abbildung 8: Aminosäuresubstitutionen in Gag und Pol von SFVmac**

Gezeigt ist die Lage der Aminosäureveränderungen, die sich in SFVmac<sub>AZTres</sub> im Vergleich zur wildtypischen Ausgangssequenz fanden. Die gelben Abschnitte in Gag deuten die Lage der GR-Boxen an, YVDD ist das Motiv im aktiven Zentrum von Pol. Die Abbildung ist nicht streng maßstabstreu.

### 3.1.1.4 Abgleich der Sequenz von SFVmac<sub>AZTres</sub> mit veröffentlichten Genbank-Sequenzen von SFVmac

Die gag- und pol-Sequenzen von SFVmac<sub>AZTres</sub> und der auf pSFV-1 basierenden Ausgangssequenz wurden weiterhin mit zwei veröffentlichten SFVmac-Sequenzen verglichen, einerseits Genbank Nr. X58484 (Mergia et Luciw 1991) und Nr. M33561 (Mergia et al. 1990), und andererseits Genbank Nr. X54482 (Kupiec et al. 1991). Zu den drei Aminosäureresten in Pol, an denen sich Nr. X58484 und Nr. M33561 einerseits und Nr. X54482 andererseits unterscheiden, gehört neben 898 und 938 dabei auch die Position 224, also eine der vier Aminosäuren, die sich in Anwesenheit von AZT änderten. Dabei fand sich in Nr. X58484 wie in der Ausgangssequenz von pSFV-1 ein Isoleucin, in Nr. X54482 jedoch ein Threonin wie bei SFVmac<sub>AZTres</sub>. Möglicherweise besteht also an Aminosäure 224 ein Isoleucin/Threonin-Polymorphismus unabhängig von der beobachteten Selektion von Isoleucin zu Threonin in Anwesenheit von AZT.

### 3.1.1.5 Vergleich der SFVmac- und SFVmac<sub>AZTres</sub>-Sequenzen mit Genbank-Sequenzen anderer Foamyviren

Beim Abgleich der Pol-Sequenzen von SFVmac und SFVmac<sub>AZTres</sub> mit den veröffentlichten Sequenzen anderer Foamyviren (Abbildung 9) zeigte sich an Aminosäure 224 bei SFVagm, PFV, SFVcpz, SFVora und SFVspm ebenfalls ein

Threonin wie bei SFVmac<sub>AZTres</sub> und SFVmac nach Genbank Nr. X54482, im Gegensatz zum Isoleucin bei pSFV-1 und SFVmac nach Genbank Nr. 58484. Bei den weiter entfernt verwandten FFV, BFV und EFV befindet sich an dieser Stelle ein Valin.

An Position 211, wo bei SFVmac<sub>AZTres</sub> ein Isoleucin nachgewiesen wurde, zeigte sich im Sequenzvergleich beim nah verwandeten SFVagm und beim eher entfernt verwandten SFVspm wie in der Ausgangssequenz von SFVmac ein Lysin, bei den anderen untersuchten Foamyviren PFV, SFVcpz, SFVora, FFV, BFV und EFV das ebenfalls basische Arginin.

Das Serin in SFVmac an Position 345, das bei SFVmac<sub>AZTres</sub> zu einem Threonin mutiert war, fand sich bei allen anderen abgeglichenen foamyviralen Sequenzen konserviert.

Als Aminosäure an Position 350 fand sich bei PFV, SFVcpz und SFVagm ein Glutamat wie bei SFVmac, bei BFV und EFV hingegen ein Lysin wie bei SFVmac<sub>AZTres</sub>. SFVora und SFVspm weisen an dieser Stelle ein Alanin, FFV ein Asparagin auf.

An Position 535 in Gag zeigte sich, ähnlich wie in Pol an Position 224, dass die meisten untersuchten Foamyviren bereits in ihrer wildtypischen Sequenz die Aminosäure aufweisen, die in SFVmac<sub>AZTres</sub> vorgefunden wurde, in diesem Fall also ein Glutamin. An Position 596 dagegen fand sich bei den meisten Foamyviren ein Glycin wie beim wildtypischen SFVmac.

Virus	Ausschnitt Aminosäuresequenz von Pol		
	209	312	343
SFVmac	...DG <b>K</b> WRMVL DYREVNK <b>I</b> IP...YVDD...VV <b>S</b> LKK <b>S</b> EIA...		
SFVmac <sub>AZTres</sub>	...DG <b>I</b> WRMVL DYREVNK <b>T</b> IP...YVDD...VV <b>T</b> LKK <b>S</b> K <b>I</b> A...		
SFVagm	...DG <b>K</b> WRHVIDYREVH <b>K</b> TIP...YVDD...VV <b>S</b> LKK <b>S</b> EIA...		
PFV	...DG <b>R</b> WRHVL DYREVH <b>K</b> TIP...YVDD...VV <b>S</b> LKK <b>S</b> ETG...		
SFVcpz	...DG <b>R</b> WKHVLDYREVH <b>K</b> TIP...YVDD...VV <b>S</b> LKK <b>S</b> ETG...		
SFVora	...DG <b>R</b> WRMVL DYREVNK <b>T</b> IP...YVDD...VV <b>S</b> LKK <b>S</b> AIA...		
SFVspm	...DG <b>K</b> WRMVL DYRAVNK <b>T</b> IP...YVDD...IV <b>S</b> LKK <b>S</b> ALA...		
FFV	...HG <b>R</b> WRHVIDYRAVN <b>K</b> VTP...YVDD...IV <b>S</b> LKK <b>S</b> NIA...		
BFV	...DG <b>R</b> WRHVIDYREVH <b>K</b> VTP...YVDD...IV <b>S</b> LKK <b>S</b> KLA...		
EFV	...DG <b>R</b> WRMVL DYRAVN <b>K</b> VTP...YVDD...IV <b>S</b> LKK <b>S</b> KL <b>G</b> ...		

**Abbildung 9: Homologie der Pol-Aminosäuresequenzen von SFVmac und SFVmac<sub>AZTres</sub> mit veröffentlichten Sequenzen anderer Foamyviren**

Die Sequenzen von SFVmac und SFVmac<sub>AZTres</sub> wurden mittels eines Alignment-Programmes mit folgenden veröffentlichten Sequenzen abgeglichen (Genbank Nr.): SFVagm (M74895), PFV (Y07725), SFVcpz (U04327), SFVora (AJ544579), SFVspm (EU010385), FFV (AJ564746), BFV (U94514) und EFV (AF20190), wobei die Verwandtschaft der verschiedenen Foamyviren zu SFVmac von oben nach unten tendenziell abnimmt. Die Zahlenangabe in der ersten Linie bezieht sich auf die Aminosäureposition in SFVmac. Gezeigt sind neben dem aktiven Zentrum (Aminosäuren 312-315) Ausschnitte aus der Pol-Sequenz, die die in SFVmac<sub>AZTres</sub> nachgewiesenen Mutationen umfassen, also die hervorgehobenen Aminosäuren 211, 224, 345 und 350. Für SFVmac wurde die Sequenz mit der Genbank Nr. 58484 zugrundegelegt.

Wie in Tabelle 8 zusammengefasst, zeigte sich also, dass von den vier Aminosäuren, die in SFVmac<sub>AZTres</sub> gegenüber der Ausgangssequenz geändert sind, bei SFVagm drei dieselben sind wie in SFVmac (K211, S345, E350), bei PFV und SFVcpz (S345, E350), sowie wie bei SFVspm zwei (K211, S345), bei SFVora, FFV, BFV und EFV eine (S345). Zudem findet sich bei PFV, SFVcpz, SFVora und SFVagm an Position 224 ein Threonin und bei BFV und EFV an Position 350 ein Lysin, also jeweils dieselbe Aminosäure wie bei SFVmac<sub>AZTres</sub>.

Virus	Übereinstimmung an Positionen der AZT-Resistenzmutationen mit SFVmac oder SFVmac <sub>AZTres</sub>				Gesamtzahl Übereinstimmung mit SFVmac / SFVmac <sub>AZTres</sub>
	211	224	345	350	
SFVagm	SFVmac	SFVmac <sub>AZTres</sub>	SFVmac	SFVmac	3 / 1
PFV	∅	SFVmac <sub>AZTres</sub>	SFVmac	SFVmac	2 / 1
SFVcpz	∅	SFVmac <sub>AZTres</sub>	SFVmac	SFVmac	2 / 1
SFVora	∅	SFVmac <sub>AZTres</sub>	SFVmac	∅	1 / 1
SFVspm	SFVmac	SFVmac <sub>AZTres</sub>	SFVmac	∅	2 / 1
FFV	∅	∅	SFVmac	∅	1 / 0
BFV	∅	∅	SFVmac	SFVmac <sub>AZTres</sub>	1 / 1
EFV	∅	∅	SFVmac	SFVmac <sub>AZTres</sub>	1 / 1

**Tabelle 8: Übereinstimmung von Foamyviren mit SFVmac und SFVmac<sub>AZTres</sub> an den Positionen der AZT-Resistenz-Mutationen**

### 3.1.1.6 Vergleich von SFVmac und HIV bezüglich AZT-Resistenz-Mutationen

Bei HIV sind vor allem zwei Gruppen an Mutationen bekannt, die eine Resistenz gegenüber AZT verleihen: die als TAM zusammengefassten Mutationen M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F und K219Q/E einerseits und die Mutationen des Q151M-Komplexes andererseits, die neben der namensgebenden Mutation noch A62V, V75I, F77L und F116Y umfassen. Keine dieser Mutationen entspricht den bei SFVmac<sub>AZTres</sub> nachgewiesenen Mutationen K211I, I224T, S345T und E350K. Wie der Sequenzvergleich von HIV und SFVmac mit den jeweiligen Resistenzmutationen jedoch zeigte (*Abbildung 10*), befindet sich die Mutation K211I in SFVmac an der Stelle, die der Aminosäure 70 in HIV entspricht und somit am Ort der TAM K70R. Zudem befinden sich weitere der AZT-Resistenz-Mutationen von SFVmac<sub>AZTres</sub> in enger Nachbarschaft zu Positionen, die den AZT-Resistenz-Mutationen in HIV entsprechen. So findet sich die Aminosäure 215 der Reversen Transkriptase von HIV, die bei der TAM-Schlüsselmutation von Threonin zu Tyrosin oder Phenylalanin mutiert ist, bei SFVmac als Valin an Position 343, und die Aminosäure an Position 219 der RT von HIV (TAM K219Q/E) entspricht bei SFVmac K347 (Yvon-Groussin et al. 2001). Diese beiden Aminosäuren V343 und K347 liegen auf der

Aminosäuresequenz von SFVmac in Nachbarschaft zu den in SFVmac<sub>AZTres</sub> nachgewiesenen Mutationen S345T und E350K. Die Aminosäure an Position 67 der RT von HIV (TAM D67N) wiederum entspricht in SFVmac der Aminosäure D209 und befindet sich damit ebenfalls in der Nähe der K211I-Mutation von SFVmac<sub>AZTres</sub>. Die Entsprechungen der RT von HIV und SFVmac beruhen dabei jedoch lediglich auf Sequenzvergleichen und Computersimulationen (Yvon-Groussin et al. 2001), Strukturanalysen der RT von SFVmac oder anderen foamyviralen Polymerasen liegen dagegen nicht vor, so dass unklar ist, ob die entsprechenden Aminosäurereste bei Foamyviren tatsächlich ähnliche Funktionen übernehmen wie bei HIV.

<u>Virus</u>	<u>Ausschnitt RT-Aminosäuresequenz</u>
	207 312 336
SFVmac	...KPDG-KWRMVL DYREVNKIIP...YVDD...ILLNAGYVVSLKKSEIA...
SFVmac <sub>AZTres</sub>	...KPDG-IWRMVL DYREVNKTIP...YVDD...ILLNAGYVVTLKKSKIA...
	65 183 208
HIV	...KKDSTKWRKLVDFRELNKRTQ...YMDD...HLLRWGF TTPDKKHQKE...
HIV mit TAMs	...KKNSTRWRKLVDFRELNKRTQ...YMDD...HLWRWGF YTPDQKHQKE...

**Abbildung 10: Vergleich der AZT-Resistenzmutationen von SFVmac und HIV**

Gezeigt sind die Mutationen von SFVmac<sub>AZTres</sub> (K211I, I224T, S345T, E350K; fett) und die in der Nachbarschaft liegenden Aminosäuren, die TAMs in HIV entsprechen (D209, K211, L338, V343, K347 entsprechend den TAMs D67N, K70R, L210W, T343Y, K219Q; unterstrichen). An Position 215 von HIV kann es neben der gezeigten TAM T215Y auch zu T215F kommen und an Position 219 neben der gezeigten TAM K219Q auch zu K219E. Die Mutation M41L (TAM) sowie die Mutationen des Q151M-Komplexes sind nicht dargestellt, wobei zwei Aminosäuren, die beim Q151M-Komplex mutieren, im Sequenzausschnitt enthalten sind (V75I, F75L).

### 3.1.2 Klonierung von AZT-Resistenz-Mutationen in pSFV-1

#### 3.1.2.1 PCR-Amplifikation von AZT-Resistenz-Mutationen enthaltenden Fragmenten aus SFVmac<sub>AZTres</sub> und Klonierung in pSFV-1

Um nachzuweisen, dass die in dem biologisch selektierten SFVmac<sub>AZTres</sub> gefundenen Mutationen tatsächlich für die AZT-Resistenz hinreichend sind, wurde ein Fragment

aus SFVmac<sub>AZTres</sub>, das die sechs zu Aminosäuresubstitutionen führenden Mutationen enthielt, amplifiziert und in den SFVmac-Klon pSK29 inseriert, um damit später 293T-Zellen transfizieren und das daraus erhaltene Virus mit dem biologisch selektierten SFVmac<sub>AZTres</sub> vergleichen zu können. Außerdem wurde ein Klon hergestellt, der ein aus SFVmac<sub>AZTres</sub> amplifiziertes Fragment enthält, das nur die vier *pol*-Mutationen, nicht jedoch die zwei *gag*-Mutationen umfasst. Durch Transfektion in 293T-Zellen und Vergleich des entsprechenden Virus mit den auch die *gag*-Mutationen enthaltenden Viren konnte der Beitrag der *gag*-Mutationen zur AZT-Resistenz von SFVmac abgeschätzt werden.

### Ausgangsplasmide pSFV-1 und pSK29

Als Grundlage für alle infektiösen SFVmac-Klone diente das Plasmid pSFV-1 (Mergia et Wu 1998). pSFV-1 enthält das provirale Genom von SFVmac und für die Vermehrung in Bakterien notwendige Sequenzen wie eine Ampicillin-Resistenz und einen Replikationsursprung (*ori*).

Da pSFV-1 eine für die weiteren Klonierungen ungünstige *KpnI*-Schnittstelle im Polylinker enthält, war pSFV-1 teilweise *KpnI*-verdaut und mit T4-Polymerase behandelt worden, wodurch das daraus entstandene Plasmid pSK29 im Gegensatz zu pSFV-1 durch den Verlust der *KpnI*-Schnittstelle im Vektorhintergrund nur noch eine anstatt zwei *KpnI*-Schnittstelle aufweist, ansonsten aber identisch mit diesem ist.

### pBK3

Um den SFVmac-Klon pBK3 mit allen sechs mutmaßlichen AZT-Resistenz-Mutationen (zwei in *gag* und vier in *pol*) zu erhalten, wurde zunächst ein 3,4-kb-DNA-Fragment, das die insgesamt sechs *gag*- und *pol*-Mutationen enthält, mittels PCR (Primer #1892 und #1893) aus mit SFVmac<sub>AZTres</sub> infizierten Zellen amplifiziert. Das erhaltene DNA-Amplifikat wurde dann in pSK29 kloniert, wobei es keine geeigneten Schnittstellen gab, um die mutierte Sequenz direkt dort einzubringen. Vielmehr wurde das PCR-Produkt nach *EcoRI/XhoI*-Verdau in einen zuvor konstruierten Zwischenklon pBK7 eingebracht. pBK7 enthält ein mittels *XbaI* und *KpnI* ausgeschnittenes Fragment (8228 bp) aus pSK29, das auch das *EcoRI/XhoI*-Fragment mit einschließt, in einem pCRII-Vektorhintergrund, der keine weiteren *XhoI*- und *EcoRI*-Schnittstellen aufweist. Aus dem durch das Einfügen der

SFV<sub>macAZTres</sub>-Sequenzen in pBK7 entstandenen Plasmid pBK8 wurde dann das große Fragment (8228 bp), das jetzt die Mutationen enthielt, wiederum mit *KpnI* und *XbaI* ausgeschnitten und in pSK29 zurückkloniert. Da der Vektorhintergrund eine zusätzliche *XbaI*-Schnittstelle aufweist und beim Öffnen daher in zwei Teile geschnitten wurde, musste im letzten Schritt eine Drei-Fragment-Ligation durchgeführt werden. Die richtige Orientierung der ligierten Fragmente wurde durch entsprechende analytische Restriktionsverdau überprüft und das gesamte durch PCR amplifizierte Fragment sequenziert, um Fehler der Polymerase in der PCR-Amplifikation auszuschließen.

Plasmid	Vektorhintergrund	Insert
pBK7 (12091 bp)	pCRII x <i>XbaI KpnI</i> (3863 bp)	pSFV-1 x <i>XbaI KpnI</i> (8228 bp)
pBK8 (12091 bp)	pBK7 x <i>XhoI EcoRI</i> (8724 bp)	PCR-Produkt (Primer: #1892 und #1893; Ausgangs-DNA: genomische DNA von SFV <sub>macAZTres</sub> ) x <i>EcoRI XhoI</i> (3378 bp)
pBK3 (15440 bp)	pSK29 x <i>XbaI KpnI</i> (2778 bp) pSK29 x <i>XbaI KpnI</i> (4434 bp)	pBK8 x <i>XbaI KpnI</i> (8228 bp)

**Tabelle 9: Klonierung von pBK3**

#### pBK4 und pBK5

Um den SFV<sub>mac</sub>-Klon pBK4 zu erhalten, der die vier *pol*-Mutationen, aber nicht die zwei *gag*-Mutationen enthält, wurde ein Fragment aus pBK3, das die Mutationen in *pol* einschließt, mit *PacI* ausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten Vektorhintergrund pSK29 mit der wildtypischen *gag*-Sequenz eingefügt.

Umgekehrt wurde verfahren, um den Klon pBK5 zu erhalten, der die *gag*-Mutationen, jedoch nicht die *pol*-Mutationen enthält. Ein Fragment aus pSK29 mit der wildtypischen *pol*-Sequenz wurde in den Vektorhintergrund pBK3, der die *gag*-Mutationen aufweist, kloniert.

Plasmid	Vektorhintergrund	Insert
pBK4 (15440 bp)	pSK29 x <i>PacI</i> (11170 bp)	pBK3 x <i>PacI</i> (4270 bp)
pBK5 (15440 bp)	pBK3 x <i>PacI</i> (11170 bp)	pSK29 x <i>PacI</i> (4270 bp)

**Tabelle 10: Klonierung von pBK4 und pBK5**

### 3.1.2.2 Klonierung der AZT-Resistenz-Mutationen einzeln und in Kombinationen in pSFV-1 durch zielgerichtete Mutagenese

Um den Beitrag der einzelnen Mutationen zur AZT-Resistenz zu untersuchen, wurden weiterhin durch zielgerichtete Mutagenese die in SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> nachgewiesenen Mutationen in das provirale Konstrukt pSFV-1 eingebracht. Die Plasmide pSK39 (mit den Mutationen S345T und E350K), pSK50 (mit S345T) und pSK51 (mit E350K) lagen dabei bereits vor und dienten ebenso wie pSK29 als Ausgangspunkt für das Einführen der Mutationen K211I und I224T.

K211I und I224T wurden in Zwischenklone eingeführt, die aus pUC18 als Vektorhintergrund und jeweils einer 4517 bp langen DNA-Sequenz als Insert bestanden. Dieses Insert umfasste den Bereich der vier bei SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> mutierten Aminosäuren und wurde mit *XhoI* und *EcoRI* jeweils aus pSK29, pSK39, pSK50 und pSK51 ausgeschnitten. Die resultierenden Zwischenklone hatten mit 7176 bp eine geeignete Länge, um in ihnen eine Mutation mit anschließendem *DpnI*-Verdau (siehe 2.2.1.15) durchzuführen. Somit wurden in alle vier Zwischenklone K211I und I224T jeweils einzeln und zusammen eingeführt, so dass zwölf Zwischenklone mit neuen Kombinationen an Mutationen entstanden. Die mutierte *pol*-Sequenz wurde jeweils wieder mittels *XhoI* und *EcoRI* ausgeschnitten und in den Zwischenklon pBK7 kloniert, der ein größeres Fragment (8228 bp) aus dem SFVmac-Genom enthält. Das größere Fragment, jetzt jeweils eine bestimmte Kombination an Mutationen tragend, wurde nun mit *XbaI* und *KpnI* ausgeschnitten und in den Vektorhintergrund pSK29 zurückgesetzt. Da der Vektorhintergrund dabei ebenfalls eine *XbaI*-Schnittstelle enthielt, wurde er beim Öffnen in zwei Fragmente geteilt und es musste im abschließenden Schritt eine Drei-Fragment-Ligation aus den beiden Vektorfragmenten und dem jeweiligen Insert durchgeführt werden. Abschließend wurde das mutagenisierte Fragment in den fertigen neuen Klonen jeweils sequenziert.

Als Ergebnis lagen folgende neue SFVmac-Konstrukte vor (siehe auch *Tabelle 13*): pBK30 (mit K211I), pBK31 (mit K211I und E350K), pBK37 (mit K211I, I224T und E350K), pBK38 (mit K211I und S345T), pBK64 (mit K211I, I224T, S345T und E350K), pBK65 (I224T), pBK76 (mit I224T und E350K), pBK77 (mit K211I, I224T und E350K), pBK78 (mit I224T und S345T), pBK79 (mit I224T, S345T und E350K), pBK80 (mit K211I, I224T und S345T) und pBK81 (mit K211I und I224T). Die von dem jeweiligen Plasmid abgeleiteten Viren werden dabei dementsprechend bezeichnet unter Weglassung des vorangestellten „p“. Außerdem wird, um im weiteren Text den Überblick zu erleichtern, den Namen dieser Konstrukte an entsprechender Stelle gelegentlich jeweils eine tiefgestellte vierstellige Buchstabenfolge angehängt, der die jeweilige Aminosäure an den Positionen der mutmaßlichen AZT-Resistenz-Mutationen in Pol 211, 224, 345, 350 anzeigt. Dabei weist Fettdruck auf Mutationen hin, also etwa SK29<sub>KISE</sub>, BK30<sub>IISE</sub>, BK65<sub>KTSE</sub> etc.

Plasmid	Vektorhintergrund	Insert
pBK10 (7176 bp)	pUC18 x <i>EcoRI XbaI</i> (2659 bp)	pSK29 x <i>EcoRI XbaI</i> (4517 bp)
pBK11 (7176 bp)	pUC18 x <i>EcoRI XbaI</i> (2659 bp)	pSK39 x <i>EcoRI XbaI</i> (4517 bp)
pBK12 (7176 bp)	pUC18 x <i>EcoRI XbaI</i> (2659 bp)	pSK50 x <i>EcoRI XbaI</i> (4517 bp)
pBK13 (7176 bp)	pUC18 x <i>EcoRI XbaI</i> (2659 bp)	pSK51 x <i>EcoRI XbaI</i> (4517 bp)
pBK19 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK10; mutagene Primer: #1995 und #1996	
pBK20 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK13; mutagene Primer: #1995 und #1996	
pBK22 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK11; mutagene Primer: #1995 und #1996	
pBK23 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK12; mutagene Primer: #1995 und #1996	
pBK50 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK22; mutagene Primer: #4041 und #4042	
pBK51 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK10; mutagene Primer: #4041 und #4042	

## Ergebnisse

<b>Plasmid</b>	<b>Vektorhintergrund</b>	<b>Insert</b>
pBK58 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK12; mutagene Primer: #4041 und #4042	
pBK59 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK13; mutagene Primer: #4041 und #4042	
pBK60 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK19; mutagene Primer: #4041 und #4042	
pBK61 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK20; mutagene Primer: #4041 und #4042	
pBK62 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK23; mutagene Primer: #4041 und #4042	
pBK67 (7176 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK11; mutagene Primer: #4041 und #4042	
pBK27 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK19 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK28 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK20 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK33 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK22 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK36 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK23 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK52 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK50 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK53 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK51 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK66 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK58 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK70 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK59 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK71 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK61 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK72 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK60 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK73 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK67 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK75 (12091 bp)	pBK7 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (7574 bp)	pBK62 x <i>XbaI</i> <i>EcoRI</i> (4517 bp)
pBK30	pSK29 x <i>XbaI</i> <i>KpnI</i> (2778 bp)	pBK27 x <i>XbaI</i> <i>KpnI</i>

Plasmid	Vektorhintergrund	Insert
(15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	(8228 bp)
pBK31 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK28 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK 37 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK33 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK38 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK36 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK64 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK52 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK65 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK53 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK76 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK70 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK77 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK71 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK78 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK66 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK79 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK73 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK80 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK75 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	
pBK81 (15440 bp)	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (2778 bp)	pBK72 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (8228 bp)
	pSK29 x <i>Xba</i> I <i>Kpn</i> I (4434 bp)	

***Tabelle 11: Klonierung der SFVmac-Klone pBK30, pBK31, pBK37, pBK38, pBK64, pBK65, pBK76, pBK77, pBK78, pBK79, pBK80 und pBK81***

### **3.1.3 Vergleich von biologisch selektiertem SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> mit klonierten Derivaten**

Durch den Vergleich des biologisch selektierten SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> mit Viren, die durch Transfektion von 293T-Zellen mit den klonierten Plasmiden pBK3, pBK4 und pBK64

gewonnen wurden, sollte ausgeschlossen werden, dass noch andere als die vier in pBK64 hineinklonierten *pol*-Mutationen bzw. Mutationen in weiteren Genen, außerhalb des aus SFVmac<sub>AZTres</sub> in pBK3 bzw. pBK4 hineinklonierten Fragmentes, einen Beitrag zur AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZTres</sub> leisten.

Hierzu wurde zunächst einerseits SFVmac<sub>AZTres</sub> in Zellkultur vermehrt und der Titer bestimmt, andererseits pBK3, pBK4 und pBK64, sowie pSK29 als Kontrolle, jeweils in 293T-Zellen transfiziert, die Virusproduktion induziert, die Viruspartikel geerntet und ebenfalls der Virustiter bestimmt (siehe 2.2.2.8). Dann wurden in einer 12-Loch-Platte je Vertiefung 10<sup>5</sup> BHK/LTR(SFVmac)*lacZ*-Zellen in 3 ml Medium ausgesät und mit einer MOI von 0,001 mit SK29, SFVmac<sub>AZTres</sub>, BK3, BK4 oder BK64 infiziert, jeweils einmal ohne AZT und einmal in Anwesenheit von 50 µM AZT. Alle drei Tage wurde eine *lacZ*-Färbung durchgeführt und die blauen Zellen gezählt bzw. ihr Anteil an der Gesamtzahl der Zellen abgeschätzt (siehe 2.2.2.7). Die Ergebnisse eines typischen derartigen Experimentes sind in *Tabelle 12* dargestellt.

Virus	AZT	3. Tag	6. Tag	9. Tag	12. Tag	15. Tag	18. Tag
SK29	∅	+	+++	++++	Z	Z	Z
SFVmac <sub>AZTres</sub>	∅	+	+++	++++	Z	Z	Z
SFVmac <sub>AZTres</sub>	∅	+	+++	++++	Z	Z	Z
BK3	∅	+	+++	++++	Z	Z	Z
BK4	∅	+	+++	++++	Z	Z	Z
BK64	∅	+	+++	++++	Z	Z	Z
SK29	50 µM	8	2	0	0	0	0
SFVmac <sub>AZTres</sub>	50 µM	19	61	+	++	+++	++++
SFVmac <sub>AZTres</sub>	50 µM	13	52	+	++	+++	++++
BK3	50 µM	14	58	+	++	+++	++++
BK4	50 µM	20	73	+	++	+++	++++
BK64	50 µM	15	60	+	++	+++	++++

***Tabelle 12: Vergleich des biologisch selektierten SFVmac<sub>AZTres</sub> mit klonierten Derivaten***

*Jeweils 10<sup>5</sup> BHK/LTR(SFVmac)*lacZ*-Zellen wurden mit einer MOI von 0,001 durch die entsprechenden Viren infiziert (erste Spalte), ohne AZT oder in Anwesenheit von 50 µM AZT (zweite Spalte). SK29 ist das Virus mit der wildtypischen Sequenz, SFVmac<sub>AZTres</sub> das biologisch selektierte Virus, von dem zwei Chargen getestet*

wurden, BK3 enthält ein mittels PCR aus SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> amplifiziertes Fragment, das die zwei gag- und die vier pol-Mutationen enthält, BK4 enthält ein entsprechendes Fragment nur mit den vier pol-Mutationen (ohne gag-Mutationen). BK64 enthält ebenfalls die vier pol-Mutationen (ohne gag-Mutationen), diese wurden jedoch bei BK64 einzeln mittels zielgerichteter Mutagenese in vitro eingefügt.

An den angegebenen Tagen wurden die Kulturen einer lacZ-Färbung unterzogen.

Zahlen zeigen die tatsächliche Zahl der blauen Zellen an. Waren die blauen Zellen so zahlreich, dass sie nicht mehr ausgezählt werden konnten, wurde ihr Anteil an der Gesamtzahl der Zellen wie folgt abgeschätzt:

+	< 10% blaue Zellen
++	< 25% blaue Zellen
+++	< 50% blaue Zellen
++++	> 50% blaue Zellen
Z	Zellkultur durch CPE zerstört

Das Experiment wurde mehrmals wiederholt und erbrachte dabei stets ähnliche Ergebnisse: Ohne AZT nahm der Anteil der blauen Zellen in allen mit Viren infizierten Zellkulturen relativ rasch zu und nach 12 oder spätestens 15 Tagen war die jeweilige Zellkultur durch CPE zerstört. Der Anteil der blauen Zellen bei Infektion mit den verschiedenen Viren war dabei jeweils gleich, lediglich SK29 schien teilweise geringfügig langsamer zu replizieren. Damit war die Infektionsfähigkeit von BK3, BK4 und BK64 nachgewiesen.

In Anwesenheit von AZT konnte sich das wildtypische Virus SK29 nicht vermehren und ab dem 9. oder 12. Tag wurden keine blauen Zellen mehr nachgewiesen. Die anderen Viren, mit den vier pol-Mutationen oder zusätzlich noch den gag-Mutationen, replizierten etwas langsamer als in Abwesenheit von AZT, die Zahl der blauen und damit der virusinfizierten Zellen nahm jedoch auch in Anwesenheit von AZT stetig zu und nach drei bis vier Wochen war auch hier die Zellkultur durch CPE zerstört. Hiermit war die AZT-Resistenz von BK3, BK4 und BK64 im Vergleich mit SK29 nachgewiesen. Außerdem wurde kein Unterschied zwischen SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub>, BK3, BK4 und BK64 festgestellt, weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von AZT. Damit war nachgewiesen, dass die klonierten Derivate ein dem biologisch selektierten Virus SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> vergleichbares Verhalten in Zellkultur zeigten und dass in

zukünftigen Experimenten auf diese proviralen Konstrukte zurückgegriffen und von ihren Eigenschaften Rückschlüsse auf SFVmac<sub>AZTres</sub> getroffen werden konnten.

Dass insbesondere zwischen SFVmac<sub>AZTres</sub> und BK64 kein Unterschied bezüglich der AZT-Resistenz festgestellt wurde, spricht weiterhin dafür, dass die beiden *gag*-Mutationen sowie die stumme Mutation in *pol* keine entscheidende Rolle bezüglich der AZT-Resistenz spielen, da sich diese in SFVmac<sub>AZTres</sub>, nicht aber in BK64 finden. Auch dass weitere, bisher unentdeckte Mutationen einen Beitrag zur AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZTres</sub> leisten, konnte durch die fehlende Überlegenheit von SFVmac<sub>AZTres</sub> gegenüber BK64 ausgeschlossen werden.

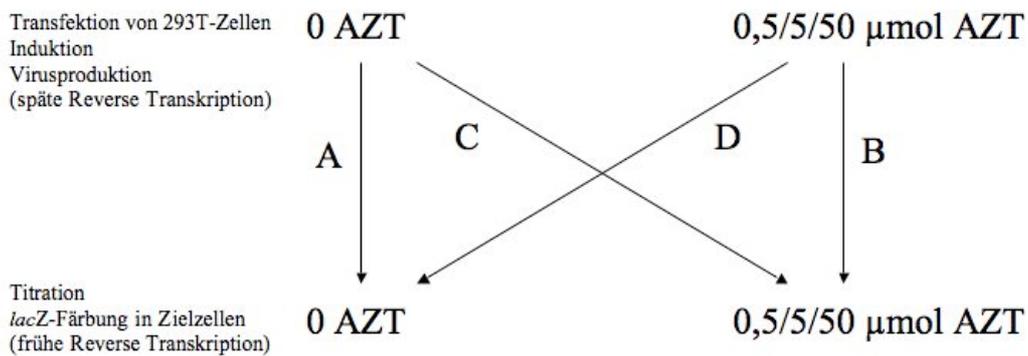
Das Plasmid pBK5, das die *gag*-, nicht jedoch die *pol*-Mutationen enthält, wurde in einem der Versuche ebenfalls verwendet und das entsprechende Virus BK5 zeigte keinen Unterschied im Vergleich mit SK29, was ebenfalls gegen eine Bedeutung der beiden Aminosäuresubstitutionen in Gag bezüglich Replikationskompetenz oder AZT-Resistenz spricht.

### **3.1.4 Optimierung eines Testsystems für AZT-Resistenz**

Aufgrund der Besonderheit im foamyviralen Replikationszyklus, die darin besteht, dass die Reverse Transkription zumindest zu einem großen Anteil nicht wie bei den Orthoretroviren in der Zielzelle sondern in der virusproduzierenden Zelle erfolgt (Yu et al. 1996a; Moebes et al. 1997; Yu et al. 1999), konnte die phänotypische Resistenz von Foamyviren nicht wie bei HIV durch ein Testsystem untersucht werden, in dem eine definierte Menge an Viren auf Zielzellen gegeben wird, denen AZT zugesetzt wurde. Vielmehr musste für eine wirksame Infektionshemmung AZT bei der Virusproduktion oder sowohl in der virusproduzierenden als auch in der infizierten Zelle zugegeben werden (Moebes et al. 1997; Roy et al. 2003). Die Versuche von Moebes et al. und Roy et al., die dies nachgewiesen hatten, dienten der Aufklärung des funktionellen Genoms von PFV bzw. FFV und wurden mit einer AZT-Konzentration von 5 bzw. teilweise 50  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Bei Roy et al. waren ebenfalls Versuche mit pSFV-1 durchgeführt worden, so dass für die in dieser Arbeit erforderlichen Untersuchungen an SFVmac auf dieses Testsystem zurückgegriffen werden konnte. Da jedoch im Gegensatz zu Moebes et al. und Roy et al. nicht die Untersuchung des Zeitpunkts der Reversen Transkription im Vordergrund

stand sondern die Untersuchung der AZT-Resistenz verschiedener Klone auf pSFV-1-Basis, in die mutmaßliche Resistenzmutationen eingefügt worden waren, wurde das Testsystem zunächst auf seine Tauglichkeit diesbezüglich überprüft und etwas erweitert.

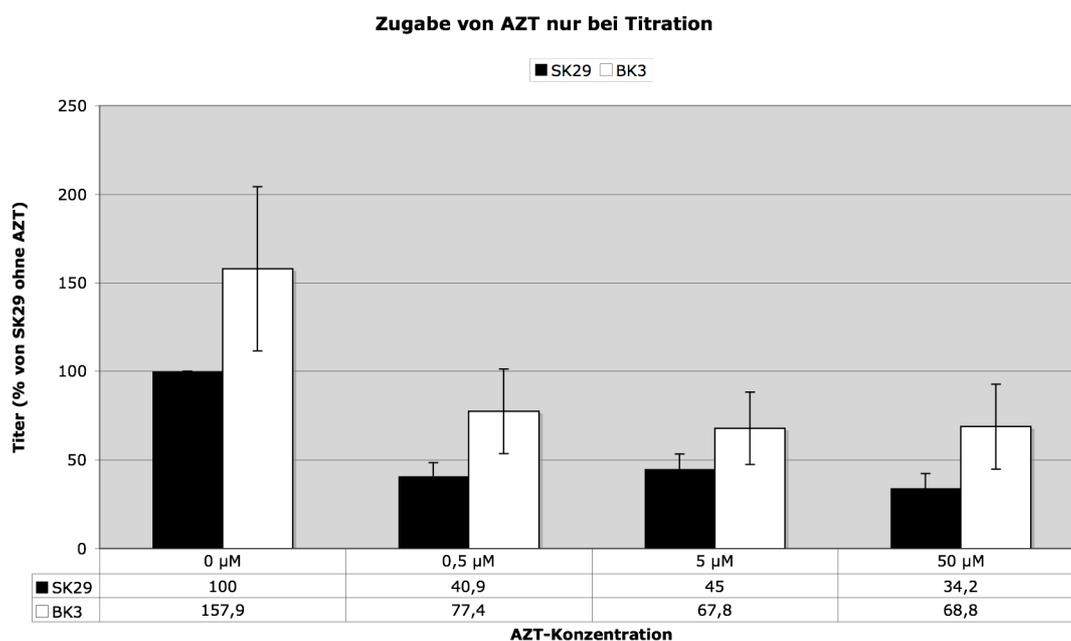
293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pSK29, das in der proviralen Sequenz dem wildtypischen pSFV-1 entspricht, dem Plasmid pBK3, das die beiden *gag*- sowie alle vier *pol*-Mutationen enthält, sowie in einzelnen Versuchen noch weiteren proviralen Konstrukten mit verschiedenen Kombinationen von mutmaßlichen AZT-Resistenz-Mutationen, transfiziert und die Genexpression und damit die Virusproduktion induziert (siehe 2.2.2.5), die Viruspartikel geerntet, auf Indikatorzellen gegeben, eine *lacZ*-Färbung durchgeführt und der Titer ausgezählt (siehe 2.2.2.8). Dies wurde in parallelen Ansätzen in Abwesenheit von AZT durchgeführt, in Anwesenheit von unterschiedlichen AZT-Konzentrationen sowohl bei der Virusproduktion als auch bei der Titration, in Anwesenheit von AZT nur bei der Titration und in Anwesenheit von AZT nur bei der Virusproduktion (*Abbildung 11*). Die AZT-Konzentrationen betragen dabei 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ , in einzelnen Versuchen auch 0,05  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ . Dabei zeigte sich, dass auch das wildtypische SK29-Virus bei einer AZT-Konzentration von 0,05  $\mu\text{M}$  selbst bei Zugabe sowohl bei Virusproduktion als auch bei der Titration kaum gehemmt wurde, weshalb diese Konzentration im Weiteren nicht mehr getestet wurde. Eine AZT-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  wiederum erbrachte gegenüber einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keinen weiteren Informationsgewinn, so dass die Versuche mit dieser hohen AZT-Konzentration ebenfalls nicht weitergeführt wurden.



**Abbildung 11: Versuche zur Untersuchung der AZT-Resistenz mit Zugabe von AZT zu unterschiedlichen Zeitpunkt im viralen Replikationszyklus**

Die Versuche wurden entsprechend den früheren Versuchen zur Untersuchung des funktionellen Genoms der Foamyviren durchgeführt (Moebes et al. 1997; Roy et al. 2003), jedoch mit Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von AZT (0,5 µM, 5 µM und 50 µM) nur bei der Virusproduktion (D), nur bei der Titration (C), oder sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration (B), bzw. als Kontrolle völlig ohne Zugabe von AZT (A).

In den dreimal durchgeführten Versuchen mit SK29 und BK3, sowie jeweils einer AZT-Konzentration von 0 µM, 0,5 µM, 5 µM und 50 µM, bestätigten sich die Ergebnisse, dass eine Zugabe von AZT bei der Titration nur einen geringen Einfluss auf den Virustiter hat (Abbildung 12): Selbst bei einer AZT-Konzentration von 50 µM in den Zielzellen hatte das wildtypische SK29-Virus noch einen Titer von mehr als einem Drittel des Vergleichtiters ohne AZT. Die Suppression von SK29 bei 50 µM AZT auf 34% unterschied sich dabei nur unwesentlich von der Suppression bei niedrigeren Konzentrationen (41% bzw. 45% bei 0,5 µM und 5 µM). BK3 wies in Abwesenheit von AZT einen höheren Titer auf als SK29, der in Anwesenheit von AZT auf weniger als die Hälfte absank, wobei auch hier die Höhe der AZT-Konzentration kaum Einfluss auf den Titer hatte.

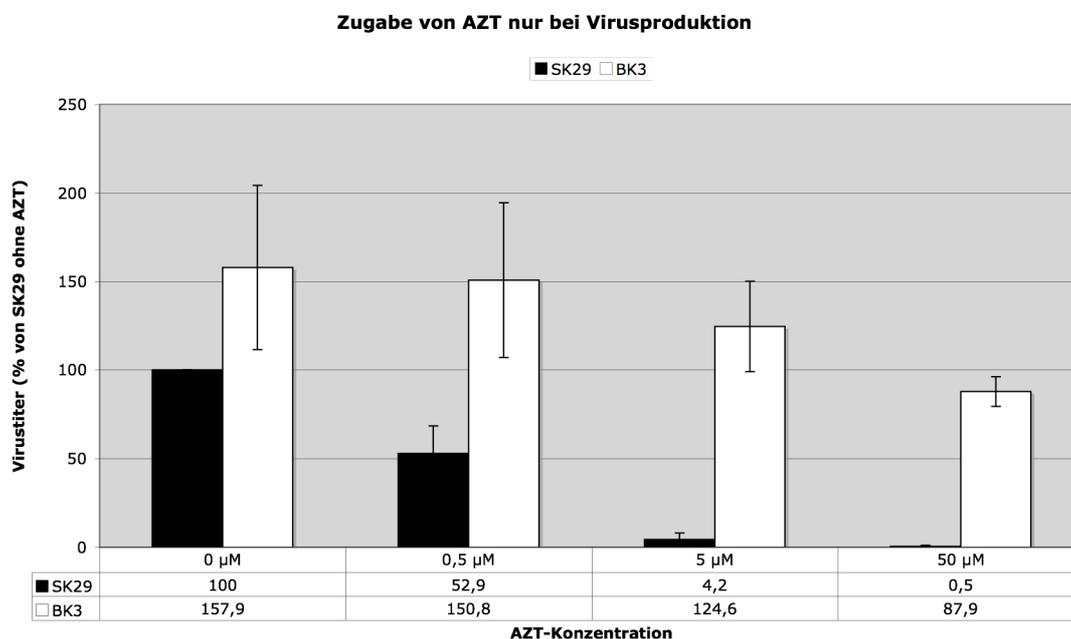


**Abbildung 12: AZT-Resistenz-Versuche mit SK29 und BK3 bei Zugabe unterschiedlicher AZT-Konzentrationen bei der Titration**

AZT-Versuche wurden wie im Text beschrieben durchgeführt in Abwesenheit von AZT und in Anwesenheit von 0,5 µM, 5 µM oder 50 µM AZT in den Zielzellen bei der Titration (C in Abbildung 11). Der Titer von SK29 in Abwesenheit von AZT (A in Abbildung 11) wurde willkürlich als 100% festgesetzt und die anderen Titer auf diesen Wert bezogen. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Balken zeigen die einfache Standardabweichung an.

Bei den Versuchen, in denen AZT nur in der virusproduzierenden Zelle zugegeben wurde (Abbildung 13), bestätigte sich, dass hierdurch die Infektion der Zielzellen durch Viren effizient gehemmt werden kann. Die Inhibition bei 5 µM AZT war dabei mit 4,2% allerdings nicht ganz so ausgeprägt wie in den Versuchen zur Untersuchung des funktionellen Genoms (Moebes et al. 1997; Roy et al. 2003). Auf BK3 hatten dagegen steigende AZT-Konzentrationen nur einen geringen Einfluss, selbst bei 50 µM betrug der Titer noch mehr als die Hälfte des Ausgangstiters von BK3. Im Unterschied zur Zugabe von AZT bei der Titration zeigte sich bei der Zugabe von AZT bei der Virusproduktion, dass steigende AZT-Konzentrationen zu einem abnehmenden Titer führten, bei SK29 ausgeprägter als bei BK3. Das resistente Virus

BK3 hatte dabei bei der Zugabe von AZT bei der Virusproduktion höhere Titer als bei der Zugabe von AZT bei der Titration, also umgekehrt zur Situation bei SK29.

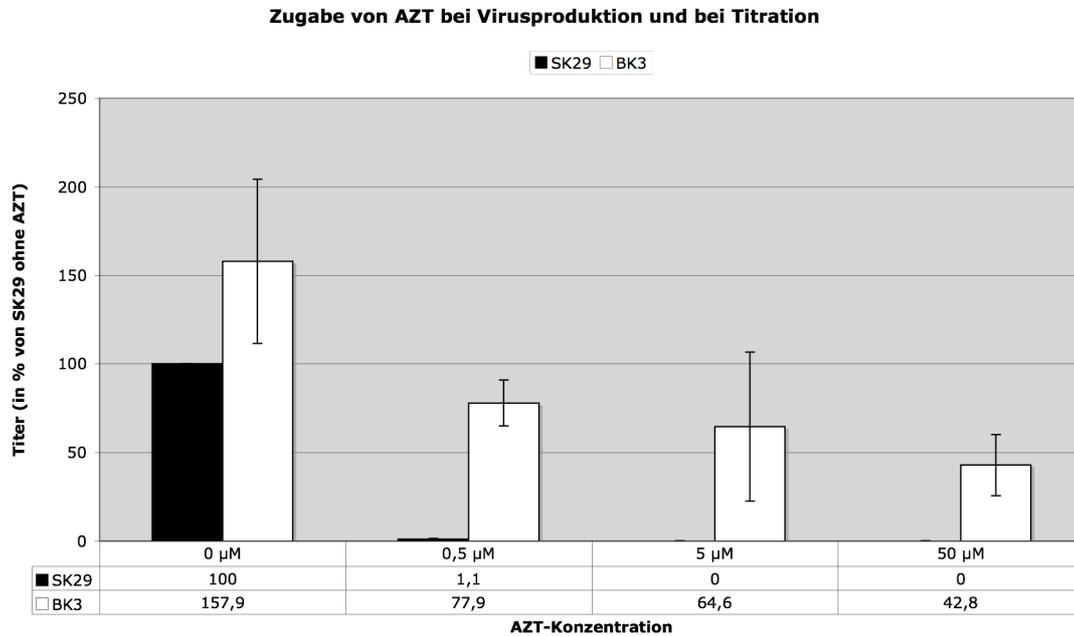


**Abbildung 13: AZT-Resistenz-Versuche mit SK29 und BK3 bei Zugabe unterschiedlicher AZT-Konzentrationen bei der Virusproduktion**

AZT-Versuche wurden wie im Text beschrieben durchgeführt in Abwesenheit von AZT und in Anwesenheit von 0,5 µM, 5 µM oder 50 µM AZT bei der Virusproduktion (D in Abbildung 11). Der Titer von SK29 in Abwesenheit von AZT wurde willkürlich als 100% festgesetzt und die anderen Titer auf diesen Wert bezogen. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Balken zeigen die einfache Standardabweichung an.

Am effizientesten wurde die Replikation der Viren gehemmt, wenn AZT bei der Virusproduktion und bei der Titration zugegeben wurde (Abbildung 14). BK3 zeigte sich jedoch auch hier insofern resistent, als selbst bei AZT-Konzentrationen von 50 µM noch ein Titer erzielt wurde, der etwa einem Viertel des Ausgangstiters von BK3 entsprach, während SK29 bereits bei 0,5 µM AZT nur noch einen Titer von 1,1% aufwies und bei 5 oder 50 µM AZT keine blauen Zellen mehr nachweisbar waren.

Auffällig ist, dass SK29 bei Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT nur bei der Virusproduktion oder nur bei der Titration auf 43% bzw. 51% supprimiert wurde, bei Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration jedoch auf 1%.



**Abbildung 14: AZT-Resistenz-Versuche mit SK29 und BK3 bei Zugabe unterschiedlicher AZT-Konzentrationen sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration**

AZT-Versuche wurden wie im Text beschrieben durchgeführt in Abwesenheit von AZT und in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  AZT sowohl in den virusproduzierenden Zellen als auch in den Zielzellen bei der Titration (B in Abbildung 11). Der Titer von SK29 in Abwesenheit von AZT wurde willkürlich als 100% festgesetzt und die anderen Titer auf diesen Wert bezogen. Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Balken zeigen die einfache Standardabweichung an.

Insgesamt zeigte sich, dass bei Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  in diesem System die AZT-Resistenz gut zu untersuchen ist und der Unterschied zwischen wildtypischem SK29 und dem die mutmaßlichen Resistenz-Mutationen tragenden BK3 am besten darstellbar ist, wenn AZT sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration zugegeben wird.

### 3.1.5 Überprüfung der Proteinexpression der proviralen SFVmac-Konstrukte

Um den jeweiligen Beitrag der vier *pol*-Mutationen zur AZT-Resistenz zu untersuchen, waren auf der Grundlage von pSFV-1 mittels zielgerichteter PCR-Mutagenese *in vitro* provirale Konstrukte hergestellt worden, die jeweils eine bestimmte Kombination der in SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> festgestellten vier mutmaßlichen AZT-Resistenz-Mutationen im *pol*-Gen tragen (siehe 3.1.2). Diese Konstrukte sollten nun alle mit dem in 3.1.4 optimierten Testsystem auf ihre AZT-Resistenz untersucht werden.

Zunächst wurde jedoch die Proteinexpression von Gag und Pol der jeweiligen Konstrukte untersucht, um auszuschließen, dass die eingeführten Mutationen zu einer Änderung der Stabilität oder anderer Eigenschaften des Pol-Proteins führen. Hierfür wurden 293T-Zellen mit den in *Tabelle 13* aufgeführten Plasmiden jeweils transfiziert und nach Induktion der Virusproduktion mittels Western Blot die Proteine Gag und Pol in Zelllysaten und in Viruspartikeln nachgewiesen.

Virus <sup>1</sup>	Anzahl der Mutationen (Gag / Pol)	Aminosäure in Gag		Aminosäure in Pol			
		535	596	211	224	345	350
SK29	0 / 0	R	G	K	I	S	E
BK30	0 / 1	R	G	I	I	S	E
BK65	0 / 1	R	G	K	T	S	E
SK50	0 / 1	R	G	K	I	T	E
SK51	0 / 1	R	G	K	I	S	K
BK81	0 / 2	R	G	I	T	S	E
BK38	0 / 2	R	G	I	I	T	E
BK31	0 / 2	R	G	I	I	S	K
BK78	0 / 2	R	G	K	T	T	E
BK76	0 / 2	R	G	K	T	S	K
SK39	0 / 2	R	G	K	I	T	K

BK80	0 / 3	R	G	I	T	T	E
BK77	0 / 3	R	G	I	T	S	K
BK37	0 / 3	R	G	I	I	T	K
BK79	0 / 3	R	G	K	T	T	K
BK64	0 / 4	R	G	I	T	T	K
BK4	0 / 4	R	G	I	T	T	K
BK3	2 / 4	Q	R	I	T	T	K

**Tabelle 13: Übersicht der von pSFV-1 abgeleiteten infektiösen Klone mit AZT-Resistenz-Mutationen**

Mutationen gegenüber der wildtypischen SK29-Sequenz sind fett hervorgehoben. BK64 und BK4 weisen die gleiche Sequenz auf und enthalten beide die vier pol-Mutationen. In pBK64 wurden diese sukzessive mittels zielgerichteter Mutagenese eingeführt, während pBK4 ein mittels PCR aus dem biologisch selektierten SFV<sub>mac</sub><sup>AZT<sup>res</sup></sup> amplifiziertes Fragment enthält, das die vier pol-Mutationen umfasst.

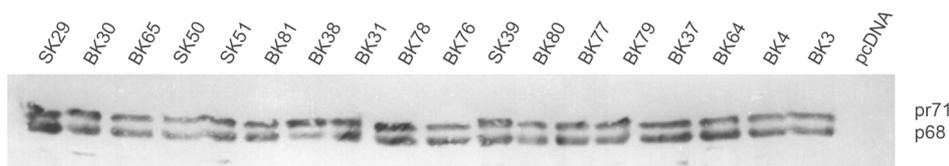
<sup>1</sup> Die den Viren entsprechenden Plasmide haben jeweils ein "p" vorangestellt, also pSK29, pBK30 etc.

Für die Herstellung der im Western Blot eingesetzten Antikörper war es dabei nötig gewesen, die Proteine einzeln in Bakterien zu exprimieren und aufzureinigen, um damit Kaninchen immunisieren zu lassen. Für die Aufreinigung von Pol wurde zunächst das *pol*-Gen aus pSFV-1 mittels PCR amplifiziert (siehe 2.2.1.12) und in pET28c, einen Expressionsvektor mit His-Tag, kloniert. In der PCR kamen dabei mutagene Primer zum Einsatz, die proximal eine *Nco*I-Schnittstelle im Bereich des Startcodons einfügten und distal das Stopcodon entfernten und eine *Sal*I-Schnittstelle einfügten. Damit konnte das PCR-Produkt mit diesen Restriktionsenzymen verdaut werden und in den entsprechend geöffneten Vektorhintergrund pET28c hineinligiert werden. In dem entstandenen Konstrukt pBK1 hat Pol nun ein C-terminales His-Tag. Da jedoch die in *pol* kodierte Protease eine Erkennungssequenz innerhalb von Pol besitzt, konnte das Pol-Vorläuferprotein mit diesem Konstrukt noch nicht ohne Weiteres aufgereinigt werden, weil bei der Proteinexpression die Protease die Integrase samt His-Tag vom Rest des Proteins (PR-RT/RH) abspalten würde. Vielmehr musste die Protease durch die Mutation von Aspartat nach Alanin im

aktiven Zentrum inaktiviert werden (D24A) und/oder das His-Tag an das Ende der RT/RH und nicht an das Ende des Pol-Vorläuferproteins und damit der Integrase gekoppelt werden. Dieser Klonierungsschritt, sowie die Proteinexpression und Aufreinigung von PR-RT/RH über His-Tag, wurde von Birgitta Wöhl und Arbeitsgruppe in Bayreuth durchgeführt.

Für die Untersuchung der Proteinexpression in Zelllysaten wurden jetzt 293T-Zellen ausgesät, mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert (siehe 2.2.2.5) und die Virusproduktion mit Natriumbutyrat induziert. Dann wurden die Zellen lysiert (siehe 2.2.2.10), die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.1) und in einem Western Blot Gag bzw. Pol mit den jeweiligen polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen nachgewiesen (siehe 2.2.3.2).

Beim Western Blot mit  $\alpha$ -SFVmac/Gag als primären Antikörper und goat- $\alpha$ -rabbit als sekundärem Antikörper zum Nachweis von Gag in den Zelllysaten (*Abbildung 15*) stellten sich die erwarteten Banden des ungespaltenen Vorläuferproteins (71 kDa) und des prozessierten Gag-Proteins (68 kDa) dar. Die Expression in den mutierten Varianten zeigte dabei untereinander und gegenüber dem wildtypischen Konstrukt keinen ersichtlichen Unterschied.



***Abbildung 15: Western Blot zum Nachweis der Expression von Gag in Zelllysaten***

*Mit den entsprechenden Plasmiden oder pcDNA als Negativkontrolle transfizierte 293T-Zellen wurden lysiert und die Gag-Expression in einem Western Blot mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper  $\alpha$ -SFVmac/Gag als primärem Antikörper und goat- $\alpha$ -rabbit als sekundärem Antikörper nachgewiesen.*

Der Western Blot zum Nachweis von Pol erbrachte ebenfalls eine in allen Konstrukten etwa gleichmäßige Expression des Pol-Vorläuferproteins (*Abbildung 16*). Neben einigen unspezifischen Banden unterschiedlicher Größen, die auch in der

Negativkontrolle nachweisbar waren, fand sich auch eine schwache Bande von etwa 85 kDa, dem prozessiertem PR-RT/RH entsprechend, in allen Zelllysaten außer der mit pcDNA transfizierten Negativkontrolle (nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Western Blot zum Nachweis der Expression von Pol in Zelllysaten**

Mit den entsprechenden Plasmiden oder pcDNA als Negativkontrolle transfizierte 293T-Zellen wurden lysiert und die Pol-Expression in einem Western Blot mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper  $\alpha$ -SFVmac/Pol als erstem und goat- $\alpha$ -rabbit als zweitem Antikörper nachgewiesen.

Die Viruspartikelpräparation (siehe 2.2.2.11) aus dem Überstand transfizierter 293T-Zellen erbrachte beim Einsatz von  $\alpha$ -SFVmac/Gag im Western Blot den Nachweis des prozessierten Gag-Proteins von 68 kDa und schwächer ausgeprägt des unprozessierten Vorläuferproteins von 71 kDa (Abbildung 17). Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten bezüglich dem Nachweis von Gag in den Viruspartikeln wurden nicht festgestellt, die in der Abbildung zu sehende schwächere Ausprägung der Bande von BK30 war in einem anderen Versuch nicht nachweisbar.

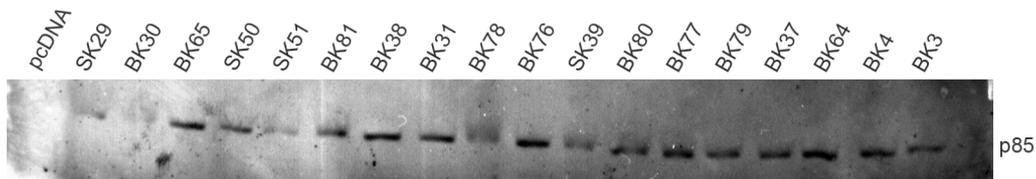


**Abbildung 17: Western Blot zum Nachweis von Gag in Viruspartikeln**

293T-Zellen wurden mit den entsprechenden proviralen Konstrukten oder pcDNA als Negativkontrolle transfiziert, induziert, der Virusüberstand geerntet und die Viruspartikel aufgereinigt. Im Western Blot mit  $\alpha$ -SFVmac/Gag als primärem

*Antikörper und goat- $\alpha$ -rabbit als sekundärem Antikörper erfolgte der Nachweis von  $pr71^{Gag}$  und  $p68^{Gag}$ .*

In der Untersuchung der Viruspartikel mit  $\alpha$ -SFVmac/Pol stellte sich bei allen Konstrukten eine relativ schwache, in der Negativkontrolle nicht nachweisbare Bande von 85 kDa dar, die dem Pol-Spaltprodukt PR-RT/RH entspricht (*Abbildung 18*). Dabei wies die Ausprägung der Bande eine gewisse Variation zwischen den einzelnen Konstrukten auf. Jedoch war in der Zusammenschau mehrerer derartiger Versuche nicht feststellbar, dass ein bestimmtes Virus weniger Pol als andere enthielt, so dass die Unterschiede als nicht signifikante Variation gedeutet wurden. Andere Banden, etwa eine des Pol-Vorläuferproteins, waren nicht nachweisbar.



**Abbildung 18: Western Blot zum Nachweis von Pol in Viruspartikeln**

*293T-Zellen wurden mit den entsprechenden proviralen Konstrukten oder pcDNA als Negativkontrolle transfiziert, induziert, der Virusüberstand geerntet und die Viruspartikel aufgereinigt. Im Western Blot mit  $\alpha$ -SFVmac/Pol als primärem Antikörper und goat- $\alpha$ -rabbit als sekundärem Antikörper erfolgte der Nachweis von  $p85^{Pol}$  (PR-RT/RH).*

Insgesamt wurde durch den Nachweis von Gag und Pol in Zelllysaten und Viruspartikeln gezeigt, dass alle klonierten Derivate in vergleichbarem Ausmaß diese Proteine exprimieren und verpacken. Da ein Einfluss der AZT-Resistenz-Mutationen auf die Viruspartikelproduktion an sich damit weitgehend ausgeschlossen ist, konnten also in den folgenden Untersuchungen Unterschiede in den Titern der einzelnen Viren mit höherer Wahrscheinlichkeit auf die Reverse Transkription bei unterschiedlichen AZT-Konzentrationen und den Einfluss der mutmaßlichen AZT-Resistenz-Mutationen auf die Reverse Transkription zurückgeführt werden.

### 3.1.6 AZT-Resistenz der mutierten proviralen SFV<sub>mac</sub>-Konstrukte

Alle mutierten SFV<sub>mac</sub>-Klone, deren gleichmäßige Gag- und Pol-Expression nachgewiesen worden war (siehe 3.1.5), wurden nun mittels des in 3.1.4 beschriebenen Testsystems durch Transfektion von 293T-Zellen, Virusproduktion bei unterschiedlichen AZT-Konzentrationen und Titration in Indikatorzellen, ebenfalls in Anwesenheit der jeweiligen AZT-Konzentration, auf ihre Sensitivität gegenüber Zidovudin untersucht (Tabelle 14).

Virus/ Mutationen		AZT-Konzentration bei Virusproduktion und Titration			
		0 µM	0,5 µM	5 µM	50 µM
		Virustiter in % des Virustiters von SK29 ohne AZT			
SK29	KISE	100,0 (*)	0,7 ± 0,5	<0,1	<0,01
BK30	IISE	1,2 ± 1,2	<0,1	<0,1	<0,01
BK65	KTSE	146,5 ± 21,4	1,2 ± 0,9	<0,1	<0,01
SK50	KITE	40,0 ± 16,8	5,6 ± 3,2	1,1 ± 1,0	<0,1
SK51	KISK	31,7 ± 8,8	1,8 ± 0,8	<0,1	<0,01
BK81	ITSE	2,5 ± 0,6	<0,1	<0,1	<0,01
BK38	IITE	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
BK31	IISK	23,0 ± 7,9	0,6 ± 0,5	<0,1	<0,01
BK78	KTTE	86,7 ± 20,5	18,7 ± 12,9	0,5 ± 0,3	<0,1
BK76	KTSK	175,5 ± 33,9	8,1 ± 4,5	<0,1	<0,01
SK39	KITK	20,6 ± 5,5	10,8 ± 7,5	3,0 ± 2,1	1,0 ± 0,6
BK80	ITTE	7,3 ± 3,6	4,0 ± 2,7	1,0 ± 0,8	0,3 ± 0,2
BK77	ITSK	33,6 ± 11,3	3,8 ± 3,0	0,9 ± 0,5	<0,01
BK37	IITK	8,6 ± 2,7	5,9 ± 3,0	2,8 ± 1,3	2,0 ± 0,8
BK79	KTTK	138,2 ± 21,8	86,9 ± 11,5	16,4 ± 10,9	1,4 ± 0,4

<b>BK64</b>	<b>ITTK</b>	<b>113,0 ± 19,2</b>	<b>79,3 ± 20,1</b>	<b>68,8 ± 18,8</b>	<b>31,4 ± 20,6</b>
<b>BK4</b>	<b>ITTK</b>	<b>117,0 ± 18,4</b>	<b>84,3 ± 27,8</b>	<b>71,0 ± 12,7</b>	<b>34,9 ± 12,9</b>
<b>BK3</b>	<b>ITTK</b>	<b>92,7 ± 22,7</b>	<b>75,6 ± 23,4</b>	<b>64,4 ± 19,2</b>	<b>34,4 ± 15,1</b>

**Tabelle 14: AZT-Resistenz der mutierten SFV<sub>mac</sub>-Konstrukte**

Die in der ersten Spalte angegebenen Viren wurden wie im Text beschrieben auf ihre AZT-Resistenz hin untersucht. In der zweiten Spalte ist zur besseren Übersicht nochmals die jeweilige Aminosäure an den Positionen der mutmaßlichen AZT-Resistenz-Mutationen 211, 224, 345 und 350 in Pol angegeben (Fettdruck bei Mutation gegenüber dem wildtypischen SK29; bezüglich BK64, BK4 und BK3 siehe Tabelle 13). Der Virustiter von SK29 in Abwesenheit von AZT (im Schnitt  $7,0 \times 10^4$ ) wurde willkürlich als 100% festgesetzt (\*). Die in der Tabelle angegebenen Werte der Klone bei den unterschiedlichen AZT-Konzentrationen (jeweils sowohl bei Virusproduktion und bei Titration) in der dritten bis sechsten Spalte verstehen sich also als Prozentwerte des Ausgangstiters von SK29 ohne AZT. Sie sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die einfache Standardabweichung ist angegeben.

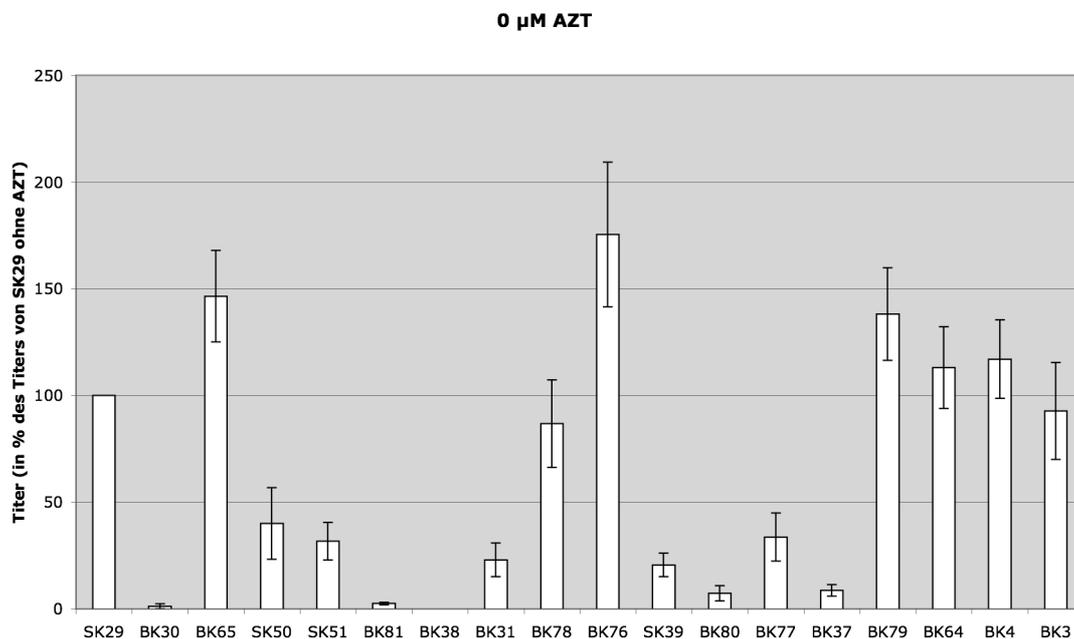
Bei der Untersuchung des Titers der Varianten in Abwesenheit von AZT zeigten sich dabei deutliche Unterschiede in der Fitness der jeweiligen Viren (Abbildung 19). BK65<sub>KTSE</sub>, BK78<sub>KTTE</sub>, BK76<sub>KTSK</sub>, BK79<sub>KTTK</sub>, sowie die Konstrukte mit allen vier Aminosäuresubstitutionen in Pol (BK64<sub>ITTK</sub>, BK4<sub>ITTK</sub>, BK3<sub>ITTK</sub>) wiesen dabei mit 86 bis 175 Prozent des Titers von SK29<sub>KISE</sub> einen ähnlich hohen oder eventuell gar höheren Titer auf als der wildtypische Klon. Alle Viren aus dieser Gruppe mit einem hohen Titer in Abwesenheit von AZT, abgesehen vom wildtypischen SK29, weisen dabei die Mutation I224T in Pol auf. Außerdem weisen alle Konstrukte dieser Gruppe, abgesehen von den Vierfachmutanten BK64, BK4 und BK3, an Position 211 das wildtypische Lysin (K) auf.

In einer mittleren Gruppe fanden sich bei SK50<sub>KITE</sub>, SK51<sub>KISK</sub>, BK31<sub>IISK</sub>, SK39<sub>KITK</sub> und BK77<sub>ITSK</sub> ein Titer zwischen 20 und 40 Prozent des Vergleichstiters von SK29, bei BK80<sub>ITTE</sub> und BK37<sub>ITTK</sub> von 7,3% bzw. 8,6%.

Die Klone BK81<sub>ITSE</sub> und BK30<sub>IIE</sub> wiederum wiesen mit 2,5% bzw. 1,2% die niedrigsten Titer auf, abgesehen von BK38<sub>IITE</sub>, bei dem in der *lacZ*-Färbung keine blauen Zellen nachweisbar waren. Die vier Klone mit den niedrigsten Titern in Abwesenheit von AZT weisen damit alle die Mutation K221I auf und gleichzeitig an Position 350 das wildtypische Glutamat (E350).

Einige Kombinationen an Resistenzmutationen haben demnach einen negativen Einfluss auf die virale Fitness in Abwesenheit von AZT, während andere, z. B. auch die Kombination aller vier Mutationen, keinen negativen Effekt oder sogar eine leicht positive Tendenz aufweisen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich mit dem Virustiter von SK29 zeigten hierbei im zweiseitigen t-Test die Virustiter von BK30, SK51, BK81, BK38, BK31, SK39, BK80, BK77 und BK37. Dagegen konnte bei BK65, SK50, BK78, BK76, BK79, BK64, BK4 und BK3 in dieser Arbeit ein statistisch signifikanter Unterschied zu SK29 nicht nachgewiesen werden, so dass strenggenommen jeweils nur von einer Tendenz gesprochen werden kann.



**Abbildung 19: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Abwesenheit von AZT**

In Anwesenheit von 0,5  $\mu$ M AZT bei Virusproduktion und Titration (Abbildung 20), der niedrigsten näher untersuchten AZT-Konzentration, war das wildtypische SK29-

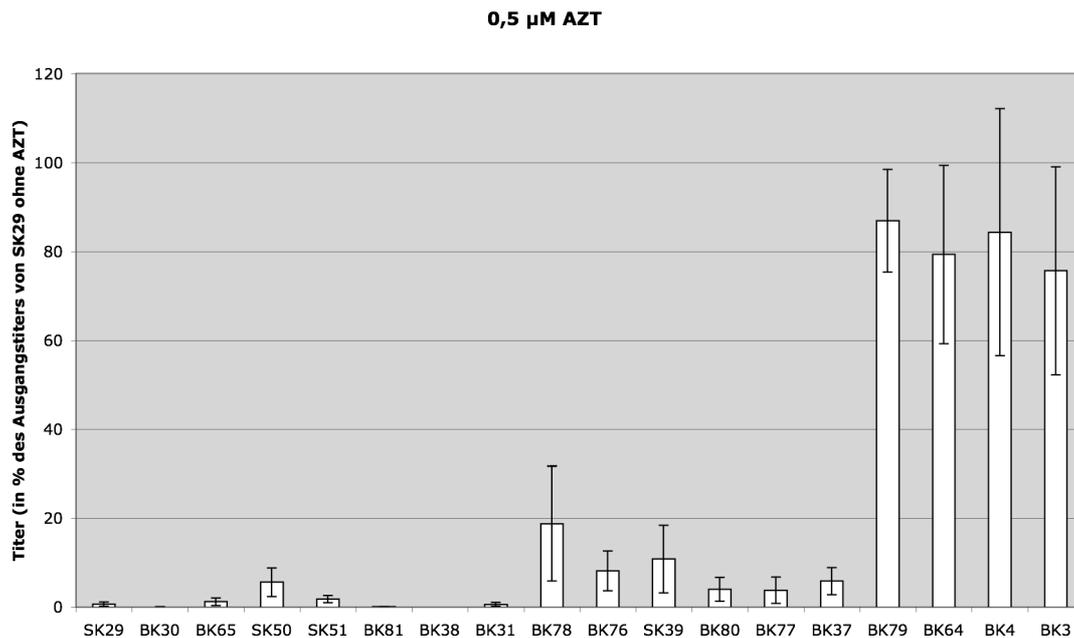
Virus bereits auf unter 1% seines Ausgangstiters supprimiert. Bei BK81<sub>ITSE</sub> und BK30<sub>IISE</sub>, die bereits in Abwesenheit von AZT sehr niedrige Titer aufgewiesen hatten, fanden sich Werte von unter 0,1%. Die Einzelmutanten BK65<sub>KTSE</sub> und SK51<sub>KISK</sub>, sowie die Doppelmutante BK31<sub>IISK</sub> wiesen Titer von unter 2% des Titers von SK29<sub>KISE</sub> in Abwesenheit von AZT auf.

Bei der Einzelmutante SK50<sub>KITE</sub> dagegen wurde mit 5,6% ein Wert nachgewiesen, der achtfach über demjenigen von SK29 bei 0,5 µM AZT liegt. Vergleichbare Werte (zwischen 3,8% und 5,9%) fanden sich bei den Dreifachmutanten BK77<sub>ITSK</sub>, BK80<sub>ITTE</sub> und BK37<sub>IITK</sub>, etwas höhere bei den Doppelmutanten SK39<sub>KITK</sub>, BK76<sub>KTSK</sub> und BK78<sub>KTTE</sub> (zwischen 8,1% und 18,7%).

Die mit Abstand höchsten Werte wiesen die Dreifachmutante BK79<sub>KTTK</sub> (86,9%) sowie die Vierfachmutanten BK64, BK4 und BK3 (zwischen 75,6% und 84,3%) auf.

Während also das wildtypische SK29 in Anwesenheit von 0,5 µM AZT (sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration) von seinem auf 100% festgesetztem Ausgangstiter ( $7,0 \times 10^4$  in Abwesenheit von AZT) auf einen Wert von 0,7% supprimiert wird, zeigen sich eine Reihe von Mutanten weitaus weniger sensitiv: Die Einfachmutante SK50<sub>KITE</sub> weist bei 0,5 µM bereits einen achtfach höheren Titer auf als SK29, die Doppelmutante BK78<sub>KTTE</sub> einen mehr als 25fachen, die Dreifachmutante BK79<sub>KTTK</sub> ebenso wie die Vierfachmutanten einen über 100fachen.

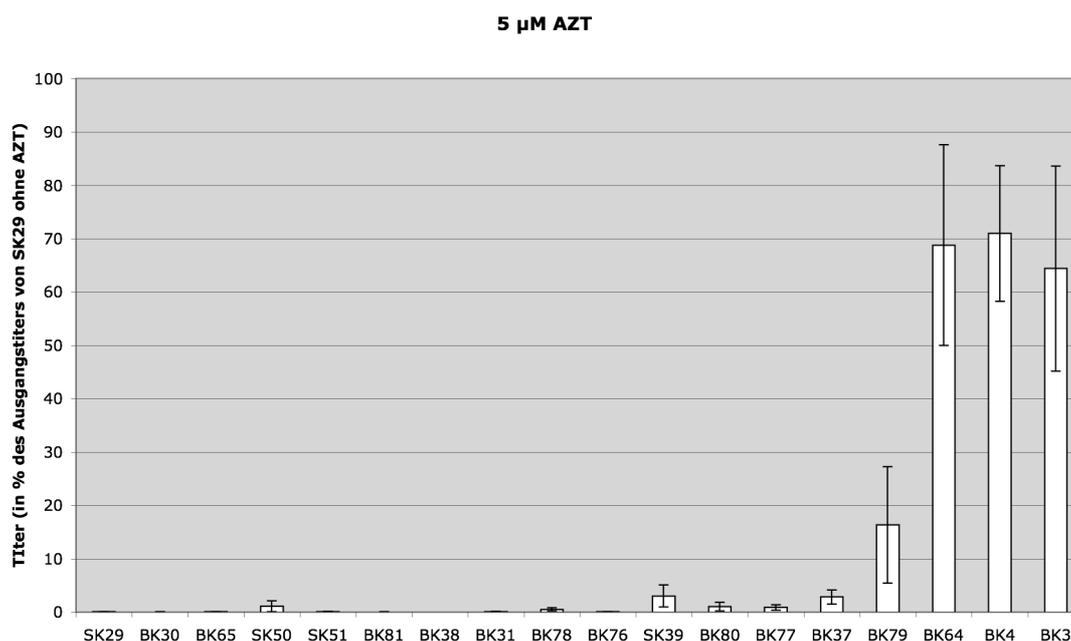
Beim Vergleich der jeweiligen Virustiter mit den gemessenen Virustitern von SK29 in Anwesenheit von 0,5 µM AZT zeigte sich dabei im zweiseitigen t-Test, dass einige Veränderungen statistisch signifikant waren und die Teilresistenz dieser Konstrukte damit nachgewiesen werden konnte. Dies gilt für SK50, BK76, BK80, BK37, BK79, BK64 und BK4 im Sinne eines  $p < 0,05$  und für BK30, SK51, BK81, BK38, BK31, SK39, BK77 und BK3 mit einem  $p < 0,1$ .



**Abbildung 20: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Anwesenheit von 0,5  $\mu$ M AZT**

In Anwesenheit von 5  $\mu$ M AZT bei Virusproduktion und Titration (*Abbildung 21*) findet sich beim wildtypischen SK29<sub>KISE</sub> ein Titer von weniger als 0,1% des Ausgangstiters in Abwesenheit von AZT. Auch drei der vier Einfachmutanten und vier der sechs Doppelmutanten weisen einen solchen Wert auf. Ausnahmen stellen die Einzelmutante SK50<sub>KITE</sub> (1,1%), sowie die Doppelmutanten BK78<sub>KTTE</sub> (0,5%) und SK39<sub>KITK</sub> (3,0%) dar, die allesamt die Mutation S345T aufweisen. Ähnliche Werte finden sich mit 0,9% bis 2,8% auch bei drei der Dreifachmutanten. Die vierte Dreifachmutante BK79<sub>KTTK</sub> weist mit 16,4% einen deutlich höheren Wert auf, der jedoch wiederum um einiges niedriger ausfällt als die Ergebnisse der Vierfachmutanten (zwischen 64,4% und 71,0%).

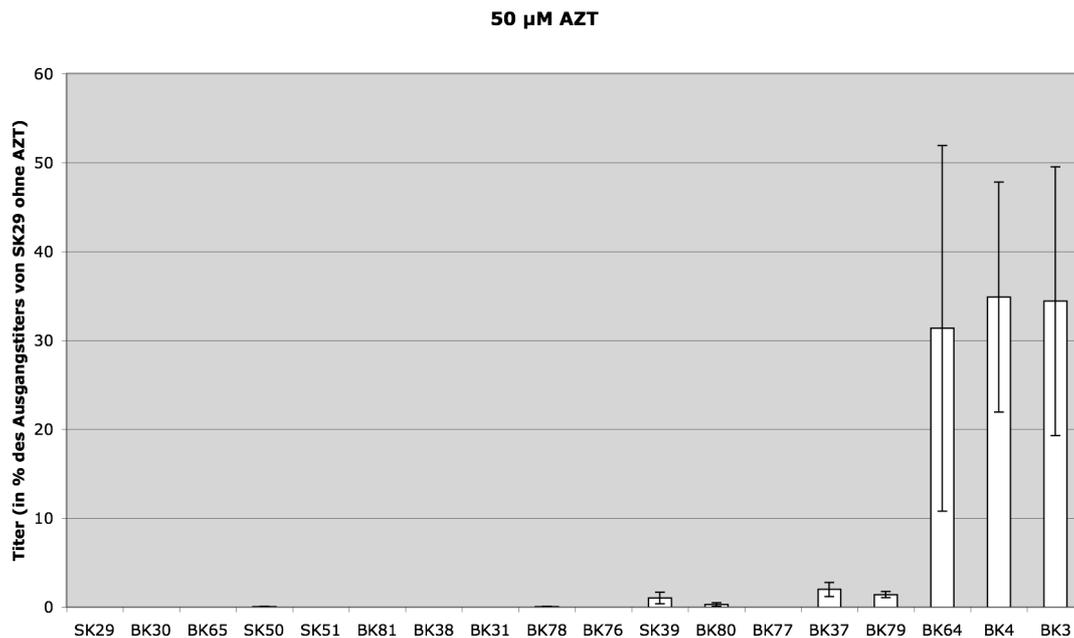
Im t-Test ergab sich dabei bei BK77<sub>ITSK</sub> und BK4 ein  $p < 0,05$ , bei SK39, SK50, BK38, BK78, BK80, BK37, BK64 und BK3 ein  $p < 0,1$ .



**Abbildung 21: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Anwesenheit von 5  $\mu$ M AZT**

In Anwesenheit von 50  $\mu$ M AZT wiesen neben dem wildtypischen SK29 auch alle vier Einfachmutanten, fünf von sechs Doppelmutanten und mit BK77<sub>ITSK</sub> eine Dreifachmutante Werte von unter 0,1% des Ausgangstiters von SK29 in Abwesenheit von AZT auf (*Abbildung 22*). Einzige Doppelmutante, die noch in Anwesenheit von 50  $\mu$ M eine gewisse Replikation zeigte, war SK39<sub>KITK</sub> mit 1,0%. Den höchsten Wert unter den Dreifachmutanten zeigte mit 2,0% BK37<sub>ITTK</sub>. BK79<sub>KTTK</sub>, das bei 0,5  $\mu$ M und 5 $\mu$ M jeweils noch mit Abstand den höchsten Wert aufwies, lag mit 1,4% etwas niedriger. Die Vierfachmutanten replizierten auch bei 50  $\mu$ M noch recht gut (Werte zwischen 31,4% und 34,9%).

Statistisch signifikant ( $p < 0,05$  im t-Test) waren dabei die Virustiter von BK37, BK79, BK64, BK4 und BK3 gegenüber SK29 verändert, bei SK39 und BK80 fand sich ein  $p < 0,07$ .



**Abbildung 22: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Anwesenheit von 50  $\mu$ M AZT**

Insgesamt ist festzuhalten, dass alle vier Mutationen zur AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> beitragen, da in Anwesenheit von 5 oder 50  $\mu$ M AZT keine der Einzel-, Doppel- oder Dreifachmutanten einen annähernd hohen Titer wie die Vierfachmutanten aufweist. Bei vielen Mutanten fand sich jedoch ein Titer, der zwischen SK29 und den Vierfachmutanten lag, und damit für eine gewisse Teilresistenz der jeweiligen Klone spricht, wobei für einige Konstrukte bei verschiedenen AZT-Konzentrationen auch eine statistische Signifikanz dieser Teilresistenz herausgearbeitet werden konnte.

## 3.2 Versuche zur Gewinnung eines AZT-resistenten PFV

### 3.2.1 Einfügen möglicher AZT-Resistenz-Mutationen in pczHSRV2

Im Gegensatz zu SFVmac konnte in Zellkultur kein AZT-resistentes PFV gewonnen werden (siehe 3.1.1.1). Um die Hintergründe hierfür zu untersuchen, wurden die in der Reversen Transkriptase von SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> gefundenen Aminosäuresubstitutionen soweit möglich in den infektiösen Klon pczHSVR2 eingeführt, um diese PFV-

Mutanten dann in dem für die SFV<sub>mac</sub>-Klone beschriebenen Testsystem auf ihre AZT-Resistenz hin zu untersuchen.

Da SFV<sub>mac</sub> und PFV an den Positionen 345 und 350 in Pol die gleiche Aminosäure aufweisen, konnten die bei SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> selektierten Mutationen S345T und E350K analog in PFV eingeführt werden. An Position 224 war bei SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> ein Threonin gegenüber dem Isoleucin in der Ausgangssequenz selektiert worden. Bei PFV befindet sich bereits in der wildtypischen Sequenz ein Threonin (siehe 3.1.1.5), so dass an dieser Stelle keine Mutagenese durchzuführen war. Als Aminosäure 211 (an dieser Stelle Mutation von Lysin zu Isoleucin bei SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub>) findet sich bei PFV ein Arginin. Dieses wurde in der Mutagenese durch ein Isoleucin ersetzt. Dabei war für die Mutation des Codons in PFV eine Substitution von zwei Nukleinsäuren notwendig (AGG zu ATA) im Gegensatz zur Situation bei SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub>, bei dem nur der Austausch einer einzelnen Base nötig war (AAA zu ATA).

Die Mutationen wurden nacheinander in den infektiösen PFV-Klon pczHSRV2 eingefügt. Auf diesem Plasmid befindet sich neben den bei pSFV-1 beschriebenen regulatorischen Sequenzen für die Vermehrung in Bakterien ein PFV-Genom unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Moebes et al. 1997). Für das Einführen der Mutationen war dabei zunächst die Konstruktion eines geeigneten Zwischenklons notwendig, in dem eine zielgerichtete Mutagenese mit anschließendem *DpnI*-Verdau (siehe 2.2.1.15) durchgeführt werden konnte, und aus dem dann das Fragment mit den jeweiligen Mutationen ausgeschnitten und in pczHSRV2 hineinkloniert werden konnte. Hierfür wurde eine Sequenz aus pczHSRV2, die bei einer Länge von 1,8 kb den Bereich der *pol*-Mutationen einschließt, in das mit 2,7 kb gewünschte kleine Plasmid pUC18 kloniert. Da dieses Plasmid im Polylinker nicht die passenden Restriktionserkennungssequenzen (für *PacI* und *SwaI*) enthielt, mussten diese vorher eingefügt werden. Dies geschah durch Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotide, die so konstruiert wurden, dass sie zwischen zwei Erkennungssequenzen, die auch im Polylinker enthalten sind (*XbaI* und *KpnI*), die beiden gewünschten Nukleotidabfolgen aufweisen, und Einfügen dieses hybridisierten Oligonukleotids in den entsprechend geöffneten Vektor pUC18. Das entstandene Plasmid pBK9 konnte nun mit *PacI* und *SwaI* geöffnet werden, um das entsprechend ausgeschnittene 1,8-kb-Fragment aus dem *pol*-Gen von pczHSRV2 einzufügen. Mit

4,5 kb wies das hieraus erhaltene Zwischenplasmid pBK14 eine geeignete Größe auf, um zielgerichtete Mutagenesen mit anschließendem *DpnI*-Verdau durchzuführen. Das jeweilige 1,8-bp-Fragment konnte nach der Mutagenese mit *PacI* und *SwaI* ausgeschnitten werden und in das entsprechend geöffnete pczHSRV2 eingefügt werden. Als Endergebnis lag das PFV-Konstrukt pBK54 vor, das in der DNA die zu den Aminosäureveränderungen R211I, S345T und E350K in Pol führenden Mutationen aufweist. Durch Sequenzierung des mutagenisierten Fragments im fertigen Klon wurden Fehler der Polymerase in der PCR ausgeschlossen. Auch Konstrukte mit Einzelmutationen (pBK34 mit R211I, pBK83 mit S345T, pBK39 mit E350K) und Kombinationen zweier Mutationen (pBK86 mit R211I und S345T, pBK82 mit R211I und E350K, pBK84 mit S345T und E350K) wurden hergestellt, wobei hier nicht bei allen Klonen das gesamte Fragment sequenziert wurde, sondern teilweise nur ein Ausschnitt, der dazu geeignet war, das Vorhandensein der Mutation nachzuweisen.

Außerdem wurden bei einigen Klonen Mutationen an Stellen eingefügt, die den bei HIV vorkommenden Thymidin-Analoga-Mutationen entsprechen und dort zur AZT-Resistenz führen (Yvon-Groussin et al. 2001): pBK85 mit V343F, pBK35 mit K347E, pBK56 mit V343F und K347Q.

Plasmid	Vektorhintergrund	Insert
pBK9 (2718 bp)	pUC18 <i>XbaI</i> x <i>KpnI</i> (2665 bp)	Hybridisierte Oligonukleotide: #1989 und #1990
pBK14 (4528 bp)	pBK9 <i>PacI</i> x <i>SwaI</i> (2697 bp)	pczHSRV2 <i>PacI</i> x <i>SwaI</i> (1831 bp)
pBK15 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer: #1992 und #1992	
pBK17 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer: #1997 und #1998	
pBK18 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer: #1999 und #4001	
pBK21 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer: #1993 und #1994	
pBK40 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK21; mutagene Primer: #1991 und #1992	
pBK41	Mutagenisiertes Plasmid	

## Ergebnisse

Plasmid	Vektorhintergrund	Insert
(4528 bp)	Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer: #4020 und #4021	
pBK45 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer: #4024 und #4025	
pBK46 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK40; mutagene Primer #4022 und #4023	
pBK47 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK15; mutagene Primer #4021 und #4022	
pBK63 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer #4022 und #4023	
pBK68 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK14; mutagene Primer #4026 und #4027	
pBK69 (4528 bp)	Mutagenisiertes Plasmid Ausgangsplasmid: pBK45; mutagene Primer #1999 und #4001	
pBK34 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK15 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK35 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK17 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK39 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK21 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK54 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK46 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK56 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK45 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK82 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK40 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK83 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK41 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK84 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK63 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK85 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK68 Pacl x Swal (1831 bp)
pBK86 (16179 bp)	pczHSRV2 Pacl x Swal (14348 bp)	pBK47 Pacl x Swal (1831 bp)

***Tabelle 15: Klonierung der infektiösen PFV-Klone pBK34, pBK35, pBK39, pBK54, pBK56, pBK82, pBK83, pBK84, pBK85 und pBK86***

### 3.2.2 AZT-Resistenz der mutierten proviralen PFV-Konstrukte

Wie bei SFV<sub>mac</sub> wurde die AZT-Resistenz der PFV-Konstrukte untersucht durch Transfektion von 293T-Zellen mit wildtypischem pczHSRV2 und den mutierten Klonen, Induktion mit Natriumbutyrat, Virusproduktion in Anwesenheit von AZT und anschließende Titration des Überstandes in Indikatorzellen wiederum in Anwesenheit von AZT (siehe 2.2.2.9).

Die Versuche mit wildtypischen HSRV2 und der Dreifachmutante BK54 wurden dreimal durchgeführt, und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet (Tabelle 16).

Virus	AZT-Konzentration bei Virusproduktion und Titration			
	0 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
	Titer in % des Titers von HSRV2 ohne AZT			
HSRV2	100 (*)	1,1 $\pm$ 0,9	0,4 $\pm$ 0,1	<0,1
BK54	1,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	<0,1

**Tabelle 16: AZT-Resistenz des PFV-Konstruktes BK54**

HSRV2 (wildtypisches PFV) und BK54 (PFV-Klon mit den SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub>-Mutationen R211I, S345T und E350K in Pol) wurden wie im Text beschrieben auf ihre AZT-Resistenz hin untersucht. Der Titer von HSRV2 in Abwesenheit von AZT (im Schnitt  $6,3 \times 10^4$ ) wurde willkürlich als 100% festgesetzt (\*). Die in der Tabelle angegebenen Werte der Klone bei den unterschiedlichen AZT-Konzentrationen (jeweils sowohl bei Virusproduktion und bei Titration) verstehen sich also als Prozentwerte des Ausgangstiters von HSRV2 ohne AZT. Sie sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die einfache Standardabweichung ist angegeben.

Die Dreifachmutante BK54 weist dabei in Abwesenheit von AZT einen Titer von nur 1,3% des Titers von HSRV2 auf. Trotz einer gewissen relativen AZT-Resistenz weist BK54 daher auch in Anwesenheit von AZT keinen höheren Titer auf als das wildtypische PFV, da dieses in Anwesenheit von AZT zwar relativ stärker im Titer beeinflusst wird, jedoch einen absolut höheren Ausgangstiter aufweist.

Die Einzel- und Doppelmutanten wurden für eine grobe Abschätzung der jeweiligen viralen Fitness und AZT-Resistenz ein- bis zweimal transfiziert und in Abwesenheit und Anwesenheit von AZT die Virusproduktion induziert und der Überstand auf Indikatorzellen titriert (*Tabelle 17*). Da sich in diesen Vorversuchen abzeichnete, dass keine Kombination an Mutationen eine mit SFVmac<sub>AZTres</sub> vergleichbare AZT-Resistenz aufweist, wurde auf die endgültige Durchführung der Versuche, also eine mindestens dreimalige zeitgleiche Transfektion und Titration aller Klone, wie sie bei den SFVmac-Konstrukten und der Dreifachmutante von PFV (BK54) durchgeführt wurde, verzichtet.

Virus	Mut. in Pol	AZT-Konz. bei Virusproduktion und Titration			
		0 µM	0,5 µM	5 µM	50 µM
		Titer in % des Titers von HSRV2 ohne AZT			
<b>HSRV2</b>	WT	100	0,9	0,4	<0,1
<b>BK34</b>	R211I	ca. 50	ca. 1	<0,5	<0,1
<b>BK83</b>	S345T	ca. 100	ca. 2	<0,5	<0,1
<b>BK39</b>	E350K	ca. 100	<1	<0,5	<0,1
<b>BK86</b>	R211I, S345T	<10	<1	<0,5	<0,1
<b>BK82</b>	R211I, E350K	<50	<1	<0,5	<0,1
<b>BK84</b>	S345T, E350K	ca. 100	ca. 2	<0,5	<0,1
<b>BK85</b>	V343F	<10	<1	<0,5	<0,1
<b>BK35</b>	K347E	<10	<1	<0,5	<0,1
<b>BK56</b>	V343Y, K347Q	<1	<1	<0,5	<0,1

**Tabelle 17: AZT-Resistenz verschiedener PFV-Konstrukte**

Gezeigt sind die Virustiter von PFV-Konstrukten mit Mutationen, die entweder den in SFVmac<sub>AZTres</sub> gefundenen Mutationen entsprechen (R211I, S345T, E350K) oder manchen der TAMs von HIV (V343F/Y, K347Q/E). Die Werte sind Prozentwerte und beziehen sich wieder auf den Ausgangstiter von HSRV2 in Abwesenheit von AZT, der als 100% festgelegt wurde. Die hier dargestellten Daten sind weniger zuverlässig als die in Tabelle 14 oder Tabelle 16, da die Versuche für jedes Konstrukt nur ein- oder zweimal durchgeführt wurden und auch nicht alle Konstrukte gleichzeitig getestet wurden.

Insgesamt zeigt sich, dass kein PFV-Konstrukt mit SFVmac<sub>AZTres</sub>-Mutationen in Anwesenheit von AZT einen eindeutigen Vorteil gegenüber dem wildtypischen Virus aufzuweisen scheint, mit der eingeschränkten Ausnahme von BK83 (S345T) und BK84 (S345T und E350K), die möglicherweise in Anwesenheit von 0,5 µM AZT einen jedoch im Vergleich zur Situation bei SFVmac auch nur leicht höheren Titer als HSRV2 aufweisen.

Die Konstrukte mit den HIV nachempfundenen Mutationen weisen in Abwesenheit von AZT eine reduzierte Fitness auf und haben in Anwesenheit von AZT ebenfalls keinen höheren Titer als das wildtypische Virus.

## 4 Diskussion

### 4.1 Das AZT-resistente Foamyvirus SFVmac<sub>AZTres</sub>

#### 4.1.1 Vier Aminosäuresubstitutionen in Pol als Ursache der AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZTres</sub>

AZT ist von den diesbezüglich untersuchten Nukleosidanaloga dasjenige mit der besten Wirksamkeit bei Foamyviren wie PFV, SFVcpz und SFVmac (Santillana-Hayat et al. 1996; Rosenblum et al. 2001; Yvon-Groussin et al. 2001; Rinke et al. 2002).

Bei HIV sind verschiedene Muster an Mutationen, die zu einer Resistenz gegenüber AZT und anderen NRTIs führen, gut bekannt und es liegen zahlreiche Erkenntnisse zum jeweiligen Mechanismus der Resistenz vor, aus denen auch Rückschlüsse auf die biologische Funktionsweise der wildtypischen Reversen Transkriptase von HIV gezogen werden konnten. Neben resistenten HIV-Isolaten, die aus infizierten und behandelten Patienten gewonnen wurden, gibt es daneben auch NRTI-resistentes HIV, das durch Passagen in Zellkultur unter steigenden Medikamentenkonzentrationen selektiert wurde (Smith et al. 1987; Larder et al. 1991a; Dianzani et al. 1992; Gao et al. 1992).

Dagegen liegen zu den Eigenschaften der foamyviralen Reversen Transkriptase nur recht wenige, zum Teil bereits ältere Untersuchungen vor (Parks et al. 1971; Parks et Todaro 1972; Liu et al. 1977; Benzair et al. 1982; Kögel et al. 1995a; Kögel et al. 1995b; Rinke et al. 2002; Boyer et al. 2004; Boyer et al. 2007) und über ein mögliches Auftreten von AZT-Resistenz bei Foamyviren und die verantwortlichen Mechanismen gibt es bisher nur indirekte Erkenntnisse und Vermutungen (Yvon-Groussin et al. 2001; Boyer et al. 2004). In der bisher einzigen veröffentlichten experimentellen Arbeit zur Untersuchung von NRTI-Resistenzen bei Foamyviren wurde versucht, durch die Mutation V313M im YXDD-Motiv des aktiven Zentrums der Reversen Transkriptase von PFV ein 3TC-sensitives Foamyvirus zu gewinnen (Rinke et al. 2002). Zugrunde lag die Beobachtung, dass HIV durch die umgekehrte Mutation an entsprechender Stelle (M184V) eine 3TC-Resistenz entwickelt. Es zeigte

sich jedoch, dass die Mutante einen Replikationsdefekt aufwies und die Sensitivität gegenüber 3TC nicht erhöht werden konnte.

Um die Hintergründe der AZT-Resistenz bei Foamyviren zu untersuchen und durch den Vergleich mit den bei HIV bekannten Gegebenheiten einerseits die Erkenntnisse über allgemeine Mechanismen der NRTI-Resistenz bei Retroviren zu erweitern und andererseits einen Beitrag zur Untersuchung der biologischen Funktion und Struktur der foamyviralen Polymerase zu leisten, wurde in dieser Arbeit das AZT-resistente SFVmac-Isolat SFVmac<sub>AZTres</sub> analysiert.

SFVmac<sub>AZTres</sub> war durch Selektion in Zellkultur unter steigenden AZT-Konzentrationen gewonnen worden und ist das erste beschriebene AZT-resistente Foamyvirus. Das in dieser Arbeit analysierte Muster an Mutationen, die SFVmac<sub>AZTres</sub> zu einer Resistenz gegenüber AZT verhelfen, ist somit die erste Charakterisierung einer AZT-Resistenz bei Foamyviren, die den bekannten NRTI-Resistenz-Mutationen bei Orthoretroviren wie vor allem den TAMs von HIV gegenübergestellt werden kann.

In der Sequenzierung des *gag*- und *pol*-Gens von SFVmac<sub>AZTres</sub> wurden auf DNA-Ebene sieben Mutationen nachgewiesen (siehe 3.1.1.2). Vier dieser Mutationen führten zu Aminosäureveränderungen in Pol (K211I, I224T, S345T, E350K) und zeigten sich verantwortlich für die AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZTres</sub>, während zwei Aminosäuresubstitutionen in Gag und eine stumme Mutation in *pol* keinen messbaren Beitrag zur AZT-Resistenz leisteten. Dies wurde durch den Vergleich der Replikation von SFVmac<sub>AZTres</sub> mit BK64 in Indikatorzellen nachgewiesen. BK64 enthält die vier zu Aminosäureveränderungen in Pol führenden Mutationen, die durch zielgerichtete Mutagenese *in vitro* eingefügt wurden, nicht jedoch die zwei Mutationen in *gag* und die stumme Mutation in *pol*. Weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von AZT zeigte sich dabei ein Unterschied zwischen diesen beiden Viren (siehe 3.1.3). Auch BK3 und BK4 unterschieden sich in diesen und anderen Versuchen nicht in ihren Titern, zwei Konstrukte, die ein aus SFVmac<sub>AZTres</sub> amplifiziertes Fragment enthalten, das bei beiden die *pol*-Mutationen umfasst, bei BK3 im Gegensatz zu BK4 jedoch zusätzlich auch die *gag*-Mutationen, wodurch ein relevanter Beitrag der *gag*-Mutationen zur AZT-Resistenz ausgeschlossen werden konnte.

Bei allen drei Mutationen, die sich letztlich als irrelevant bezüglich der AZT-Resistenz herausstellten, handelt es sich um die Transition von Guanin zu Adenin. Dies passt zu neuen Daten, nach denen G→A bei PFV die häufigste Nukleotidsubstitution überhaupt darstellt (Boyer et al. 2007), wobei dieser Sachverhalt allerdings bei SFV<sub>mac</sub> nicht untersucht wurde. Unbekannt ist auch, ob die Mutationsrate von Foamyviren in Anwesenheit von AZT und/oder AZT-Resistenzmutationen zunimmt, wie dies für Orthoretroviren wie MLV oder HIV-1 gezeigt wurde (Julias et al. 1997; Mansky et Bernard 2000).

Nachdem durch den Vergleich von SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> und BK64 gezeigt war, dass die vier zu Aminosäuresubstitutionen führenden Mutationen in *pol* hinreichend für die AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> sind, wurde nun untersucht, ob alle vier Mutationen notwendig für diese AZT-Resistenz sind, oder ob eine einzelne Mutation oder eine bestimmte Kombination von zwei oder drei Mutationen bereits zu einer gleich stark ausgeprägten Resistenz führt. Hierfür wurden die entsprechenden Mutationen mittels zielgerichteter Mutagenese in allen möglichen Kombinationen in den infektiösen SFV<sub>mac</sub>-Klon pSFV-1 eingefügt (siehe 3.1.2.2) und diese Konstrukte auf ihre Replikation in Abwesenheit und in Anwesenheit verschiedener AZT-Konzentrationen untersucht. Dabei wurden die entsprechenden Plasmide in 293T-Zellen transfiziert, und nach Induktion die Viruspartikel geerntet und in Indikatorzellen titriert. Bekanntermaßen ist dabei die Zugabe von AZT nur in den Indikatorzellen aufgrund der Besonderheiten des foamyviralen Replikationszyklus nicht ausreichend (Moebes et al. 1997). Vielmehr zeigte sich in der Etablierung des verwendeten AZT-Resistenz-Tests (siehe 3.1.4), dass eine Zugabe von AZT sowohl bei der Virusproduktion als auch bei der Titration für diese Zwecke am aussagefähigsten ist. Außerdem erwies es sich für die Untersuchung der AZT-Resistenz hilfreich, AZT-Konzentrationen von 0,5 µM, 5 µM und 50 µM zu verwenden.

Um in diesem Testsystem Unterschiede in der Proteinexpression, Proteininstabilität oder ähnlichem als Ursache der unterschiedlichen Titer der Konstrukte mit den verschiedenen Kombinationen von Mutationen auszuschließen, wurden jeweils Gag und Pol mittels Western Blot in Zelllysaten und Viruspartikeln nachgewiesen und das gleichmäßige Vorhandensein in allen Konstrukten überprüft (siehe 3.1.5).

Bei der Untersuchung der Klone mit allen möglichen Kombinationen der vier nicht stummen *pol*-Mutationen zeigte sich, dass keine Einzelmutation oder Kombination von zwei oder drei Mutationen eine ähnliche AZT-Resistenz wie alle vier Mutationen zusammen hervorrief (siehe 3.1.6). In Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  AZT etwa betrug der Titer der besten Dreifachmutante BK37<sub>ITK</sub> weniger als 1/15 des Titers der Vierfachmutanten BK64 oder BK4, bzw. der Sechsfachmutante mit den zusätzlichen *gag*-Mutationen, BK3. Unter den anderen Dreifachmutanten hatten BK79<sub>KTTK</sub> einen Titer von weniger als 1/20, BK80<sub>ITTE</sub> von weniger als 1/100 des Titers von BK64, BK4 oder BK3, und BK77<sub>ITSK</sub> schließlich einen nicht mehr nachweisbaren Titer. Die beste Zweifachmutante SK39<sub>KITK</sub> hatte einen Titer von weniger als 1/30 des Titers von BK64, BK4 oder BK3, alle anderen Zweifachmutanten und alle Einzelmutanten einen Titer von weniger als 1/500 oder einen Titer unter der Nachweisgrenze. Für die volle Ausprägung der AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> sind also bei 50  $\mu\text{M}$  AZT alle vier *pol*-Mutationen zwingend notwendig. Eine gewisse Teilresistenz, mit Titern zwischen 3,2% und 6,4% des Titers der Vierfachmutante BK64<sub>ITTK</sub>, findet sich lediglich bei der Doppelmutante SK39 (mit S345T und E350K), sowie denjenigen Dreifachmutanten, die ebenfalls diese Zweifachkombination von S345T und E350K enthalten: BK79 (zusätzlich I224T) und BK37 (zusätzlich K211I).

Bei 5  $\mu\text{M}$  AZT weist die beste Dreifachmutante BK79<sub>KTTK</sub> einen Virustiter von immerhin knapp 1/4 des Virustiters von BK64<sub>ITTK</sub> auf, bei 0,5  $\mu\text{M}$  AZT hat dieselbe Mutante gar einen leicht höheren Virustiter als die Vierfachmutanten. Die zweitbeste Mutante bei 5  $\mu\text{M}$  AZT, SK39<sub>KITK</sub>, erreicht weniger als 1/20, die zweitbeste Mutante bei 0,5  $\mu\text{M}$  AZT, BK78<sub>KTTE</sub>, weniger als 1/4 des jeweiligen Virustiters von BK64. Wie bei einer AZT-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ , ist also bei 5  $\mu\text{M}$  AZT auch das Vorhandensein aller vier *pol*-Mutationen nötig für die volle Ausprägung der AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub>, während bei 0,5  $\mu\text{M}$  AZT eine Dreifachkombination von I224T, S345T und E350K keinen niedrigeren Virustiter erbringt als die Vierfachmutante mit der zusätzlichen Mutation K211I.

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass für die AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> vier Mutationen in Pol hinreichend und notwendig sind: K211I, I224T, S345T und E350K. Dies ist vergleichbar mit der Situation bei HIV, wo ebenfalls mehrere TAMs zusammen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber AZT verleihen, während die

Einzelmutationen nur eine unterschiedlich starke Teilresistenz verursachen (de Jong et al. 1996; Harrigan et al. 1998; Whitcomb et al. 2003). Allerdings scheint bei SFV<sub>mac</sub> im Vergleich mit HIV das Vorhandensein aller bekannter Resistenzmutationen für eine ausgeprägte AZT-Resistenz noch deutlich mehr nötig zu sein als bei HIV, wo bestimmte Kombinationen von TAMs eine stärkere Teilresistenz aufweisen als bei SFV<sub>mac</sub> (Larder et al. 1991b; Harrigan et al. 1998).

#### 4.1.2 Auswirkung der vier einzelnen Aminosäureaustausche im Pol-Protein von SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> auf die virale Fitness in Abwesenheit und in Anwesenheit von AZT

##### 4.1.2.1 K211I

Um den Effekt des Aminosäureaustausches vom basischen Lysin im wildtypischen Virus zum neutralen Isoleucin im unter steigenden AZT-Konzentrationen selektierten SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> an Position 211 des Pol-Proteins von SFV<sub>mac</sub> zu analysieren, werden die Titer von Konstrukten mit dieser Mutation und den entsprechenden Konstrukten ohne diese Mutation jeweils gegenübergestellt (*Tabelle 18*).

Mutationen im Hintergrund	Jeweiliges Konstrukt ohne und mit K211I	Effekt in Abwesenheit von AZT	Effekt in Anwesenheit von 0,5 µM AZT	Effekt in Anwesenheit von 5 µM AZT	Effekt in Anwesenheit von 50 µM AZT
keine	SK29	100	0,7	<0,1	<0,01
	↓ BK30	↓ 1,2	↓ <0,1	↓ <0,1	↓ <0,01
I224T	BK65	146,5	1,2	<0,1	<0,01
	↓ BK81	↓ 2,5	↓ <0,1	↓ <0,1	↓ <0,01
S345T	SK50	40,0	5,6	1,1	<0,1
	↓ BK38	↓ <0,01	↓ <0,01	↓ <0,01	↓ <0,01
E350K	SK51	31,7	1,8	<0,1	<0,01
	↓ BK31	↓ 23,0	↓ 0,6	↓ <0,1	↓ <0,01

I224T	BK78	86,7	18,7	0,5	<0,1
S345T	↓	↓	↓	↓	↓
	BK80	7,3	4,0	1,0	0,3
I224T	BK76	175,5	8,1	<0,1	<0,01
E350K	↓	↓	↓	↓	↓
	BK77	33,6	3,8	0,9	<0,01
S345T	SK39	20,6	10,8	3,0	1,0
E350K	↓	↓	↓	↓	↓
	BK37	8,6	5,9	2,8	2,0
I224T	BK79	138,2	86,9	16,4	1,4
S345T	↓	↓	↓	↓	↓
E350K	BK64	113,0	79,3	68,8	31,4

**Tabelle 18: Vergleich von SFVmac-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation K211I**

Dargestellt wird die Auswirkung der Mutation K211I im Pol-Protein von SFVmac, indem Klone mit allen möglichen Kombinationen der drei anderen Pol-Mutationen von SFVmac<sub>AZTres</sub> (I224T, S345T und E350K) verglichen werden mit den jeweiligen Klonen, die zusätzlich K211I tragen. Die Werte stellen Prozentwerte des Ausgangstiters von SK29 in Abwesenheit von AZT dar, siehe hierfür auch Tabelle 14, der die Werte entnommen wurden.

Es zeigt sich, dass die Mutation K211I in Abwesenheit von AZT immer zu einer Erniedrigung des Titers führt. K211I zusammen nur mit S345T führt dabei gar zu einem Titer von <0,01, aber auch K211I alleine oder zusammen nur mit I224T weisen sehr niedrige Titer auf. Etwas weniger stark ausgeprägt ist der negative Effekt von K211I, wenn sowohl I224T als auch S345T vorliegen. Deutlich schwächer ist die negative Auswirkung von K211I aber besonders bei allen Konstrukten, die zusätzlich die Mutation E350K aufweisen.

In Anwesenheit der niedrigen AZT-Konzentration von 0,5 µM ergibt sich ein ähnliches Bild wie in Abwesenheit von AZT. K211I führt immer zu einer Erniedrigung des Titers, jedoch besonders beim Vorhandensein von I224T und S345T oder I224T und E350K etwas weniger stark ausgeprägt als in Abwesenheit von AZT. Bei der mittleren AZT-Konzentration von 5 µM zeigen sich erstmals Vorteile der K211I-Mutation: Die Konstrukte mit den Kombinationen I224T und S345T, I224T

und E350K, sowie besonders I224T, S345T und E350K erfahren bei 5  $\mu$ M AZT eine Titererhöhung durch das Vorhandensein von K211I. Die meisten anderen Konstrukte weisen sowohl mit als auch ohne K211I einen sehr niedrigen Titer auf.

In Anwesenheit der höchsten untersuchten AZT-Konzentration von 50  $\mu$ M zeigt sich ein Vorteil von K211I bei den Konstrukten, die I224T und S345T, S345T und E350K, oder wiederum besonders I224T, S345T und E350K aufweisen. Wird K211I dabei in letztgenannte Dreifachmutante eingefügt, führt dies bei 50  $\mu$ M AZT beispielsweise zu einer über 20fachen Erhöhung des Titers.

Zusammenfassend führt K211I also zu negativen Auswirkungen in Abwesenheit von AZT oder bei niedrigen AZT-Konzentrationen, jedoch zu einer Titererhöhung in Anwesenheit hoher AZT-Konzentrationen, wenn zusätzlich zwei andere, am besten alle drei anderen Aminosäureaustausche vorliegen.

#### 4.1.2.2 I224T

An Position 224 des Pol-Proteins von SFV<sub>mac</sub> war unter steigenden AZT-Konzentrationen ein polares Threonin gegenüber dem aliphatischen Isoleucin in der Ausgangssequenz selektiert worden. Um die Auswirkung dieser Mutation zu analysieren, können analog zum Vorgehen bei K211I die Konstrukte ohne I224T mit den jeweiligen Konstrukten verglichen werden, die zusätzlich I224T aufweisen (*Tabelle 19*)

Mutationen im Hintergrund	Jeweiliges Konstrukt ohne und mit I224T	Effekt in Abwesenheit von AZT	Effekt in Anwesenheit von 0,5 $\mu$ M AZT	Effekt in Anwesenheit von 5 $\mu$ M AZT	Effekt in Anwesenheit von 50 $\mu$ M AZT
keine	SK29	100	0,7	<0,1	<0,01
	↓ BK65	↓ 146,5	↓ 1,2	↓ <0,1	↓ <0,01
K211I	BK30	1,2	<0,1	<0,1	<0,01
	↓ BK81	↓ 2,5	↓ <0,1	↓ <0,1	↓ <0,01
S345T	SK50	40,0	5,6	1,1	<0,1
	↓ BK78	↓ 86,7	↓ 18,7	↓ 0,5	↓ <0,1

E350K	SK51	31,7	1,8	<0,1	<0,01
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK76	175,5	8,1	<0,1	<0,01
K211I	BK38	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
S345T	↓	↓	↓	↓	↓
	BK80	7,3	4,0	1,0	0,3
K211I	BK31	23,0	0,6	<0,1	<0,01
E350K	↓	↓	↓	↓	↓
	BK77	33,6	3,8	0,9	<0,01
S345T	SK39	20,6	10,8	3,0	1,0
E350K	↓	↓	↓	↓	↓
	BK79	138,2	86,9	16,4	1,4
K211I	BK37	8,6	5,9	2,8	2,0
S345T	↓	↓	↓	↓	↓
E350K	BK64	113,0	79,3	68,8	31,3

***Tabelle 19: Vergleich von SFV<sub>mac</sub>-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation I224T***

*Dargestellt ist die Auswirkung der Mutation I224T im Pol-Protein von SFV<sub>mac</sub>, indem Klone mit allen möglichen Kombinationen der drei anderen Pol-Mutationen von SFV<sub>mac</sub><sup>AZT<sup>res</sup></sup> (K221I, S345T und E350K) verglichen werden mit den jeweiligen Klonen, die zusätzlich I224T tragen. Die Werte stellen Prozentwerte des Ausgangstiters von SK29 in Abwesenheit von AZT dar (siehe auch Tabelle 14, aus der die Werte stammen).*

Der Gegenüberstellung ist zu entnehmen, dass I224T fast immer zu einer Erhöhung des Titers führt, und zwar sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von AZT. Ausnahmen stellen einige Fälle in Anwesenheit vor allem höherer AZT-Konzentrationen dar, bei denen sowohl die jeweiligen Klone mit I224T als auch diejenigen ohne I224T einen sehr niedrigen oder nicht nachweisbaren Titer haben.

Während das Konstrukt mit K211I und S345T weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von AZT einen Titer aufweist, führt das zusätzliche Vorhandensein von I224T zu einem zwar eher geringen, aber eindeutig nachweisbaren Titer. Abgesehen davon ist der positive Effekt von I224T am stärksten bei den Konstrukten mit folgenden Kombinationen von Mutationen: nur E350K; S345T und E350K; K211I, S345T und E350K.

Die relative Titererhöhung beim Vorhandensein von I224T ist dabei, mit einigen Schwankungen, in den jeweiligen Konstrukten oft etwa gleichmäßig bei allen untersuchten AZT-Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ . So führt beispielsweise I224T, wenn man es in die Dreifachmutante mit K211I, S345T und E350K einführt, in Abwesenheit von AZT zu einer 13fachen Erhöhung des Titers, in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  AZT zu einer 13-fachen, 22-fachen bzw. 15-fachen Erhöhung.

Bemerkenswert ist, dass die Mutation I224T in Abwesenheit von AZT zu einer knapp 1,5-fachen Titererhöhung führt, wenn sie in das wildtypische SK29 eingeführt wird. Eine Selektion völlig ohne AZT von Isoleucin zu Threonin an Position 224 erscheint also durchaus möglich, so dass I224T keine wirkliche AZT-Resistenz-Mutation wäre. Dabei muss allerdings auch bedacht werden, dass sich Foamyviren *in vivo* durch eine niedrige Replikationsrate auszeichnen, und eine bessere Virusreplikation nicht immer nur zum Vorteil des Virus ist, da dadurch wichtige Gleichgewichte zwischen Virus und Wirt gestört werden können. Interessant ist auch, dass sich in den veröffentlichten Sequenzierungen von SFVmac teilweise ein Isoleucin (*GenBank accession number* X58484), teilweise ein Threonin (X54482) findet, wobei pSFV-1 aus der Arbeitsgruppe stammt, die ein Isoleucin veröffentlichte (Mergia et Luciw 1991; Mergia et Wu 1998). Dies lässt unterschiedliche Interpretationen zu: 1.) An Position 224 könnte ein Art Polymorphismus vorliegen, unabhängig davon, ob sich das Virus im natürlichen Wirt oder in Zellkultur vermehrt, der eher geringe Titerunterschied zwischen SK29<sub>KISE</sub> und BK65<sub>KTSE</sub> wäre also diesbezüglich irrelevant. 2.) Das Isoleucin könnte normalerweise *in vivo* vorliegen, während Threonin eventuell bei längerem Halten in Zellkultur selektiert wird. Zufällig war diese Selektion bei der einen Sequenzierung bereits geschehen, bei der anderen nicht. 3.) Die normale Aminosäure an Position 224 ist eher ein Threonin. Bei dem SFVmac-Isolat, das als Grundlage für pSFV-1 diente, liegt eine zufällige Mutation zu Isoleucin an Position 224 vor. Hierfür würde auch sprechen, dass bei verwandten Foamyviren wie SFVagm, SFVcpz und PFV an entsprechender Stelle ein Threonin vorliegt (siehe 3.1.1.5).

Auf jeden Fall ist jedoch die positive Auswirkung von I224T auf den SFVmac-Titer etwa zehnmal stärker ausgeprägt, wenn zusätzlich die Mutationen K211I, S345T und E350K, bzw. bestimmte Teilkombinationen, vorliegen. Das heißt, unabhängig davon,

warum in der Ausgangssequenz ein Isoleucin vorlag, obwohl es auch eine veröffentlichte SFV<sub>mac</sub>-Sequenz mit Threonin an dieser Position gibt, ist die Mutation I224T sehr vorteilhaft für das Virus, wenn AZT-Resistenz-Mutationen vorliegen, und zwar sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von AZT. Daher und aufgrund der Tatsache, dass I224T in Anwesenheit von AZT tatsächlich selektiert wurde, soll I224T weiterhin als AZT-Resistenz-Mutation gelten.

In aktuellen Untersuchungen, in denen verschiedene biochemische Eigenschaften der Reversen Transkriptase von SK29<sub>KISE</sub>, BK37<sub>ITTE</sub> und BK64<sub>ITTE</sub> verglichen wurden, zeigte sich, dass BK37 tatsächlich in Bezug auf die eigentliche AZT-Resistenz ähnliche Eigenschaften wie BK64 aufweist, also eine gute Fähigkeit zur Exzision von AZTMP mit Hilfe von ATP, aber einen im Vergleich zum wildtypischen SK29 erhöhten  $K_M$ -Wert, einen erniedrigten  $v_{max}$ -Wert und erniedrigte Polymeraseaktivität, während das zusätzliche Vorhandensein von I224T in BK64 den  $v_{max}$ -Wert und die Polymerase-Aktivität wieder auf annähernd wildtypische Werte anhebt (Maximilian Hartl und Birgitta Wöhrl, pers. Mitteilung). Es bestätigt sich also, dass I224T vor allem dazu dient, negative Auswirkungen der AZT-Resistenz-Mutationen K211I, S345T und E350K auf Eigenschaften der RT aufzuheben.

### 4.1.2.3 S345T

An Position 345 in Pol fand sich bei SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> ein Threonin anstelle des Serin in der Ausgangssequenz. Beide Aminosäuren sind neutral und dabei polar, so dass es sich um eine eher konservative Mutation handelt. Dennoch führt diese Mutation zu deutlichen Auswirkungen auf den Titer von SFV<sub>mac</sub> in Abwesenheit oder Anwesenheit von AZT (*Tabelle 20*).

Mutationen im Hintergrund	Jeweiliges Konstrukt ohne und mit S345T	Effekt in Abwesenheit von AZT	Effekt in Anwesenheit von 0,5 µM AZT	Effekt in Anwesenheit von 5 µM AZT	Effekt in Anwesenheit von 50 µM AZT
keine	SK29	100	0,7	<0,1	<0,01
	↓ SK50	↓ 40,0	↓ 5,6	↓ 1,1	↓ <0,1
K211I	BK30	1,2	<0,1	<0,1	<0,01
	↓ BK38	↓ <0,01	↓ <0,01	↓ <0,01	↓ <0,01
I224T	BK65	146,5	1,2	<0,1	<0,01
	↓ BK78	↓ 86,7	↓ 18,7	↓ 0,5	↓ <0,1
E350K	SK51	31,7	1,8	<0,1	<0,01
	↓ SK39	↓ 20,6	↓ 10,8	↓ 3,0	↓ 1,0
K211I I224T	BK81	2,5	<0,1	<0,1	<0,01
	↓ BK80	↓ 7,3	↓ 4,0	↓ 1,0	↓ 0,3
K211I E350K	BK31	23,0	0,6	<0,1	<0,01
	↓ BK37	↓ 8,6	↓ 5,9	↓ 2,8	↓ 2,0
I224T E350K	BK76	175,5	8,1	<0,1	<0,01
	↓ BK79	↓ 138,2	↓ 86,9	↓ 16,4	↓ 1,4
K211I I224T E350K	BK77	33,6	3,8	0,9	<0,01
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK64	113,0	79,3	68,8	31,4

**Tabelle 20: Vergleich von SFVmac-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation S345T**

Dargestellt ist die Auswirkung der Mutation S345T im Pol-Protein von SFVmac, indem Klone mit allen möglichen Kombinationen der drei anderen Pol-Mutationen von SFVmac<sub>AZTres</sub> (K221I, I224T und E350K) verglichen werden mit den jeweiligen Klonen, die zusätzlich S345T tragen. Die Werte stellen Prozentwerte des Ausgangstüters von SK29 in Abwesenheit von AZT dar (siehe auch Tabelle 14, aus der die Werte stammen).

Wie bereits bei K211I erwähnt, führt die Kombination von S345T mit dieser Mutation zu einem ausgeprägten Replikationsdefekt. Abgesehen davon ist der Effekt von S345T in Abwesenheit von AZT unterschiedlich. Häufig kommt es zu einer eher moderaten Titererniedrigung auf etwa die Hälfte, teilweise (beim Vorhandensein von K211I und I224T bzw. K211I, I224T und E350K) jedoch auch zu einer Titererhöhung auf etwa das Dreifache.

In Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT führt S345T, abgesehen von der erwähnten Ausnahme zusammen nur mit K211I, immer zu einer ausgeprägten Titererhöhung, meistens auf mehr als das Zehnfache.

In Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  AZT führt S345T bei vielen Kombinationen zu einer Erhöhung des Titers von sehr niedrigen oder nicht nachweisbaren Ausgangswerten auf deutlich höhere Werte, besonders wenn im jeweiligen Konstrukt E350K vorliegt, und dann umso mehr, je mehr weitere Mutationen vorliegen. Besonders eindrucksvoll ist also der Effekt von S345T zu sehen, wenn man bei 5 oder 50  $\mu\text{M}$  AZT die Dreifachmutante BK77 (K211I, I224T und E350K) vergleicht mit der Vierfachmutante, die zusätzlich S345T aufweist: Werten von 0,9% oder <0,01% ohne S345T stehen dann Werte von 68,8% oder 31,4% mit S345T gegenüber.

Obwohl also alle vier Mutationen für die AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub><sup>AZT<sub>res</sub></sup> notwendig sind, nimmt die Aminosäuresubstitution S345T dennoch eine herausragende Stellung ein. So ist auch der Titer der Einfachmutante SK50<sub>KITE</sub> in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  jeweils höher als der Titer der Dreifachmutante BK77<sub>ITSK</sub> und aller Einzel- und Doppelmutanten ohne S345T, mit der Ausnahme von BK76<sub>KTSK</sub> bei 0,5  $\mu\text{M}$ . Auch weisen z. B. alle fünf Konstrukte, die in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  AZT noch einen Titer von über 0,1% des Ausgangstiters von SK29 ohne AZT haben, die Mutation S345T auf. Es erscheint also insgesamt durchaus berechtigt, S345T als die Schlüsselmutation der AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub> zu bezeichnen.

#### 4.1.2.4 E350K

Fünf Aminosäuren stromabwärts der S345T-Mutation findet sich in SFV<sub>mac</sub><sup>AZT<sub>res</sub></sup> ein basisches Lysin anstelle des sauren Glutamat im wildtypischen SFV<sub>mac</sub>, also eine

sehr unterschiedliche Aminosäure. Auch hier können die Konstrukte wieder aufgeteilt werden in solche mit E350K und solche ohne E350K (*Tabelle 21*).

Mutationen im Hintergrund	Jeweiliges Konstrukt ohne und mit E350K	Effekt in Abwesenheit von AZT	Effekt in Anwesenheit von 0,5 µM AZT	Effekt in Anwesenheit von 5 µM AZT	Effekt in Anwesenheit von 50 µM AZT
keine	SK29	100	0,7	<0,1	<0,01
	↓	↓	↓	↓	↓
	SK51	31,7	1,8	<0,1	<0,01
K211I	BK30	1,2	<0,1	<0,1	<0,01
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK31	23,0	0,6	<0,1	<0,01
I224T	BK65	146,5	1,2	<0,1	<0,01
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK76	175,5	8,1	<0,1	<0,01
S345T	SK50	40,0	5,6	1,1	<0,1
	↓	↓	↓	↓	↓
	SK39	20,6	10,8	3,0	1,0
K211I I224T	BK81	2,5	<0,1	<0,1	<0,01
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK77	33,6	3,8	0,9	<0,01
K211I S345T	BK38	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK37	8,6	5,9	2,8	2,0
I224T S345T	BK78	86,7	18,7	0,5	<0,1
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK79	138,2	86,9	16,4	1,4
K211I I224T S345T	BK80	7,3	4,0	1,0	0,3
	↓	↓	↓	↓	↓
	BK64	113,0	79,3	68,8	31,3

***Tabelle 21: Vergleich von SFVmac-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation E350K***

*Dargestellt ist die Auswirkung der Mutation E350K im Pol-Protein von SFVmac, indem Klone mit allen möglichen Kombinationen der drei anderen Pol-Mutationen von SFVmac<sub>AZTres</sub> (K221I, I224T und S345T) verglichen werden mit den jeweiligen Klonen, die zusätzlich E350K tragen. Die Werte stellen Prozentwerte des*

*Ausgangstiters von SK29 in Abwesenheit von AZT dar (siehe auch Tabelle 14, aus der die Werte stammen).*

E350K führt in Abwesenheit von AZT zu einer mehr als zehnfachen Titererhöhung, wenn zusätzlich K211I vorliegt, zu einer leichten Titererhöhung, wenn zusätzlich I224T vorliegt, und zu einer leichten Titererniedrigung, wenn keine dieser beiden Mutationen vorliegt.

Bei 0,5  $\mu$ M AZT führt E350K immer zu einer Titererhöhung, die bei relativer Betrachtung stärker ausfällt als die jeweilige Titererhöhung ohne AZT. Noch stärker ist diese relative Titererhöhung in Anwesenheit von 5 oder 50  $\mu$ M, abgesehen von den Konstrukten, die sowohl ohne als auch mit E350K einen sehr geringen Titer ausweisen.

SK51<sub>KISK</sub> weist unter den Einzelmутanten die zweitstärkste AZT-Resistenz auf, allerdings mit deutlichem Abstand nach SK50<sub>KITE</sub>. E350K findet sich zusammen mit S345T in SK39, dem Konstrukt mit der höchsten AZT-Resistenz unter den Doppelmутanten. Die Kombination von S345T und E350K findet sich auch in den Dreifachmutanten BK37 und BK79, die im Vergleich mit den beiden anderen Dreifachmutanten, in denen jeweils eine dieser Mutationen fehlt, die höhere AZT-Resistenz aufweisen.

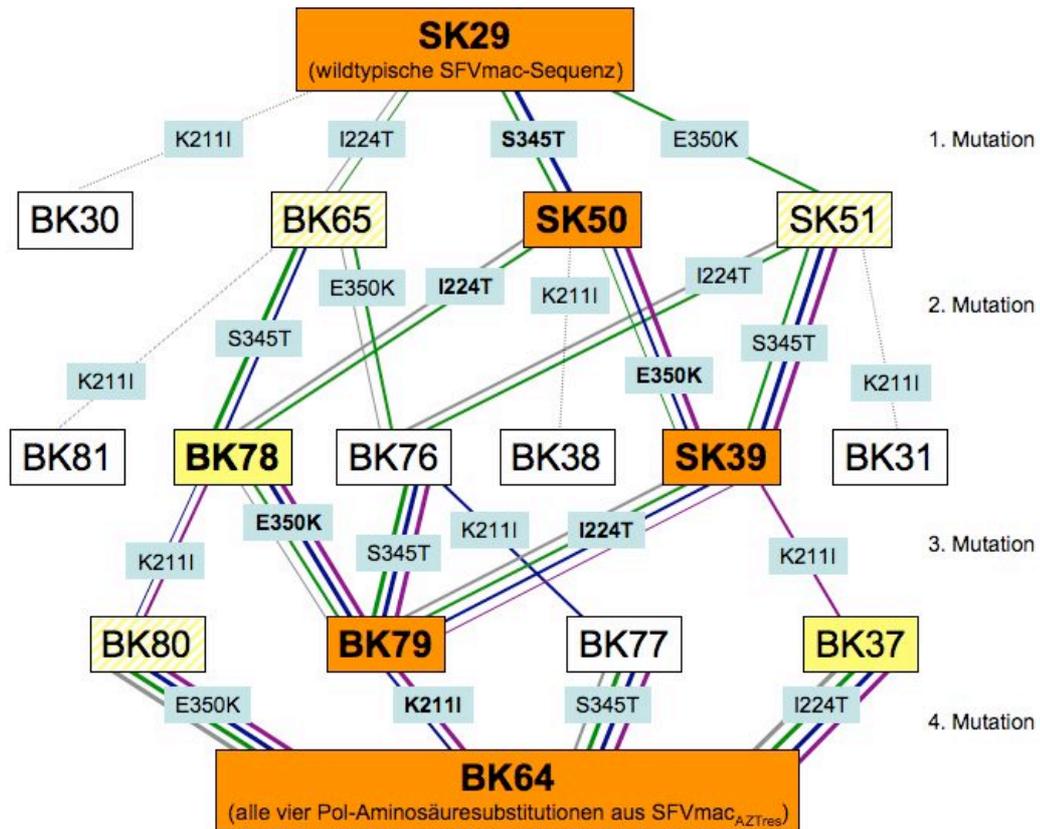
Insgesamt kann also E350K als die Mutation mit der nach S345T zweitstärksten Auswirkung auf die Resistenz gegenüber AZT aufgefasst werden.

### **4.1.3 Mögliche Reihenfolge des Auftretens der Mutationen in SFVmac<sub>AZTres</sub>**

Bei HIV treten die AZT-Resistenz verursachenden Mutationen meistens nacheinander auf, wobei bestimmte Abfolgen bevorzugt werden (Boucher et al. 1992; Kellam et al. 1994; Cleland et al. 1996). Aus dem Wissen um den Titer der SFVmac-Konstrukte mit unterschiedlichen Kombinationen von AZT-Resistenz-Mutationen lässt sich nun auch für SFVmac auf das Auftreten der Mutationen in bestimmter Reihenfolge schließen. Direkte experimentelle Befunde, also etwa die Sequenzierung während der Entwicklung der AZT-Resistenz und der Nachweis einer Teilkombination an Mutationen, liegen dabei allerdings nicht vor. Jedoch lässt zum Beispiel der Befund,

dass das Konstrukt BK38<sub>ITE</sub> durchgängig einen Titer von  $<0,01$  aufweist, die Schlussfolgerung zu, dass diese Zwischenstufe mit der Kombination von K211I und S345T in der Entwicklung der AZT-Resistenz nicht durchlaufen wird. Ähnliches gilt bei HIV beispielsweise für die Kombination der TAMs M41L und K70R: Zusammen mit weiteren TAMs können beide Mutationen gemeinsam vorkommen, in Abwesenheit weiterer TAMs führt die Kombination von M41L und K70R jedoch zu einem Replikationsdefekt und das Vorhandensein nur dieser beiden Mutationen wird daher in der Entwicklung der AZT-Resistenz nicht beobachtet (Jeeninga et al. 2001). Auch Zwischenstufen, die einen noch nachweisbaren, aber bei allen AZT-Konzentrationen einen deutlich niedrigeren Titer als das Ausgangsprodukt aufweisen, werden vermutlich nicht vorgefunden, da das Virus keinen Selektionsvorteil hieraus ziehen würde. Damit scheidet K211I beispielsweise als erste Mutation aus. Auch als zweite Mutation zu einer der drei anderen Mutationen dazu führt K211I stets zu negativen Auswirkungen. Erst als dritte und vor allem als vierte Mutation führt K211I in Anwesenheit von 5 oder 50  $\mu\text{M}$  AZT zu einer Titererhöhung. K211I ist also eine späte Mutation, die erst bei höheren AZT-Konzentrationen selektiert wird, und auch dann nur, wenn bereits mindestens zwei andere Mutationen vorliegen.

Über den Zeitpunkt des Auftretens der anderen drei Mutationen können keine derart wahrscheinlichen Aussagen wie über K211I gemacht werden, da der Erwerb einer dieser Mutationen bei bestimmten AZT-Konzentrationen jeweils zu einer Titererhöhung führt. Diese Titererhöhungen sind jedoch unterschiedlich ausgeprägt, so dass zumindest mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit bestimmte Abfolgen in der Entwicklung von SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> aufgetreten sind (*Abbildung 23*).



**Abbildung 23: Wahrscheinliche Reihenfolge des Mutationserwerbs in SFVmac<sub>AZTres</sub>**

Dargestellt sind mögliche Reihenfolgen des Erwerbs von AZT-Resistenz-Mutationen in SFVmac, vom wildtypischen SK29 oben ausgehend nach unten hin zu BK64 mit allen vier für die AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZTres</sub> verantwortlichen pol-Mutationen. Graue Striche zeigen eine Titererhöhung in Abwesenheit von AZT an, grüne, blaue und violette Verbindungen dementsprechend Titererhöhungen bei 0,5 μM, 5 μM bzw. 50 μM AZT. Die dünnen Striche entsprechen einer Titererhöhung auf maximal das Doppelte, die etwas dickeren auf maximal das Fünffache, wieder dickere auf maximal das Zehnfache und die dicksten Striche zeigen eine Erhöhung des Titers auf mehr als das Zehnfache an. Die wahrscheinlichste Reihenfolge von Konstrukten ist orange hervorgehoben, nicht unwahrscheinliche Alternativen sind gelb gezeigt.

Unter diesem Gesichtspunkt handelt es sich bei S345T um eine frühe Mutation. Am wahrscheinlichsten scheint dabei der Erwerb von S345T gleich als erste Mutation, wenn auch ein Auftreten nach E350K und besonders I224T möglich ist. I224T und E350K wären demnach die mittleren Mutationen, wobei es bei E350K am

wahrscheinlichsten ist, dass sie nach S345T und vor K211I auftritt, während I224T von allen Mutationen am ehesten zu jedem beliebigen Zeitpunkt auftreten kann. Auch kommt es vermutlich zur Bevorzugung leicht unterschiedlicher Abfolgen der Mutationen, je nachdem ob die AZT-Konzentration langsam oder schnell ansteigt bzw. eher niedrig oder besonders hoch ist. I224T erscheint demnach eher früher bei niedrigen oder langsam steigenden AZT-Konzentrationen (siehe die grauen und grünen Verbindungen in *Abbildung 23*, sowie zum Beispiel den Weg über BK65 und BK78 zu BK79), während bei schnell steigenden oder von Beginn an hohen AZT-Konzentrationen mit einem früheren Auftreten von E350K und K211I zu rechnen ist (siehe die blauen und violetten Verbindungen und beispielsweise den Weg über SK50 oder SK51 zu SK39, gefolgt von BK37 und schließlich BK64).

Insgesamt findet sich also nach diesen Überlegungen folgende Reihenfolge am häufigsten:

- 1.) SK50 mit S345T,
- 2.) SK39 zusätzlich mit E350K,
- 3.) BK79 zusätzlich mit I224T und
- 4.) BK64 zusätzlich mit K211 als letzter Mutation.

Die häufigste Variation wäre der Tausch von E350K und I224T als zweiter und dritter Mutation, so dass die Entwicklung von SK29 und SK50 nicht über SK39, sondern über BK78 zu BK79 und schließlich BK64 ginge.

Außer Acht gelassen wurde bei der Betrachtung der Abfolge von AZT-Resistenz-Mutationen bisher, dass vermutlich bei SFV<sub>mac</sub> bestimmte Transitionen und Transversionen bevorzugt auftreten, ähnlich wie dies kürzlich für PFV gezeigt wurde (Boyer et al. 2007). Für SFV<sub>mac</sub> liegen diesbezüglich keine Ergebnisse vor, da jedoch selbst von den zu unterschiedlichen Subfamilien gehörenden PFV und HIV-1 relativ ähnliche Mutationen bevorzugt werden, kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sich SFV<sub>mac</sub> ähnlich verhält wie das zum selben Genus gehörende PFV. Demnach würde es sich bei der zu E350K führenden Transition G→A um die häufigste Mutation überhaupt handeln (25 von 70 berichteten Mutationen bei Boyer et al.). Die zu S345T führende Transversion T→A war ebenfalls relativ häufig (6 von 70), während die zu I224T führende Transition A→T (1 von 70) und die zu K211I führende Transversion A→T (0 von 70) eher selten bzw. gar nicht auftraten. Da also bestimmte Mutationen häufiger sind, ist davon

auszugehen, dass diese auch früher als andere selektiert werden können, da eine viel größere Anzahl von viralen Zyklen benötigt wird, bis zufällig auch einmal eine der seltenen Mutationen auftritt. Unter diesem Gesichtspunkt wäre also folgende Entwicklung logisch:

- 1.) SK51 mit E350K,
- 2.) SK39 zusätzlich mit S345T,
- 3.) BK79 zusätzlich mit I224T und
- 4.) BK64 zusätzlich mit K211I als letzter Mutation.

Vergleicht man dies mit der oben erwähnten wahrscheinlichsten Reihenfolge nach AZT-Resistenz-Gesichtspunkten, ist festzustellen, dass dabei lediglich die ersten beiden Mutationen vertauscht sind, also SK51<sub>KISK</sub> anstelle von SK50<sub>KITE</sub> als erste Zwischenstufe zu finden ist, während die übrige Entwicklung über SK39<sub>KITK</sub> und BK79<sub>KTTK</sub> zu BK64<sub>ITTK</sub> sich nicht unterscheidet. Sollte also die Wahrscheinlichkeit der einzelnen Transitionen und Transversionen bei SFV<sub>mac</sub> denen bei PFV ungefähr entsprechen, spräche dies im Großen und Ganzen nicht gegen die vermutete wahrscheinlichste Reihenfolge aufgrund der Überlegungen zur AZT-Resistenz der einzelnen Konstrukte mit unterschiedlichen Kombinationen von AZT-Resistenz-Mutationen. Vielmehr ergibt sich zum Beispiel aus beiden, völlig voneinander unabhängigen Überlegungen, dass es sich bei K211I mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um eine späte Mutation handelt.

## 4.2 Keine AZT-Resistenz bei PFV

Im Gegensatz zu SFV<sub>mac</sub> waren die Versuche, ein AZT-resistentes PFV zu gewinnen, nicht erfolgreich. Bereits der Ansatz, in Zellkultur unter steigenden AZT-Konzentrationen ein resistentes Isolat zu selektieren, hatte aus unbekanntem Gründen zwar bei SFV<sub>mac</sub>, nicht aber bei PFV und SFV<sub>cpz</sub> zum Erfolg geführt.

In dieser Arbeit wurde nun versucht, durch das Einfügen von Mutationen in den infektiösen PFV-Klon pcz<sub>HSRV2</sub> ein resistentes Konstrukt zu erhalten. Die Mutationen entsprachen dabei denjenigen, die bei SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> festgestellt worden waren oder in anderen Ansätzen solchen, die den TAMs bei HIV entsprechen sollen (Yvon-Groussin et al. 2001).

Das PFV-Konstrukt BK54, das an den vier Positionen der AZT-Resistenzmutationen von SFVmac dieselben Aminosäuren aufweist wie SFVmac<sub>AZTres</sub>, zeigte jedoch einen Replikationsdefekt in Abwesenheit von AZT und auch in Anwesenheit von 0,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M keinen Vorteil gegenüber dem wildtypischen HSRV2 (siehe 3.2.2). Dabei liegt an Position 224 bereits im wildtypischen PFV das in SFVmac<sub>AZTres</sub> vorgefundene Threonin vor, während die anderen drei Positionen durch zielgerichtete Mutagenese entsprechend geändert wurden.

Konstrukte mit Einzelmutationen und verschiedenen Kombinationen der Mutationen wurden ebenfalls kloniert. Die AZT-Resistenz-Tests mit diesen Konstrukten wurden zwar nur ein- bis zweimal durchgeführt, so dass eine statistisch zuverlässige Aussage über die jeweiligen Titer letztlich nicht möglich ist, jedoch wurden die Ergebnisse als ausreichend angesehen, um eine entscheidende AZT-Resistenz dieser Konstrukte ausschließen zu können, zumindest in Größenordnungen, wie sie bei SFVmac gefunden wurde.

Die Unterschiede zwischen SFVmac und PFV bezüglich der AZT-Resistenz sind dabei durchaus überraschend, da die Reverse Transkriptase dieser beiden Viren zu etwa 80% identische Aminosäuren, bzw. sogar zu knapp 90% ähnliche Aminosäuren aufweisen (Mergia et Luciw 1991), und damit näher miteinander verwandt sind als etwa HIV-1 und HIV-2, die zwar auch Unterschiede in der Entwicklung einer AZT-Resistenz zeigen, jedoch nicht so ausgeprägt, wie dies bei SFVmac und PFV der Fall zu sein scheint (Boyer et al. 2006).

Es gab Überlegungen, nach denen die Sensitivität von Foamyviren gegenüber AZT und die Resistenz gegenüber einigen anderen NRTIs auf Aminosäureresten beruht, die den Orten der jeweiligen Resistenzmutationen in HIV entsprechen (Yvon-Groussin et al. 2001). An den entsprechenden Stellen von AZT-Resistenz-Mutationen weist PFV dabei häufig die in HIV wildtypische Aminosäure auf, während an den entsprechenden Stellen von Resistenz-Mutationen gegenüber 3TC und anderen NRTIs häufig die Aminosäure vorliegt, die in resistenten HIV-Isolaten vorgefunden wird.

Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass beispielsweise die Resistenz zumindest von PFV gegenüber 3TC nicht daran liegt, dass im YXDD-Motiv des aktiven Zentrums ein Valin vorliegt, wie bei resistenten HIV-Isolaten, da die Mutation zu einem

Methionin, wie es im wildtypischen HIV gefunden wird, das Virus nicht sensitiv gegenüber 3TC machte (Rinke et al. 2002).

In dieser Arbeit wurden nun einige der Aminosäuren, die von Yvon-Groussin et al. für die Sensitivität von PFV gegenüber AZT verantwortlich gemacht wurden, entsprechend den Resistenz-Mutationen von HIV geändert. Es zeigte sich jedoch, dass zumindest die Mutationen V343F oder K219E bzw. die Kombination von V343Y und K219Q dem prototypischen Foamyvirus nicht zu einer Resistenz gegenüber AZT verhalf, sondern vielmehr sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von AZT zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Titererniedrigung im Vergleich mit dem wildtypischen Virus führten. Auch hatten sich ja bei SFV<sub>mac</sub>, das an diesen Positionen die gleichen Aminosäuren wie PFV aufweist, bei der Selektion in Anwesenheit von AZT völlig andere Mutationen ergeben, die nicht den TAMs von HIV entsprechen. Es scheint also, dass die Aminosäuren, die aufgrund von Sequenzvergleichen und Computersimulationen für die Sensitivität von Foamyviren gegenüber AZT verantwortlich gemacht wurden, in Wirklichkeit nicht in dem geforderten Ausmaß zu den Gegebenheiten beitragen.

### **4.3 AZT-Resistenz und Reverse Transkriptase bei Foamyviren und HIV**

#### **4.3.1 Pyrophosphorylyse in Anwesenheit von ATP bei HIV-1, HIV-1 mit TAMs, HIV-2, PFV, SFV<sub>mac</sub> und SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub>**

Während bei HIV eine Unmenge an Daten zu den Hintergründen der AZT-Resistenz existieren, wurden zur AZT-Resistenz bei Foamyviren bisher keine direkten experimentellen Arbeiten veröffentlicht. In zwei Veröffentlichungen wurden allerdings Überlegungen in Bezug auf eine mögliche AZT-Resistenz von Foamyviren angestellt. Bereits angesprochen wurden die Hypothesen der einen Arbeit, dass bei Foamyviren die gleichen Aminosäuren wie bei HIV für Sensitivität oder Resistenz gegenüber den einzelnen NRTIs verantwortlich sein sollen (Yvon-Groussin et al. 2001), und dass sich Teilaspekte dieser Hypothese bisher weder hier noch an anderer Stelle bestätigen ließen (Rinke et al. 2002). In der anderen Arbeit wurde die Reverse Transkriptase von PFV mit der von HIV-1 verglichen, und zwar unter anderem in

Bezug auf die Prozessivität, sowie die Fähigkeit zur Pyrophosphorylyse entweder mit  $PP_i$  oder ATP als Pyrophosphatdonor (Boyer et al. 2004). Dabei ergab sich eine deutlich höhere Prozessivität der foamyviralen RT und eine entsprechend höhere Fähigkeit zur Pyrophosphorylyse mit  $PP_i$  als Donor, wobei die Pyrophosphorylyse mit  $PP_i$  als Donor genau der umgekehrten Reaktion des Einbaus eines Nukleotids in den wachsenden DNA-Strang entspricht. Dagegen zeigte sich, dass PFV eine sogar leicht schlechtere Fähigkeit als HIV-1 aufwies, mit ATP als Pyrophosphatdonor eingebautes AZT wieder zu entfernen. Besonders im Verhältnis zur höheren Prozessivität ergibt sich also bei PFV eine relativ gesehen sehr viel schlechtere Fähigkeit als bei HIV-1, Pyrophosphorylyse mit ATP als Pyrophosphatdonor zu betreiben. Dies wurde letztlich so interpretiert, dass die Entwicklung einer AZT-Resistenz bei PFV mit dem Mechanismus einer vermehrten Pyrophosphorylyse mit ATP als Donor unwahrscheinlich ist, da wildtypisches PFV hierfür deutlich schlechtere Ausgangsbedingungen aufweist als HIV-1. Ähnliches gilt für Unterschiede in der AZT-Resistenz von HIV-1 und HIV-2 (Boyer et al. 2006). Wildtypisches HIV-1 bindet besser als HIV-2 ATP und weist demnach bereits ohne Mutationen bessere Fähigkeiten als HIV-2 zur Pyrophosphorylyse mit ATP als Donor auf. Bei der Entwicklung einer AZT-Resistenz bevorzugt HIV-1 im Gegensatz zu HIV-2 nun deutlich den Erwerb von TAMs, der besonders im Fall von T215Y/F eine bessere Bindung von ATP ermöglicht, was zu einer vermehrten Pyrophosphorylyse und damit zur AZT-Resistenz führt (Meyer et al. 1999; Boyer et al. 2001; Naeger et al. 2002). Dagegen findet sich bei wildtypischem HIV-2 ein verminderter Einbau von AZT im Vergleich zu HIV-1, der auch für die generell niedrigere Empfindlichkeit von HIV-2 gegenüber AZT verantwortlich ist (Reid et al. 2005). Aufgrund dieser anderen Ausgangsbedingungen findet sich nun bei HIV-2 in Anwesenheit von AZT häufiger die Mutation Q151M, die dem retroviralen Enzym das Erkennen des falschen Nukleotids AZT erleichtert, also zur sterischen Inhibition führt (Deval et al. 2002). Aufgrund der im Vergleich zu HIV-1 verminderten Fähigkeit von PFV, ATP als Pyrophosphatdonor in der Pyrophosphorylyse zu nutzen, folgerten die Autoren also, dass die Entwicklung einer AZT-Resistenz bei PFV schwierigere Voraussetzungen hat als bei HIV und dass weder hier noch an anderer Stelle ein AZT-resistentes PFV beschrieben werden konnte, würde durchaus zu diesen Überlegungen passen (Boyer et al. 2004).

Während zwar meistens davon ausgegangen wird, dass die bei PFV gewonnenen Erkenntnisse sich im Großen und Ganzen auf andere simiane Foamyviren übertragen lassen, und dies auch bei verschiedenen Gegebenheiten gerade für das nach PFV wohl am zweitbesten untersuchte simiane Foamyvirus SFVmac gezeigt wurde, gibt es bisher letztlich keine veröffentlichten Untersuchungen für SFVmac bezüglich der Prozessivität der Reversen Transkriptase oder der Möglichkeit, Pyrophosphorylyse mit ATP als Donor zu betreiben (*Tabelle 22*). Gerade aufgrund der Unterschiede von SFVmac und PFV bezüglich der AZT-Resistenz erscheint es aber fraglich, ob die bei PFV gewonnenen Erkenntnisse auch in diesem Fall ohne weiteres auf SFVmac übertragen werden können. Würde sich aber tatsächlich bei SFVmac eine ähnlich hohe Prozessivität wie bei PFV und eine ähnlich geringe Möglichkeit zur Pyrophosphorylyse mit ATP als Donor finden, wäre nach Boyer et al. möglicherweise also eigentlich der Mechanismus der sterischen Inhibition als Ursache der AZT-Resistenz oder gar ein bisher nicht bekannter Mechanismus wahrscheinlicher als die ATP-vermittelte Pyrophosphorylyse. In biochemischen Untersuchungen konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass die in SFVmac<sub>AZTres</sub> vorgefundenen Mutationen als Resistenzmechanismus eine Exzision von AZTMP in Anwesenheit von ATP aufweisen (Maximilian Hartl und Birgitta Wöhr, pers. Mitteilung). Ob nun wildtypisches SFVmac eine an sich ähnlich niedrige Fähigkeit zur ATP-vermittelten Pyrophosphorylyse aufweist wie PFV und trotzdem eine AZT-Resistenz über diesen Mechanismus entwickelt, oder ob sich wildtypisches SFVmac und PFV in diesem Punkt unterscheiden, also SFVmac eine von sich aus bessere Fähigkeit zur ATP-vermittelten Pyrophosphorylyse aufweist, und darin die Ursache zu sehen ist, dass sich bei SFVmac eine AZT-Resistenz entwickeln kann, bei PFV jedoch nicht, ist noch unbekannt. Auch ist unklar, ob die verbesserte ATP-vermittelte Pyrophosphorylyse in Anwesenheit der jeweiligen AZT-Resistenz-Mutationen bei HIV-1 und SFVmac auf ähnlichen Ursachen beruht. Jedenfalls liegen die Resistenz-Mutationen in SFVmac<sub>AZTres</sub> durchaus in Nachbarschaft zu den Aminosäuren, die den TAMs von HIV entsprechen (siehe 3.1.1.6), wenn sie sich auch nicht direkt entsprechen und die Mutationen völlig andere sind.

	<b>HIV-1</b>	<b>HIV-2</b>	<b>SFVmac</b>	<b>PFV</b>
<b>Prozessivität der wtRT</b>	niedriger als PFV	vergleichbar HIV-1	unbekannt	hoch
<b>Möglichkeit zur Pyrophosphorylyse in Anwesenheit von ATP</b>	relativ hoch	niedriger als HIV-1	unbekannt	niedriger als HIV-1
<b>Sensitivität der wtRT gegen AZT</b>	hoch	niedriger als HIV-1	hoch	hoch
<b>AZT-Resistenz beschrieben</b>	ja	ja	ja	nein
<b>Bevorzugter Mechanismus der AZT-Resistenz</b>	Pyro-phosphorylyse in Anwesenheit von ATP (vermittelt durch TAMs); sterische Inhibition (vermittelt durch Q151M-Komplex) selten, aber möglich	Sterische Inhibition (vermittelt durch Q151M-Komplex); Pyro-phosphorylyse (vermittelt durch TAMs) seltener	Pyro-phosphorylyse in Anwesenheit von ATP (vermittelt durch K211I, I224T, S345T und E350K); sterische Inhibition unbekannt	keine AZT-Resistenz bekannt
<b>Methionin im YXDD-Motiv des aktiven Zentrums</b>	wildtypisch 3TC-sensitiv	wildtypisch 3TC-sensitiv	nicht untersucht	replikations-defekt 3TC-resistent
<b>Valin im YXDD-Motiv des aktiven Zentrums</b>	3TC-resistent	3TC-resistent	wildtypisch 3TC-resistent	wildtypisch 3TC-resistent

***Tabelle 22: Reverse Transkriptase und AZT-Resistenz bei verschiedenen Retroviren***

*Vergleichende Zusammenfassung einiger im Text behandelte Aspekte der Reversen Transkriptase und der AZT-Resistenz bei den Foamyviren SFVmac und PFV, sowie den Lentiviren HIV-1 und HIV-2 (Rinke et al. 2002; Boyer et al. 2004; Boyer et al. 2006).*

### **4.3.2 AZT-Resistenz bei anderen Foamyviren als SFVmac und PFV**

Während in dieser Arbeit ein AZT-resistentes SFVmac beschrieben wurde, und die Versuche zur Generierung eines AZT-resistenten PFV nicht erfolgreich waren, wurde an anderer Stelle berichtet, dass FFV möglicherweise eine gewisse natürliche Resistenz aufweist (Roy et al. 2003). Wie der Sequenzvergleich von FFV mit SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> zeigt, beruht diese mögliche Teilresistenz wohl auf anderen Ursachen als die bei SFVmac beobachtete AZT-Resistenz (siehe 3.1.1.5). Auch für FFV ist dabei die Prozessivität der RT oder die Möglichkeit zur ATP-vermittelten Pyrophosphorylyse unbekannt, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob beispielsweise die natürliche Resistenz von FFV im Vergleich mit PFV oder SFVmac auf einem vermindertem Einbau von AZT beruht wie die natürliche Resistenz von HIV-2 im Vergleich mit HIV-1 (Boyer et al. 2006).

Interessant wäre möglicherweise die Untersuchung der Frage, ob SFVagm, das näher mit SFVmac verwandt ist als SFVcpz oder PFV (Bieniasz et al. 1995; Schweizer et Neumann-Haefelin 1995; Thümer et al. 2007), und beispielsweise als einziges untersuchtes Foamyvirus als Aminosäure 211 in Pol ein Lysin aufweist wie SFVmac (siehe 3.1.1.5), in Anwesenheit von AZT die bei SFVmac<sub>AZT<sup>res</sup></sub> beschriebenen Mutationen entwickelt bzw. ob das Einführen dieser Mutationen in SFVagm zu einer Resistenzentwicklung wie bei SFVmac und nicht zu einem Replikationsdefekt wie bei PFV führt.

### **4.3.3 Offene Fragen und Ausblick**

Die Tatsache, dass die zu AZT-Resistenz führenden Mutationen in SFVmac weder den TAMs noch dem Q151M-Komplex in HIV entsprechen, ist auch insofern bemerkenswert, als beispielsweise bei Lamivudin (3TC) bei sehr unterschiedlichen Viren ähnliche Mutationen selektiert werden: Lamivudin wird nicht nur bei HIV-Infektionen, sondern auch bei Hepatitis B eingesetzt, und ähnlich wie bei HIV ist bei HBV die Mutation von Methionin zu Valin (oder Isoleucin) im YXDD-Motiv des aktiven Zentrums bei Resistenz gegenüber 3TC zu finden (Bartholomew et al. 1997; Allen et al. 1998), obwohl diese beiden Viren keineswegs näher miteinander verwandt sind als SFVmac und HIV.

Die weitere Untersuchung von SFVmac<sub>AZTres</sub> könnte daher das allgemeine Wissen um NRTI-Resistenzen um völlig neue Aspekte erweitern, auch da es sich um ein Virus handelt, das deutlich entfernter mit HIV verwandt ist, als andere Viren, zu denen Untersuchungen zu einer AZT-Resistenz vorliegen, wie beispielsweise das feline Immundefizienzvirus, FIV (Remington et al. 1991; North et LaCasse 1995; Smith et al. 1998). Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Durchführung einiger Versuche an SFVmac<sub>AZTres</sub>, die für AZT-resistentes HIV bereits durchgeführt wurden. An erster Stelle steht hier die Frage nach dem Mechanismus der AZT-Resistenz bei SFVmac, aber auch die Auswirkung der AZT-Resistenz-Mutationen auf die Prozessivität oder Fehlerrate der foamyviralen RT wäre untersuchenswert, oder die Frage, ob die beschriebenen Mutationen auch Auswirkungen auf die Sensitivität bzw. Resistenz von SFVmac gegenüber anderen NRTIs haben. Bei HIV ist beispielsweise bekannt, dass die zu 3TC-Resistenz führende Mutation M184V eine bessere Ansprechbarkeit auf AZT nach sich zieht (Naeger et al. 2001), und der ähnlich gelagerte Fall einer besseren Ansprechbarkeit von SFVmac auf 3TC oder andere NRTIs in Anwesenheit der AZT-Resistenz-Mutationen, wäre durchaus denkbar. Möglich wäre aber auch ein umgekehrter Effekt, also eine weitere Resistenzhöhung gegen andere NRTIs in Anwesenheit der in SFVmac<sub>AZTres</sub> festgestellten Mutationen. Für einige Gegebenheiten wurde hier oder an anderer Stelle allerdings bereits gezeigt, dass sich die Verhältnisse bei HIV und Foamyviren bezüglich Sensitivität oder Resistenz gegenüber NRTIs nicht ohne weiteres übertragen lassen. So führte die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung von PFV mit einigen der TAMs bei HIV entsprechenden Mutationen nicht zur Generierung einer AZT-Resistenz und die von anderen durchgeführten Versuche zur Gewinnung eines 3TC-sensitiven PFV durch die Mutation von Valin zu Methionin im YXDD-Motiv des aktiven Zentrums erbrachte ebenfalls Ergebnisse, die sich von der Situation bei HIV unterscheiden (Rinke et al. 2002). Interessant wäre in diesem Zusammenhang sicherlich auch eine Untersuchung, ob diese Mutation bei SFVmac ähnliche Ergebnisse wie bei PFV erbringt.

Andererseits ist nicht völlig ausgeschlossen, dass nicht doch gewisse Aminosäuren, die bei HIV wichtige Rollen in der AZT-Resistenz einnehmen, auch bei Foamyviren eine solche Aufgabe übernehmen. Noch nicht untersucht wurden etwa die Positionen in PFV oder SFVmac, die den bei HIV bekannten TAMs M41L, D67N, K70R oder

L210W entsprechen. Auch findet sich bei PFV an der Position, die der Q151M-Mutation bei HIV entspricht, ein Glutamin (Q), und es bleibt offen, ob hier die Mutation zu Methionin eine AZT-Resistenz verursachen würde. Auch ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass an den Positionen, die in PFV den Mutationen in HIV entsprechen, die unter anderen antiretroviralen Substanzen selektiert werden und zu einer Sensitivierung gegenüber AZT führen, sich bei PFV häufig diejenige Aminosäure findet, die in HIV für die Sensitivierung verantwortlich gemacht wird. Dies gilt etwa an den Positionen in PFV, die in HIV den Mutationen L74V, L100I oder M184V entsprechen. Möglicherweise könnte hier in PFV das Einführen der jeweils in HIV-wildtypischen Aminosäuren, die dort mit einer geringeren Sensitivität gegenüber AZT assoziiert sind, zu einer gewissen Resistenz führen.

SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> wurde durch steigende AZT-Konzentrationen in Zellkultur selektiert. Unklar ist dabei, ob sich *in vivo* dasselbe Muster an Mutationen herausbilden würde, wo auch meist nicht steigende, sondern im Idealfall eine von Anfang an gleichbleibend hohe AZT-Konzentration vorherrscht, oder ob dann andere Mutationen bevorzugt würden, oder möglicherweise gar keine AZT-Resistenz zu Stande käme. Für HIV wurde allerdings gezeigt, dass sich die *in vitro* selektierten Mutationen zum Großteil mit den *in vivo* vorgefundenen decken. Es ist also nicht völlig ohne Berechtigung anzunehmen, dass auch *in vivo* SFV<sub>mac</sub> leichter eine AZT-Resistenz entwickelt als SFV<sub>cpz</sub> oder PFV. Sollte dies so sein, könnte man wiederum den Schluss ziehen, dass für eventuelle zukünftige Untersuchungen, in denen z. B. in einem Versuchstier zu einem bestimmten Zeitpunkt die virale Replikation durch AZT unterbunden werden soll, bevorzugt SFV<sub>cpz</sub> oder PFV und nicht SFV<sub>mac</sub> herangezogen werden sollte, da letzteres zur Entwicklung einer AZT-Resistenz neigt und einen solchen Versuchsansatz erschwert. Auch bei einem Einsatz von viralen Vektoren am Menschen wäre die unterschiedliche Neigung von Foamyviren, eine AZT-Resistenz zu entwickeln, unter Umständen zu bedenken. Andererseits kann SFV<sub>mac</sub><sub>AZT<sup>res</sup></sub> möglicherweise in zukünftigen Versuchen benutzt werden, in denen beispielsweise bestimmte Eigenschaften zweier Konstrukte in Abwesenheit und in Anwesenheit von AZT untersucht werden, von denen eines eine resistente RT aufweist und das andere nicht. Es lässt sich in einem solchen System die Aktivität der RT durch AZT ausschalten und dann durch Zugabe der resistenten RT wieder

einführen, wodurch untersucht werden kann, ob eine Reverse Transkriptase als Protein oder die Reverse Transkription als Vorgang für bestimmte Gegebenheiten benötigt wird.

Bei AZT-resistentem HIV waren zunächst vier TAMs festgestellt worden, während die Entdeckung der fünften und sechsten Mutation, M41L und L210W, erst in den folgenden Jahren berichtet wurde (Larder et Kemp 1989; Kellam et al. 1992; Harrigan et al. 1996). Es ist also durchaus möglich, dass sich in Zukunft auch bei SFV<sub>mac</sub> noch weitere Mutationen zu den in dieser Arbeit beschriebenen vier gesellen, die zu einer AZT-Resistenz beitragen. Auch wäre es vorstellbar, dass es bei SFV<sub>mac</sub> wie bei HIV mit den TAMs einerseits und dem Q151M-Komplex andererseits zwei unterschiedliche Mechanismen der AZT-Resistenz gibt, für die zwei unterschiedliche Muster an Mutationen verantwortlich sind, oder dass es ebenfalls wie bei HIV mit TAM-1 und TAM-2 zwei sich überlappende Muster von Mutationen gibt, von denen die in dieser Arbeit beschriebenen vier nur eines darstellen (Marcelin et al. 2004; Boyer et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, konnte kürzlich der Mechanismus der AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub><sup>AZT<sub>res</sub></sup> aufgeklärt werden (Maximilian Hartl und Birgitta Wöhrl, pers. Mitteilung). Es handelt sich um eine Exzision von AZTMP in Gegenwart von ATP, also einer Pyrophosphorylyse, die der durch TAMs verursachten AZT-Resistenz von HIV-1 entspricht, im Gegensatz zur sterischen Inhibition, wie sie durch den Q151M-Komplex vor allem bei HIV-2 verursacht wird. Durch die weitere Untersuchung der Hintergründe der AZT-Resistenz von SFV<sub>mac</sub><sup>AZT<sub>res</sub></sup> kann sicherlich das Wissen um den allgemeinen Mechanismus dieser ATP-vermittelten Pyrophosphorylyse als Ursache einer NRTI-Resistenz weiter erweitert werden. Andererseits könnte die Tatsache, dass nun bekannt ist, dass K211I, I224T, S345T und E350K in SFV<sub>mac</sub> zum gleichen Effekt führen wie die TAMs in HIV, auch als Hinweis für die Funktion bestimmter Aminosäuren in wildtypischem SFV<sub>mac</sub> angesehen werden, da die AZT-Resistenz-Mutationen von SFV<sub>mac</sub> ähnlich wie die TAMs von HIV wohl direkt oder indirekt mit der ATP-Bindung oder jedenfalls der damit zusammenhängenden Pyrophosphorylyse zu tun haben.

#### 4.4 Zeitpunkt der Reversen Transkription bei Foamyviren

Die Untersuchung des Zeitpunkts der Reversen Transkription bei Foamyviren war nicht eigentlicher Gegenstand dieser Arbeit. Bei den Versuchen zur Optimierung eines Testsystems für AZT-Resistenz bei Foamyviren (siehe 3.1.4) wurden aber einige Ergebnisse erhalten, die in Hinblick auf diese Frage interessant sein könnten.

Es wurde bereits erwähnt, dass die Reverse Transkription bei Foamyviren zu einem großen Teil spät im Replikationszyklus stattfindet, also in der virusproduzierenden Zelle, dass dies einer der entscheidenden Unterschiede der Foamyviren im Vergleich zu den Orthoretroviren ist und dass dies unter anderem in Versuchen festgestellt wurde, in denen AZT bei verschiedenen Zeitpunkten zugegeben wurde (Yu et al. 1996a; Moebes et al. 1997; Yu et al. 1999; Roy et al. 2003). Es gibt jedoch daneben auch Überlegungen, nach denen eine teilweise Reverse Transkription früh im Replikationszyklus, also in der infizierten Zielzelle, ebenfalls eine gewisse Rolle spielt (Delelis et al. 2003).

Während bei Zugabe von 5 oder 50  $\mu\text{M}$  AZT bei der Virusproduktion oder bei der Titration oder bei beiden Zeitpunkten im Prinzip die bekannten Gegebenheiten bestätigt wurden, ergab die erstmals durchgeführte Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT folgende Ergebnisse: Bei Zugabe nur bei der Virusproduktion eine Reduktion des Titers auf 52,9%, bei Zugabe nur bei der Titration eine Reduktion auf 40,9% und bei Zugabe sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration eine Reduktion auf 1,1% (siehe 3.1.4). Dies lässt sich, zusammen mit den Ergebnissen bei Versuchen mit 5  $\mu\text{M}$  AZT, nämlich Reduktion des Titers auf unter 5% in Anwesenheit von AZT während der Virusproduktion und Reduktion auf 45% in Anwesenheit von AZT während der Titration, zum Beispiel folgendermaßen interpretieren (*Abbildung 24*): Die Reverse Transkription in der virusproduzierenden Zelle wird jeweils in einer gewissen Anzahl vollständig durchgeführt, mindestens bis zu einem bestimmten Punkt durchgeführt (Punkt X) oder nicht bis zu diesem Punkt X durchgeführt. In der Zielzelle kann nun die Reverse Transkription vervollständigt werden, sofern sie mindestens bis zum Punkt X durchgeführt wurde, während die Reverse Transkription bis zum Punkt X nicht in der Zielzelle geschehen kann, sondern nur in der virusproduzierenden Zelle. Zunächst soll nun davon ausgegangen werden, dass normalerweise der Anteil von Transkripten, die in der virusproduzierenden Zelle vorgefunden werden, zu jeweils

gleichen Teilen aus solchen besteht, die vollständig sind, und solchen, die mindestens bis zum Punkt X revers transkribiert wurden, aber nicht vollständig sind. Außerdem soll vorausgesetzt werden, dass alle unvollständigen, aber über den Punkt X hinausgehenden Transkripte, in der Zielzelle vervollständigt werden. Das heißt, von den letztlich in der Zielzelle integrierten Proviren würde die eine Hälfte vollständig in der virusproduzierenden Zelle von der Reversen Transkriptase generiert, bei der anderen Hälfte fände die Reverse Transkription mindestens bis zum Punkt X ebenfalls in der virusproduzierenden Zelle statt, die Vollendung der Reversen Transkription jedoch in der Zielzelle.

Bei Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT bei der Titration, also in der Zielzelle, wird nun die Vollendung der Reversen Transkription verhindert, so dass im Vergleich zur Situation in Abwesenheit von AZT nur die Hälfte des Titers erreicht wird, da nur die Proviren vollständig sind, bei denen die Reverse Transkription bereits in der virusproduzierenden Zelle abgeschlossen wurde.

Bei Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT während der Virusproduktion wird andererseits die vollständige Reverse Transkription in der virusproduzierenden Zelle verhindert, während die Reverse Transkription bis zum Punkt X in der Hälfte der Fälle noch stattfinden kann. Diese Produkte können in der Zielzelle fertiggestellt werden, so dass der Titer wiederum etwa die Hälfte des Titers in Abwesenheit von AZT beträgt.

Bei Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT sowohl bei der Virusproduktion als auch bei der Titration können demnach in der virusproduzierenden Zelle keine vollständigen Transkripte hergestellt werden, während die Transkripte, die über den Punkt X hinausgehen, in der Zielzelle nicht fertiggestellt werden können, so dass der Titer sehr niedrig ausfällt.

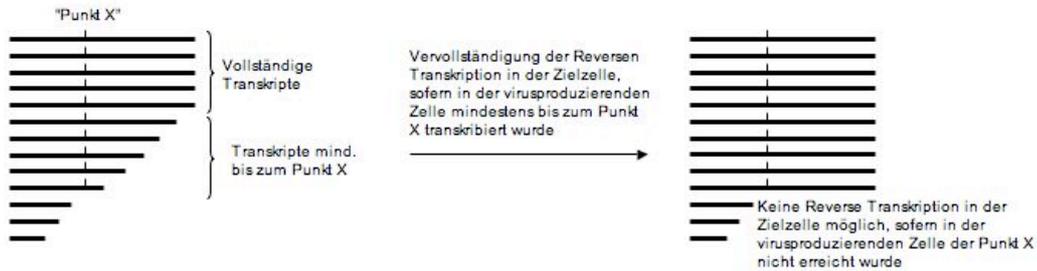
In Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  AZT bei der Titration ergibt sich der gleiche Titer wie in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT bei der Titration. Während bereits 0,5  $\mu\text{M}$  AZT die Fertigstellung von bis zum Punkt X transkribierten Genomen in der Zielzelle effizient blockiert, bleibt auch bei höheren AZT-Konzentrationen in der Zielzelle die vollständige Reverse Transkription, wie sie in der Hälfte der Fälle in der virusproduzierenden Zelle stattfindet, unbeeinflusst.

In Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  AZT in der virusproduzierenden Zelle ergibt sich dagegen ein sehr niedriger Titer, da diese höhere AZT-Konzentration im Gegensatz zu 0,5  $\mu\text{M}$  AZT auch die Reverse Transkription bis zum Punkt X vollständig inhibiert.

Reverse Transkription in der virusproduzierenden Zelle (spät im Replikationszyklus)

Reverse Transkription in der Zielzelle (früh im Replikationszyklus)

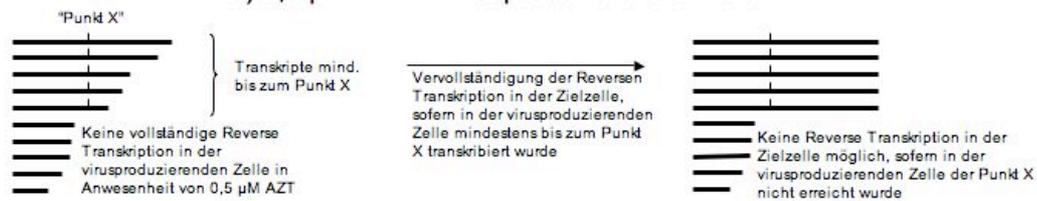
1) Kein AZT



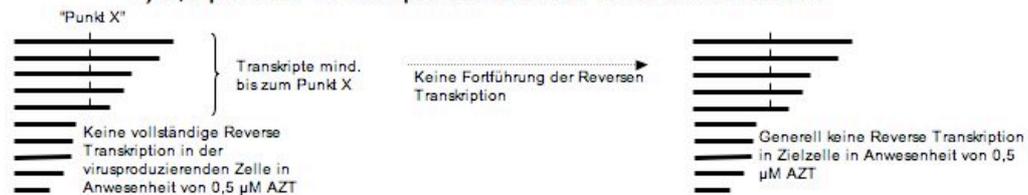
2) 0,5 µM AZT (oder mehr) in Zielzelle



3) 0,5 µM AZT in virusproduzierender Zelle



4) 0,5 µM AZT in virusproduzierender Zelle und Zielzelle



5) 5 µM AZT in virusproduzierender Zelle



**Abbildung 24: Hypothese zur Wirkung von 0,5 µM und 5 µM AZT bei Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten im viralen Replikationszyklus**

Die im Text näher erläuterte Hypothese liefert eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse, dass in Anwesenheit von 0,5 µM AZT bei der Titration (2) etwa 50% des

*Ausgangstiters in Abwesenheit von AZT (1) erreicht werden, ebenso etwa 50% in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT bei der Virusproduktion (3), während die Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration (4) oder die Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  AZT bei der Virusproduktion (5) zu einem sehr niedrigen Titer führt.*

Bisher wurde der Einfachheit halber davon ausgegangen, dass in Abwesenheit von AZT das Verhältnis von in der virusproduzierenden Zelle vollständig transkribierten Genomen zu bis zum Punkt X transkribierten Genomen 1:1 beträgt, dass von den in der virusproduzierenden Zelle bis zum Punkt X transkribierten Genomen 100% in der Zielzelle zu Ende transkribiert werden, und dass in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT in der virusproduzierenden Zelle eine Anzahl von Genomen bis zum Punkt X transkribiert wird, die 50% der Produkte entspricht, die in Abwesenheit von AZT entweder fertiggestellt oder wenigstens bis zum Punkt X transkribiert wurden. Die Ergebnisse lassen sich jedoch auch erklären, wenn hierfür andere Voraussetzungen gelten sollen, die in einem entsprechendem Verhältnis zueinander stehen. So könnte das Verhältnis vollständig transkribierter zu bis zum Punkt X transkribierten Genome beispielsweise 1:2 oder 1:100 betragen, wenn 50% bzw. 1% der in der virusproduzierenden Zelle bis zum Punkt X transkribierten Genome in der Zielzelle vervollständigt werden und in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  in der virusproduzierenden Zelle eine Anzahl von Genomen bis zum Punkt X transkribiert wird, die 67% bzw. 100% der Produkte entspricht, die in Abwesenheit von AZT entweder fertiggestellt oder wenigstens bis zum Punkt X transkribiert werden. Bei letzterem Beispiel würde also von 100 Transkripten, die in der virusproduzierenden Zelle bis zum Punkt X durchgeführt wurden, jeweils nur eines in der virusproduzierenden Zelle vervollständigt und eines in der Zielzelle, und die Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT während der Virusproduktion verhindert die vollständige Durchführung der Reversen Transkription in der virusproduzierenden Zelle, inhibiert aber nicht nennenswert die Reverse Transkription bis zum Punkt X. Welches dieser Verhältnisse tatsächlich vorherrscht, kann aus den vorliegenden Daten nicht erschlossen werden. Auch ist unklar, wie weit die Reverse Transkription in der virusproduzierenden Zelle fortgeschritten sein muss, damit sie in der Zielzelle fertiggestellt werden kann, also was genau der "Punkt X" ist. Es könnte sich sowohl um einen nur kleinen Schritt am Beginn handeln als auch um eine fast vollständige Reverse Transkription, oder um

irgendeinen der zahlreichen Schritte, die während der Reversen Transkription nötig sind (siehe auch *Abbildung 3*).

Es handelt sich bei diesen Überlegungen um unbewiesene Hypothesen, die jedoch gut zu den Ergebnissen einer biphasischen DNA-Synthese passen (Delelis et al. 2003) und den bekannten Ergebnissen bei Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  AZT nicht widersprechen (Moebes et al. 1997; Roy et al. 2003). Auch die Tatsache, dass zwar DNA als funktionelles Genom der Foamyviren angesehen wird, jedoch in Viruspartikeln sechsmal mehr RNA als DNA gefunden wird, spricht dafür, dass die Reverse Transkription in der virusproduzierenden Zelle nicht immer vollständig geschieht (Yu et al. 1996a; Yu et al. 1999).

Die Versuche mit Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Replikationszyklus wurden daneben auch, allerdings nur einmalig, mit dem PFV-Konstrukt pczHSRV2 anstelle des SFVmac-Konstruktes pSK29 durchgeführt, und erbrachten dabei vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Interessant ist auch, dass entsprechende Versuche mit dem AZT-resistenten SFVmac-Konstrukt BK3 anstelle des wildtypischen SFVmac-Konstrukts SK29 erbrachten, dass die Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT in der Zielzelle den Titer relativ gesehen ähnlich stark senkte wie bei SK29, und Erhöhungen der Konzentration auf 5  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  kaum weitere Auswirkungen zeigten. Man könnte also folgern, dass sich die Resistenz von BK3, und damit wohl auch von SFVmac<sub>AZTres</sub>, vor allem auf die Reverse Transkription in der virusproduzierenden Zelle bezieht, während die Reverse Transkription in der Zielzelle auch beim Vorhandensein von AZT-Resistenz-Mutationen durch Zidovudin gehemmt wird, und zwar maximal auch schon durch die eher geringe Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  AZT.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang sicherlich auch die Durchführung von Versuchen zur Frage nach biphasischer DNA-Synthese bzw. nach früher und später Reverser Transkription, wie sie von anderen für wildtypisches PFV bei hohen AZT-Konzentrationen durchgeführt wurden (Delelis et al. 2003), einerseits mit niedrigeren

AZT-Konzentrationen um 0,5  $\mu\text{M}$  bei PFV und/oder SFVmac und andererseits bei verschiedenen AZT-Konzentrationen mit AZT-resistentem SFVmac.

## 5 Zusammenfassung

Azidothymidin (AZT) ist ein nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NRTI), der bei HIV-Infektionen in Kombination mit anderen antiretroviralen Substanzen eingesetzt wird. AZT zeigt darüberhinaus auch eine gute Wirksamkeit gegen Foamyviren, eine Subfamilie der Retroviren mit charakteristischen Besonderheiten in ihrer Molekularbiologie und ihrem Replikationszyklus, deren Vertreter verschiedene Affenarten und andere Säugetiere infizieren, wobei sie sich sowohl im jeweils natürlichen Wirt als auch bei seltener zufälliger Infektion des Menschen apathogen zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das AZT-resistente Foamyvirus SFVmac<sub>AZTres</sub> untersucht, das in Anwesenheit steigender AZT-Konzentrationen in Zellkultur selektiert worden war. Hierzu wurde SFVmac<sub>AZTres</sub> zunächst einer genotypischen Analyse unterzogen, wobei im Vergleich mit der wildtypischen Ausgangssequenz zwei Mutationen in *gag* und vier Mutationen in *pol* nachgewiesen wurden, die zu Änderungen auf Aminosäureebene führten. Mittels PCR wurden Fragmente, die alle sechs Mutationen oder nur die vier *pol*-Mutationen enthielten, aus der Sequenz von SFVmac<sub>AZTres</sub> amplifiziert und jeweils in einen SFVmac-Klon eingefügt. Im weiteren Verlauf zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen diesen beiden Konstrukten bezüglich der Replikation in Abwesenheit oder Anwesenheit von AZT, so dass gefolgert werden konnte, dass die *gag*-Mutationen keinen Beitrag zur AZT-Resistenz leisten. Die *pol*-Mutationen befanden sich sämtlich im für die Reverse Transkriptase kodierenden Bereich und führten zu den Aminosäuresubstitutionen K211I, I224T, S345T und E350K. An Position 224 fand sich dabei in einer veröffentlichten Sequenz bereits ein Threonin, so dass hier unabhängig von der Selektion in Anwesenheit von AZT möglicherweise ein Polymorphismus vorliegt. Der Vergleich der vier Mutationen der RT von SFVmac<sub>AZTres</sub> mit den bei HIV bekannten Mustern an Mutationen wie den TAMs und dem Q151M-Komplex zeigte keine Übereinstimmungen.

Um den jeweiligen Beitrag der vier nachgewiesenen *pol*-Mutationen zur AZT-Resistenz zu untersuchen, wurden sie einzeln und in Kombinationen mittels zielgerichteter Mutagenese in einen SFVmac-Klon eingefügt und die entsprechenden Konstrukte auf ihre Replikation in Abwesenheit und Anwesenheit von 0,5  $\mu$ M, 5 $\mu$ M

und 50  $\mu\text{M}$  AZT untersucht. Hierfür wurden 293T-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid transfiziert und nach Überprüfung der gleichmäßigen Expression von Gag und Pol mittels Western Blot der virushaltige Überstand auf Zielzellen gegeben und der Titer ausgezählt. Es konnte gezeigt werden, dass keines der Konstrukte mit Einzel-, Doppel- und Dreifachmutationen eine ähnlich ausgeprägte AZT-Resistenz wie die Vierfachmutante aufwies, allerdings einige in unterschiedlichen Ausmaß teilresistent waren, während andere weder ohne noch mit AZT gut replizierten. S345T erwies sich vor E350K als die Mutation mit dem größten Beitrag zur AZT-Resistenz, I224T erhöhte den Titer in Abwesenheit und Anwesenheit um etwa den gleichen Faktor, wohingegen sich K211I in den meisten Kombinationen eher negativ auswirkte. Der Klon, in den alle vier Mutationen mittels zielgerichteter Mutagenese eingeführt worden waren, zeigte die gleiche AZT-Resistenz wie das in Zellkultur selektierte Virus. Damit war gezeigt, dass diese vier Mutationen sowohl notwendig als auch hinreichend für die AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZTres</sub> sind.

Die *pol*-Mutationen von SFVmac<sub>AZTres</sub> wurden weiterhin soweit möglich an entsprechenden Stellen in Klon des prototypischen Foamyvirus PFV eingeführt, bei dem es zuvor nicht gelungen war, ein resistentes Isolat in Zellkultur zu generieren. Das PFV-Konstrukt mit den Mutationen aus SFVmac<sub>AZTres</sub> zeigte sich jedoch nicht AZT-resistent, sondern wies einen Replikationsdefekt auf. Einige HIV-Mutationen, die in den PFV-Klon eingefügt wurden, führten ebenfalls zu keiner AZT-Resistenz. Es bestehen also bezüglich AZT-Resistenz und damit gewisser Eigenschaften der Reversen Transkriptase deutliche Unterschiede zwischen PFV und SFVmac.

Die durchgeführten Arbeiten stellen die Grundlage für weitere Untersuchungen dar, in denen beispielsweise dem biochemischen Mechanismus der AZT-Resistenz von SFVmac<sub>AZTres</sub> nachgegangen werden kann. Die gewonnenen Erkenntnisse können zum Verständnis allgemeiner Mechanismen der NRTI-Resistenz bei Retroviren ebenso beitragen wie zur weiteren Charakterisierung der foamyviralen Reversen Transkriptase an sich.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achong, B. G., P. W. Mansell, M. A. Epstein and P. Clifford (1971). "An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma." J Natl Cancer Inst **46**(2): 299-307.
- Aguzzi, A., E. F. Wagner, K. O. Netzer, K. Bothe, I. Anhauser and A. Rethwilm (1993). "Human foamy virus proteins accumulate in neurons and induce multinucleated giant cells in the brain of transgenic mice." Am J Pathol **142**(4): 1061-71.
- Akinc, A., M. Thomas, A. M. Klibanov and R. Langer (2005). "Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis." J Gene Med **7**(5): 657-63.
- Ali, M., G. P. Taylor, R. J. Pitman, D. Parker, A. Rethwilm, R. Cheingsong-Popov, J. N. Weber, P. D. Bieniasz, J. Bradley and M. O. McClure (1996). "No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations." AIDS Res Hum Retroviruses **12**(15): 1473-83.
- Alke, A., A. Schwantes, K. Kido, M. Flotenmeyer, R. M. Flügel and M. Löchelt (2001). "The bet gene of feline foamy virus is required for virus replication." Virology **287**(2): 310-20.
- Allan, J. S., S. R. Broussard, M. G. Michaels, T. E. Starzl, K. L. Leighton, E. M. Whitehead, A. G. Comuzzie, R. E. Lanford, M. M. Leland, W. M. Switzer and W. Heneine (1998). "Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants." AIDS Res Hum Retroviruses **14**(10): 821-4.
- Allen, M. I., M. Deslauriers, C. W. Andrews, G. A. Tipples, K. A. Walters, D. L. Tyrrell, N. Brown and L. D. Condeelis (1998). "Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group." Hepatology **27**(6): 1670-7.
- Baldwin, D. N. and M. L. Linial (1998). "The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus." J Virol **72**(5): 3658-65.
- Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." Nature **226**(5252): 1209-11.

- Bannert, H., W. Muranyi, V. V. Ogryzko, Y. Nakatani and R. M. Flugel (2004). "Coactivators p300 and PCAF physically and functionally interact with the foamy viral trans-activator." BMC Mol Biol **5**: 16.
- Bansal, A., K. L. Shaw, B. H. Edwards, P. A. Goepfert and M. J. Mulligan (2000). "Characterization of the R572T point mutant of a putative cleavage site in human foamy virus Env." J Virol **74**(6): 2949-54.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.
- Bartholomew, M. M., R. W. Jansen, L. J. Jeffers, K. R. Reddy, L. C. Johnson, H. Bunzendahl, L. D. Condreay, A. G. Tzakis, E. R. Schiff and N. A. Brown (1997). "Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation." Lancet **349**(9044): 20-2.
- Baunach, G., B. Maurer, H. Hahn, M. Kranz and A. Rethwilm (1993). "Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames." J Virol **67**(9): 5411-8.
- Benzair, A. B., A. Rhodes-Feuillette, R. Emanoil-Ravicovitch and J. Peries (1982). "Reverse transcriptase from simian foamy virus serotype 1: purification and characterization." J Virol **44**(2): 720-4.
- Benzair, A. B., A. Rhodes-Feuillette, R. Emanoil-Ravicovitch and J. Peries (1983). "Characterization of RNase H activity associated with reverse transcriptase in simian foamy virus type 1." J Virol **47**(1): 249-52.
- Bieniasz, P. D., O. Erlwein, A. Aguzzi, A. Rethwilm and M. O. McClure (1997). "Gene transfer using replication-defective human foamy virus vectors." Virology **235**(1): 65-72.
- Bieniasz, P. D., A. Rethwilm, R. Pitman, M. D. Daniel, I. Chrystie and M. O. McClure (1995). "A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from a gorilla." Virology **207**(1): 217-28.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.

- Blewett, E. L., D. H. Black, N. W. Lerche, G. White and R. Eberle (2000). "Simian foamy virus infections in a baboon breeding colony." Virology **278**(1): 183-93.
- Blewett, E. L., J. Lewis, E. L. Gadsby, S. R. Neubauer and R. Eberle (2003). "Isolation of cytomegalovirus and foamy virus from the drill monkey (*Mandrillus leucophaeus*) and prevalence of antibodies to these viruses amongst wild-born and captive-bred individuals." Arch Virol **148**(3): 423-33.
- Bock, M., M. Heinkelein, D. Lindemann and A. Rethwilm (1998). "Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection." Virology **250**(1): 194-204.
- Bodem, J., H. G. Krausslich and A. Rethwilm (2007). "Acetylation of the foamy virus transactivator Tas by PCAF augments promoter-binding affinity and virus transcription." J Gen Virol **88**(Pt 1): 259-63.
- Boneva, R. S., A. J. Grindon, S. L. Orton, W. M. Switzer, V. Shanmugam, A. I. Hussain, V. B. Bhullar, M. E. Chamberland, W. Heneine, T. M. Folks and L. E. Chapman (2002). "Simian foamy virus infection in a blood donor." Transfusion **42**(7): 886-91.
- Bothe, K., A. Aguzzi, H. Lassmann, A. Rethwilm and I. Horak (1991). "Progressive encephalopathy and myopathy in transgenic mice expressing human foamy virus genes." Science **253**(5019): 555-7.
- Boucher, C. A., N. Cammack, P. Schipper, R. Schuurman, P. Rouse, M. A. Wainberg and J. M. Cameron (1993). "High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." Antimicrob Agents Chemother **37**(10): 2231-4.
- Boucher, C. A., E. O'Sullivan, J. W. Mulder, C. Ramautarsing, P. Kellam, G. Darby, J. M. Lange, J. Goudsmit and B. A. Larder (1992). "Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects." J Infect Dis **165**(1): 105-10.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-301.

- Boyer, P. L., S. G. Sarafianos, E. Arnold and S. H. Hughes (2001). "Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase." J Virol **75**(10): 4832-42.
- Boyer, P. L., S. G. Sarafianos, P. K. Clark, E. Arnold and S. H. Hughes (2006). "Why do HIV-1 and HIV-2 use different pathways to develop AZT resistance?" PLoS Pathog **2**(2): e10.
- Boyer, P. L., C. R. Stenbak, P. K. Clark, M. L. Linial and S. H. Hughes (2004). "Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase." J Virol **78**(12): 6112-21.
- Boyer, P. L., C. R. Stenbak, D. Hoberman, M. L. Linial and S. H. Hughes (2007). "In vitro fidelity of the prototype primate foamy virus (PFV) RT compared to HIV-1 RT." Virology.
- Brooks, J. I., H. W. Merks, J. Fournier, R. S. Boneva and P. A. Sandstrom (2007). "Characterization of blood-borne transmission of simian foamy virus." Transfusion **47**(1): 162-70.
- Brooks, J. I., E. W. Rud, R. G. Pilon, J. M. Smith, W. M. Switzer and P. A. Sandstrom (2002). "Cross-species retroviral transmission from macaques to human beings." Lancet **360**(9330): 387-8.
- Broussard, S. R., A. G. Comuzzie, K. L. Leighton, M. M. Leland, E. M. Whitehead and J. S. Allan (1997). "Characterization of new simian foamy viruses from African nonhuman primates." Virology **237**(2): 349-59.
- Brown, P., G. Nemo and D. C. Gajdusek (1978). "Human foamy virus: further characterization, seroepidemiology, and relationship to chimpanzee foamy viruses." J Infect Dis **137**(4): 421-7.
- Brown, P. A. (1997). "Integration." *In*: J. M. Coffin, S. H. Hughes et E. V. Varmus. "Retroviruses." Cold Spring Laboratory Press (New York).
- Brun-Vezinet, F., D. Descamps, A. Ruffault, B. Masquelier, V. Calvez, G. Peytavin, F. Telles, L. Morand-Joubert, J. L. Meynard, M. Vray and D. Costagliola (2003). "Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir." Aids **17**(12): 1795-802.
- Büchen-Osmond, C. (2006). "ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4." Columbia University, New York.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_index.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm)

- Calattini, S., E. Nerrienet, P. Mauciere, M. C. Georges-Courbot, A. Saib and A. Gessain (2006a). "Detection and molecular characterization of foamy viruses in Central African chimpanzees of the *Pan troglodytes troglodytes* and *Pan troglodytes vellerosus* subspecies." J Med Primatol **35**(2): 59-66.
- Calattini, S., F. Wanert, B. Thierry, C. Schmitt, S. Bassot, A. Saib, N. Herrenschmidt and A. Gessain (2006b). "Modes of transmission and genetic diversity of foamy viruses in a *Macaca tonkeana* colony." Retrovirology **3**: 23.
- Callahan, M. E., W. M. Switzer, A. L. Matthews, B. D. Roberts, W. Heneine, T. M. Folks and P. A. Sandstrom (1999). "Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact orf-2 accessory gene." J Virol **73**(11): 9619-24.
- Calvez, V., D. Costagliola, D. Descamps, A. Yvon, G. Collin, A. Cecile, C. Delaugerre, F. Damond, A. G. Marcelin, S. Matheron, A. Simon, M. A. Valantin, C. Katlama and F. Brun-Vezinet (2002). "Impact of stavudine phenotype and thymidine analogues mutations on viral response to stavudine plus lamivudine in ALTIS 2 ANRS trial." Antivir Ther **7**(3): 211-8.
- Cameron, D. W., M. Heath-Chiozzi, S. Danner, C. Cohen, S. Kravcik, C. Maurath, E. Sun, D. Henry, R. Rode, A. Potthoff and J. Leonard (1998). "Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group." Lancet **351**(9102): 543-9.
- Campbell, M., L. Renshaw-Gegg, R. Renne and P. A. Luciw (1994). "Characterization of the internal promoter of simian foamy viruses." J Virol **68**(8): 4811-20.
- Cartellieri, M., O. Herchenröder, W. Rudolph, M. Heinkelein, D. Lindemann, H. Zentgraf and A. Rethwilm (2005a). "N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export." J Virol **79**(19): 12464-76.
- Cartellieri, M., W. Rudolph, O. Herchenröder, D. Lindemann and A. Rethwilm (2005b). "Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles." Retrovirology **2**: 44.
- Chang, J., K. J. Lee, K. L. Jang, E. K. Lee, G. H. Baek and Y. C. Sung (1995). "Human foamy virus Bell transactivator contains a bipartite nuclear localization determinant which is sensitive to protein context and triple multimerization domains." J Virol **69**(2): 801-8.

- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux and et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science **233**(4761): 343-6.
- Cleland, A., H. G. Watson, P. Robertson, C. A. Ludlam and A. J. Brown (1996). "Evolution of zidovudine resistance-associated genotypes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **12**(1): 6-18.
- Coffin, J. M. (1995). "HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy." Science **267**(5197): 483-9.
- Cornelissen, M., R. van den Burg, F. Zorgdrager, V. Lukashov and J. Goudsmit (1997). "pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: evidence for naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D." J Virol **71**(9): 6348-58.
- Cullen, B. R. (1998). "HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell." Cell **93**(5): 685-92.
- Cullen, B. R. (2006). "Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors." J Virol **80**(3): 1067-76.
- Cummins, J. E., Jr., R. S. Boneva, W. M. Switzer, L. L. Christensen, P. Sandstrom, W. Heneine, L. E. Chapman and C. S. Dezzutti (2005). "Mucosal and systemic antibody responses in humans infected with simian foamy virus." J Virol **79**(20): 13186-9.
- de Jong, M. D., J. Veenstra, N. I. Stilianakis, R. Schuurman, J. M. Lange, R. J. de Boer and C. A. Boucher (1996). "Host-parasite dynamics and outgrowth of virus containing a single K70R amino acid change in reverse transcriptase are responsible for the loss of human immunodeficiency virus type 1 RNA load suppression by zidovudine." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5501-6.
- DeJesus, E., G. Herrera, E. Teofilo, J. Gerstoft, C. B. Buendia, J. D. Brand, C. H. Brothers, J. Hernandez, S. A. Castillo, T. Bonny, E. R. Lanier and T. R. Scott (2004). "Abacavir versus zidovudine combined with lamivudine and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naive HIV-infected adults." Clin Infect Dis **39**(7): 1038-46.

- Delebecque, F., R. Suspene, S. Calattini, N. Casartelli, A. Saib, A. Froment, S. Wain-Hobson, A. Gessain, J. P. Vartanian and O. Schwartz (2006). "Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases." J Virol **80**(2): 605-14.
- Delelis, O., J. Lehmann-Che and A. Saib (2004). "Foamy viruses--a world apart." Curr Opin Microbiol **7**(4): 400-6.
- Delelis, O., C. Petit, H. Leh, G. Mbemba, J. F. Mouscadet and P. Sonigo (2005). "A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles." Retrovirology **2**: 31.
- Delelis, O., A. Saib and P. Sonigo (2003). "Biphasic DNA synthesis in spumaviruses." J Virol **77**(14): 8141-6.
- "Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee." (1996). Lancet **348**(9023): 283-91.
- Deval, J., B. Selmi, J. Boretto, M. P. Egloff, C. Guerreiro, S. Sarfati and B. Canard (2002). "The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using alpha-boranophosphate nucleotide analogues." J Biol Chem **277**(44): 42097-104.
- Dianzani, F., G. Antonelli, O. Turriziani, G. Dong, M. R. Capobianchi and E. Riva (1992). "In vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine." Antiviral Res **18**(1): 39-52.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller and M. P. Calos (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol Cell Biol **7**(1): 379-87.
- Duda, A., D. Lüftenegger, T. Pietschmann and D. Lindemann (2006). "Characterization of the prototype foamy virus envelope glycoprotein receptor-binding domain." J Virol **80**(16): 8158-67.
- Duda, A., A. Stange, D. Lüftenegger, N. Stanke, D. Westphal, T. Pietschmann, S. W. Eastman, M. L. Linial, A. Rethwilm and D. Lindemann (2004). "Prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity." J Virol **78**(24): 13865-70.

- Eastman, S. W. and M. L. Linial (2001). "Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly." J Virol **75**(15): 6857-64.
- Enders, J. F. and T. C. Peebles (1954). "Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles." Proc Soc Exp Biol Med **86**(2): 277-86.
- Enssle, J., N. Fischer, A. Moebes, B. Mauer, U. Smola and A. Rethwilm (1997). "Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle." J Virol **71**(10): 7312-7.
- Enssle, J., I. Jordan, B. Mauer and A. Rethwilm (1996). "Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4137-41.
- Enssle, J., A. Moebes, M. Heinkelein, M. Panhuysen, B. Mauer, M. Schweizer, D. Neumann-Haefelin and A. Rethwilm (1999). "An active foamy virus integrase is required for virus replication." J Gen Virol **80** ( Pt 6): 1445-52.
- Erlwein, O., P. D. Bieniasz and M. O. McClure (1998). "Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors." J Virol **72**(7): 5510-6.
- Erlwein, O. and A. Rethwilm (1993). "BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus." Virology **196**(1): 256-68.
- Eron, J. J., S. L. Benoit, J. Jemsek, R. D. MacArthur, J. Santana, J. B. Quinn, D. R. Kuritzkes, M. A. Fallon and M. Rubin (1995). "Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party." N Engl J Med **333**(25): 1662-9.
- Falcone, V., M. Schweizer, A. Toniolo, D. Neumann-Haefelin and A. Meyerhans (1999). "Gamma interferon is a major suppressive factor produced by activated human peripheral blood lymphocytes that is able to inhibit foamy virus-induced cytopathic effects." J Virol **73**(2): 1724-8.
- Fischer, N., M. Heinkelein, D. Lindemann, J. Enssle, C. Baum, E. Werder, H. Zentgraf, J. G. Muller and A. Rethwilm (1998). "Foamy virus particle formation." J Virol **72**(2): 1610-5.

- Fischl, M. A., C. B. Parker, C. Pettinelli, M. Wulfsohn, M. S. Hirsch, A. C. Collier, D. Antoniskis, M. Ho, D. D. Richman, E. Fuchs and et al. (1990). "A randomized controlled trial of a reduced daily dose of zidovudine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. The AIDS Clinical Trials Group." N Engl J Med **323**(15): 1009-14.
- Fischl, M. A., D. D. Richman, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, R. T. Schooley and et al. (1987). "The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial." N Engl J Med **317**(4): 185-91.
- Flügel, R. M. and K. I. Pfrepper (2003). "Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 63-88.
- Flügel, R. M., A. Rethwilm, B. Maurer and G. Darai (1987). "Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes." Embo J **6**(7): 2077-84.
- Gallant, J. E., E. DeJesus, J. R. Arribas, A. L. Pozniak, B. Gazzard, R. E. Campo, B. Lu, D. McColl, S. Chuck, J. Enejosa, J. J. Toole and A. K. Cheng (2006). "Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV." N Engl J Med **354**(3): 251-60.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch and M. Popovic (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-7.
- Gao, Q., Z. X. Gu, M. A. Parniak, X. G. Li and M. A. Wainberg (1992). "In vitro selection of variants of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine." J Virol **66**(1): 12-9.
- Geyer, M., O. T. Fackler and B. M. Peterlin (2001). "Structure--function relationships in HIV-1 Nef." EMBO Rep **2**(7): 580-5.
- Giron, M. L., S. Colas, J. Wybier, F. Rozain and R. Emanoil-Ravier (1997). "Expression and maturation of human foamy virus Gag precursor polypeptides." J Virol **71**(2): 1635-9.

- Giron, M. L., H. de The and A. Saib (1998). "An evolutionarily conserved splice generates a secreted env-Bet fusion protein during human foamy virus infection." J Virol **72**(6): 4906-10.
- Goepfert, P. A., K. Shaw, G. Wang, A. Bansal, B. H. Edwards and M. J. Mulligan (1999). "An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes." J Virol **73**(9): 7210-7.
- Goepfert, P. A., K. L. Shaw, G. D. Ritter, Jr. and M. J. Mulligan (1997). "A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum." J Virol **71**(1): 778-84.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5." Virology **54**(2): 536-9.
- Gulick, R. M., A. Meibohm, D. Havlir, J. J. Eron, A. Mosley, J. A. Chodakewitz, R. Isaacs, C. Gonzalez, D. McMahon, D. D. Richman, M. Robertson and J. W. Mellors (2003). "Six-year follow-up of HIV-1-infected adults in a clinical trial of antiretroviral therapy with indinavir, zidovudine, and lamivudine." Aids **17**(16): 2345-9.
- Gulick, R. M., J. W. Mellors, D. Havlir, J. J. Eron, C. Gonzalez, D. McMahon, D. D. Richman, F. T. Valentine, L. Jonas, A. Meibohm, E. A. Emini and J. A. Chodakewitz (1997). "Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy." N Engl J Med **337**(11): 734-9.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock and P. M. Sharp (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." Science **287**(5453): 607-14.
- Hahn, H., G. Baunach, S. Brautigam, A. Mergia, D. Neumann-Haefelin, M. D. Daniel, M. O. McClure and A. Rethwilm (1994). "Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins." J Gen Virol **75** ( Pt 10): 2635-44.
- Hammer, S. M., K. E. Squires, M. D. Hughes, J. M. Grimes, L. M. Demeter, J. S. Currier, J. J. Eron, Jr., J. E. Feinberg, H. H. Balfour, Jr., L. R. Deyton, J. A. Chodakewitz and M. A. Fischl (1997). "A controlled trial of two nucleoside

- analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team." N Engl J Med **337**(11): 725-33.
- Hanna, G. J., V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, D. D. Richman, A. J. Brown, A. V. Savara, J. D. Hazelwood and R. T. D'Aquila (2000). "Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine." J Infect Dis **181**(3): 904-11.
- Harrigan, P. R., S. Bloor and B. A. Larder (1998). "Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro." J Virol **72**(5): 3773-8.
- Harrigan, P. R., I. Kinghorn, S. Bloor, S. D. Kemp, I. Najera, A. Kohli and B. A. Larder (1996). "Significance of amino acid variation at human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase residue 210 for zidovudine susceptibility." J Virol **70**(9): 5930-4.
- Harrigan, P. R., C. Stone, P. Griffin, I. Najera, S. Bloor, S. Kemp, M. Tisdale and B. Larder (2000). "Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after monotherapy and combination therapy. CNA2001 Investigative Group." J Infect Dis **181**(3): 912-20.
- He, F., W. S. Blair, J. Fukushima and B. R. Cullen (1996). "The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein." J Virol **70**(6): 3902-8.
- He, F., J. D. Sun, E. D. Garrett and B. R. Cullen (1993). "Functional organization of the Bel-1 trans activator of human foamy virus." J Virol **67**(4): 1896-904.
- Heberling, R. L. and S. S. Kalter (1975). "Isolation of foamy viruses from baboon (*Papio cynocephalus*) tissues." Am J Epidemiol **102**(1): 25-9.
- Heinkelein, M., M. Dressler, G. Jarmy, M. Rammling, H. Imrich, J. Thurow, D. Lindemann and A. Rethwilm (2002a). "Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs." J Virol **76**(8): 3774-83.
- Heinkelein, M., C. Leurs, M. Rammling, K. Peters, H. Hanenberg and A. Rethwilm (2002b). "Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids." J Virol **76**(19): 10069-73.

- Heinkelein, M., T. Pietschmann, G. Jarmy, M. Dressler, H. Imrich, J. Thurow, D. Lindemann, M. Bock, A. Moebes, J. Roy, O. Herchenroder and A. Rethwilm (2000). "Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome." Embo J **19**(13): 3436-45.
- Heinkelein, M., M. Rammling, T. Juretzek, D. Lindemann and A. Rethwilm (2003). "Retrotransposition and cell-to-cell transfer of foamy viruses." J Virol **77**(21): 11855-8.
- Heinkelein, M., M. Schmidt, N. Fischer, A. Moebes, D. Lindemann, J. Enssle and A. Rethwilm (1998). "Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors." J Virol **72**(8): 6307-14.
- Heneine, W., V. C. Musey, S. D. Sinha, A. Landay, G. Northrup, R. Khabbaz and J. E. Kaplan (1995). "Absence of evidence for human spumaretrovirus sequences in patients with Graves' disease." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **9**(1): 99-101.
- Heneine, W., M. Schweizer, P. Sandstrom and T. Folks (2003). "Human infection with foamy viruses." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 181-96.
- Heneine, W., W. M. Switzer, P. Sandstrom, J. Brown, S. Vedapuri, C. A. Schable, A. S. Khan, N. W. Lerche, M. Schweizer, D. Neumann-Haefelin, L. E. Chapman and T. M. Folks (1998). "Identification of a human population infected with simian foamy viruses." Nat Med **4**(4): 403-7.
- Herchenröder, O., R. Renne, D. Loncar, E. K. Cobb, K. K. Murthy, J. Schneider, A. Mergia and P. A. Luciw (1994). "Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV)." Virology **201**(2): 187-99.
- Hill, C. L., P. D. Bieniasz and M. O. McClure (1999). "Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy." J Gen Virol **80** ( Pt 8): 2003-9.
- Hirata, R. K., A. D. Miller, R. G. Andrews and D. W. Russell (1996). "Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors." Blood **88**(9): 3654-61.
- Holmes, K. V. (2003). "SARS-associated coronavirus." N Engl J Med **348**(20): 1948-51.

- Holzschu, D. L., M. A. Delaney, R. W. Renshaw and J. W. Casey (1998). "The nucleotide sequence and spliced pol mRNA levels of the nonprimate spumavirus bovine foamy virus." J Virol **72**(3): 2177-82.
- Hooks, J. J. and C. J. Gibbs, Jr. (1975). "The foamy viruses." Bacteriol Rev **39**(3): 169-85.
- Hooks, J. J., C. J. Gibbs, Jr., S. Chou, R. Howk, M. Lewis and D. C. Gajdusek (1973). "Isolation of a new simian foamy virus from a spider monkey brain culture." Infect Immun **8**(5): 804-13.
- Hooks, J. J., C. J. Gibbs, Jr., E. C. Cutchins, N. G. Rogers, P. Lampert and D. C. Gajdusek (1972). "Characterization and distribution of two new foamy viruses isolated from chimpanzees." Arch Gesamte Virusforsch **38**(1): 38-55.
- Hu, Z., F. Giguel, H. Hatano, P. Reid, J. Lu and D. R. Kuritzkes (2006). "Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1." J Virol **80**(14): 7020-7.
- Hunter, E. (1997). "Viral entry and receptors." *In*: J. M. Coffin, S. H. Hughes et E. V. Varmus. "Retroviruses." Cold Spring Laboratory Press (New York).
- Hussain, A. I., V. Shanmugam, V. B. Bhullar, B. E. Beer, D. Vallet, A. Gautier-Hion, N. D. Wolfe, W. B. Karesh, A. M. Kilbourn, Z. Tooze, W. Heneine and W. M. Switzer (2003). "Screening for simian foamy virus infection by using a combined antigen Western blot assay: evidence for a wide distribution among Old World primates and identification of four new divergent viruses." Virology **309**(2): 248-57.
- Idemyor, V. (2005). "Human immunodeficiency virus (HIV) entry inhibitors (CCR5 specific blockers) in development: are they the next novel therapies?" HIV Clin Trials **6**(5): 272-7.
- Jeeninga, R. E., W. Keulen, C. Boucher, R. W. Sanders and B. Berkhout (2001). "Evolution of AZT resistance in HIV-1: the 41-70 intermediate that is not observed in vivo has a replication defect." Virology **283**(2): 294-305.
- Johnston, P. B. (1971). "Taxonomic Features of Seven Serotypes of Simian and Ape Foamy Viruses." Infect Immun **3**(6): 793-799.
- Jordan, I., J. Enssle, E. Guttler, B. Mauer and A. Rethwilm (1996). "Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA." Virology **224**(1): 314-9.

- Josephson, N. C., G. Vassilopoulos, G. D. Trobridge, G. V. Priestley, B. L. Wood, T. Papayannopoulou and D. W. Russell (2002). "Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8295-300.
- Julias, J. G., T. Kim, G. Arnold and V. K. Pathak (1997). "The antiretrovirus drug 3'-azido-3'-deoxythymidine increases the retrovirus mutation rate." J Virol **71**(6): 4254-63.
- Juretzek, T., T. Holm, K. Gartner, S. Kanzler, D. Lindemann, O. Herchenröder, M. Picard-Maureau, M. Rammling, M. Heinkelein and A. Rethwilm (2004). "Foamy virus integration." J Virol **78**(5): 2472-7.
- Kang, Y., W. S. Blair and B. R. Cullen (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**(1): 504-11.
- Kang, Y. and B. R. Cullen (1998). "Derivation and functional characterization of a consensus DNA binding sequence for the tas transcriptional activator of simian foamy virus type 1." J Virol **72**(7): 5502-9.
- Kellam, P., C. A. Boucher and B. A. Larder (1992). "Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1934-8.
- Kellam, P., C. A. Boucher, J. M. Tijnagel and B. A. Larder (1994). "Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance." J Gen Virol **75** ( Pt 2): 341-51.
- Khan, A. S. and D. Kumar (2006). "Simian foamy virus infection by whole-blood transfer in rhesus macaques: potential for transfusion transmission in humans." Transfusion **46**(8): 1352-9.
- Kido, K., H. Bannert, R. M. Gronostajski and R. M. Flugel (2003). "Bell1-mediated transactivation of the spumaretroviral internal promoter is repressed by nuclear factor I." J Biol Chem **278**(14): 11836-42.
- Kido, K., A. Doerks, M. Lochelt and R. M. Flugel (2002). "Identification and functional characterization of an intragenic DNA binding site for the

- spumaretroviral trans-activator in the human p57Kip2 gene." J Biol Chem **277**(14): 12032-9.
- Kiem, H. P., J. Allen, G. Trobridge, E. Olson, K. Keyser, L. Peterson and D. W. Russell (2007). "Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells." Blood **109**(1): 65-70.
- Kirk, O., A. Mocroft, T. L. Katzenstein, A. Lazzarin, F. Antunes, P. Francioli, R. P. Brettler, J. M. Parkin, J. Gonzales-Lahoz and J. D. Lundgren (1998). "Changes in use of antiretroviral therapy in regions of Europe over time. EuroSIDA Study Group." Aids **12**(15): 2031-9.
- Kögel, D., M. Aboud and R. M. Flügel (1995a). "Molecular biological characterization of the human foamy virus reverse transcriptase and ribonuclease H domains." Virology **213**(1): 97-108.
- Kögel, D., M. Aboud and R. M. Flügel (1995b). "Mutational analysis of the reverse transcriptase and ribonuclease H domains of the human foamy virus." Nucleic Acids Res **23**(14): 2621-5.
- Konvalinka, J., M. Löchelt, H. Zentgraf, R. M. Flügel and H. G. Krausslich (1995). "Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein." J Virol **69**(11): 7264-8.
- Kupiec, J. J., A. Kay, M. Hayat, R. Ravier, J. Peries and F. Galibert (1991). "Sequence analysis of the simian foamy virus type 1 genome." Gene **101**(2): 185-94.
- Kupiec, J. J., J. Tobaly-Tapiero, M. Canivet, M. Santillana-Hayat, R. M. Flügel, J. Peries and R. Emanoil-Ravier (1988). "Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses." Nucleic Acids Res **16**(20): 9557-65.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Larder, B. A., K. E. Coates and S. D. Kemp (1991a). "Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture." J Virol **65**(10): 5232-6.
- Larder, B. A., P. Kellam and S. D. Kemp (1991b). "Zidovudine resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from HIV-infected lymphocytes." Aids **5**(2): 137-44.

- Larder, B. A. and S. D. Kemp (1989). "Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT)." Science **246**(4934): 1155-8.
- Larder, B. A., S. D. Kemp and D. J. Purifoy (1989). "Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants with altered inhibitor sensitivity." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 4803-7.
- Lecellier, C. H., P. Dunoyer, K. Arar, J. Lehmann-Che, S. Eyquem, C. Himber, A. Saib and O. Voinnet (2005). "A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells." Science **308**(5721): 557-60.
- Lecellier, C. H. and A. Saib (2000). "Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses." Virology **271**(1): 1-8.
- Lecellier, C. H., W. Vermeulen, F. Bachelerie, M. L. Giron and A. Saib (2002). "Intra- and intercellular trafficking of the foamy virus auxiliary bet protein." J Virol **76**(7): 3388-94.
- Lehmann-Che, J., M. L. Giron, O. Delelis, M. Lochelt, P. Bittoun, J. Tobaly-Tapiero, H. de The and A. Saib (2005). "Protease-dependent uncoating of a complex retrovirus." J Virol **79**(14): 9244-53.
- Lehmann-Che, J., N. Renault, M. L. Giron, P. Roingeard, E. Clave, J. Tobaly-Tapiero, P. Bittoun, A. Toubert, H. de The and A. Saib (2007). "Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells." PLoS Pathog **3**(5): e74.
- Li, F., R. Goila-Gaur, K. Salzwedel, N. R. Kilgore, M. Reddick, C. Matallana, A. Castillo, D. Zoumplis, D. E. Martin, J. M. Orenstein, G. P. Allaway, E. O. Freed and C. T. Wild (2003). "PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13555-60.
- Li, K. S., Y. Guan, J. Wang, G. J. Smith, K. M. Xu, L. Duan, A. P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. T. Estoepongstie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H. T. Long, N. T. Hanh, R. J. Webby, L. L. Poon, H. Chen, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, R. G. Webster and J. S. Peiris (2004). "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia." Nature **430**(6996): 209-13.
- Lindemann, D. and P. A. Goepfert (2003). "The foamy virus envelope glycoproteins." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 111-29.

- Lindemann, D., T. Pietschmann, M. Picard-Maureau, A. Berg, M. Heinkelein, J. Thurow, P. Knaus, H. Zentgraf and A. Rethwilm (2001). "A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity." J Virol **75**(13): 5762-71.
- Lindemann, D. and A. Rethwilm (1998). "Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing." J Virol **72**(5): 4088-94.
- Linial, M. (2000). "Why aren't foamy viruses pathogenic?" Trends Microbiol **8**(6): 284-9.
- Linial, M. L. (1999). "Foamy viruses are unconventional retroviruses." J Virol **73**(3): 1747-55.
- Linial, M. L. and S. W. Eastman (2003). "Particle assembly and genome packaging." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 89-110.
- Liu, W. T., T. Natori, K. S. Chang and A. M. Wu (1977). "Reverse transcriptase of foamy virus. Purification of the enzymes and immunological identification." Arch Virol **55**(3): 187-200.
- Löchelt, M. (2003). "Foamy virus transactivation and gene expression." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 27-61.
- Löchelt, M. and R. M. Flügel (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**(2): 1033-40.
- Löchelt, M., R. M. Flügel and M. Aboud (1994). "The human foamy virus internal promoter directs the expression of the functional Bel 1 transactivator and Bet protein early after infection." J Virol **68**(2): 638-45.
- Löchelt, M., W. Muranyi and R. M. Flügel (1993). "Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7317-21.
- Löchelt, M., F. Romen, P. Bastone, H. Muckenfuss, N. Kirchner, Y. B. Kim, U. Truyen, U. Rosler, M. Battenberg, A. Saib, E. Flory, K. Cichutek and C. Munk (2005). "The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7982-7.

- Löchelt, M., H. Zentgraf and R. M. Flügel (1991). "Construction of an infectious DNA clone of the full-length human spumaretrovirus genome and mutagenesis of the bel 1 gene." Virology **184**(1): 43-54.
- Lüftenecker, D., M. Picard-Maureau, N. Stanke, A. Rethwilm and D. Lindemann (2005). "Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation." J Virol **79**(12): 7664-72.
- Malmquist, W. A., M. J. Van der Maaten and A. D. Boothe (1969). "Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle." Cancer Res **29**(1): 188-200.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-62.
- Mannigel, I., A. Stange, H. Zentgraf and D. Lindemann (2007). "Correct capsid assembly mediated by a conserved YXXLGL motif in prototype foamy virus Gag is essential for infectivity and reverse transcription of the viral genome." J Virol **81**(7): 3317-26.
- Mansky, L. M. (1998). "Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation." J Gen Virol **79 ( Pt 6)**: 1337-45.
- Mansky, L. M. and L. C. Bernard (2000). "3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) and AZT-resistant reverse transcriptase can increase the in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **74**(20): 9532-9.
- Marcelin, A. G., C. Delaugerre, M. Wirden, P. Viegas, A. Simon, C. Katlama and V. Calvez (2004). "Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure." J Med Virol **72**(1): 162-5.
- Marczynska, B., C. J. Jones and L. G. Wolfe (1981). "Syncytium-forming virus of common marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*)." Infect Immun **31**(3): 1261-9.
- Matheron, S., D. Descamps, F. Boue, J. M. Livrozet, A. Lafeuillade, C. Aquilina, D. Troisvallets, A. Goetschel, F. Brun-Vezinet, J. P. Mamet and C. Thiaux (2003). "Triple nucleoside combination zidovudine/lamivudine/abacavir

- versus zidovudine/lamivudine/nelfinavir as first-line therapy in HIV-1-infected adults: a randomized trial." Antivir Ther **8**(2): 163-71.
- Maurer, B., H. Bannert, G. Darai and R. M. Flügel (1988). "Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus." J Virol **62**(5): 1590-7.
- McClure, M. O., P. D. Bieniasz, T. F. Schulz, I. L. Chrystie, G. Simpson, A. Aguzzi, J. G. Hoad, A. Cunningham, J. Kirkwood and R. A. Weiss (1994). "Isolation of a new foamy retrovirus from orangutans." J Virol **68**(11): 7124-30.
- McCune, J. M. (2001). "The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease." Nature **410**(6831): 974-9.
- Meiering, C. D. and M. L. Linial (2001). "Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection." Clin Microbiol Rev **14**(1): 165-76.
- Meiering, C. D. and M. L. Linial (2002). "Reactivation of a complex retrovirus is controlled by a molecular switch and is inhibited by a viral protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 15130-5.
- Meiering, C. D., C. Rubio, C. May and M. L. Linial (2001). "Cell-type-specific regulation of the two foamy virus promoters." J Virol **75**(14): 6547-57.
- Mergia, A. and M. Heinkelein (2003). "Foamy virus vectors." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 131-59.
- Mergia, A., N. J. Leung and J. Blackwell (1996). "Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1)." J Med Primatol **25**(1): 2-7.
- Mergia, A. and P. A. Luciw (1991). "Replication and regulation of primate foamy viruses." Virology **184**(2): 475-82.
- Mergia, A., K. E. Shaw, J. E. Lackner and P. A. Luciw (1990). "Relationship of the env genes and the endonuclease domain of the pol genes of simian foamy virus type 1 and human foamy virus." J Virol **64**(1): 406-10.
- Mergia, A. and M. Wu (1998). "Characterization of provirus clones of simian foamy virus type 1." J Virol **72**(1): 817-22.
- Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. M. Mian, A. G. So and W. A. Scott (1999). "A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase." Mol Cell **4**(1): 35-43.

- Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. G. So and W. A. Scott (1998). "Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13471-6.
- Meyerhans, A., R. Cheynier, J. Albert, M. Seth, S. Kwok, J. Sninsky, L. Morfeldt-Manson, B. Asjo and S. Wain-Hobson (1989). "Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations." Cell **58**(5): 901-10.
- Mikovits, J. A., P. M. Hoffman, A. Rethwilm and F. W. Ruscetti (1996). "In vitro infection of primary and retrovirus-infected human leukocytes by human foamy virus." J Virol **70**(5): 2774-80.
- Mitsuya, H., K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry and S. Broder (1985). "3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(20): 7096-100.
- Modrow, S., D. Falke and U. Truyen (2003). Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg; Berlin,
- Moebes, A., J. Enssle, P. D. Bieniasz, M. Heinkelein, D. Lindemann, M. Bock, M. O. McClure and A. Rethwilm (1997). "Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle." J Virol **71**(10): 7305-11.
- Morozov, V. A., T. D. Copeland, K. Nagashima, M. A. Gonda and S. Oroszlan (1997). "Protein composition and morphology of human foamy virus intracellular cores and extracellular particles." Virology **228**(2): 307-17.
- Muranyi, W. and R. M. Flügel (1991). "Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures." J Virol **65**(2): 727-35.
- Murray, S. M. and M. L. Linial (2006). "Foamy virus infection in primates." J Med Primatol **35**(4-5): 225-35.
- Naeger, L. K., N. A. Margot and M. D. Miller (2001). "Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication." Antivir Ther **6**(2): 115-26.

- Naeger, L. K., N. A. Margot and M. D. Miller (2002). "ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." Antimicrob Agents Chemother **46**(7): 2179-84.
- Nair, V. and G. Chi (2007). "HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS." Rev Med Virol **17**(4): 277-95.
- Najera, I., A. Holguin, M. E. Quinones-Mateu, M. A. Munoz-Fernandez, R. Najera, C. Lopez-Galindez and E. Domingo (1995). "Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy." J Virol **69**(1): 23-31.
- Nemo, G. J., P. W. Brown, C. J. Gibbs, Jr. and D. C. Gajdusek (1978). "Antigenic relationship of human foamy virus to the simian foamy viruses." Infect Immun **20**(1): 69-72.
- Netzer, K. O., A. Rethwilm, B. Maurer and V. ter Meulen (1990). "Identification of the major immunogenic structural proteins of human foamy virus." J Gen Virol **71** ( Pt 5): 1237-41.
- Netzer, K. O., A. Schliephake, B. Maurer, R. Watanabe, A. Aguzzi and A. Rethwilm (1993). "Identification of pol-related gene products of human foamy virus." Virology **192**(1): 336-8.
- Nijhuis, M., S. Deeks and C. Boucher (2001). "Implications of antiretroviral resistance on viral fitness." Curr Opin Infect Dis **14**(1): 23-8.
- North, T. W. and R. A. LaCasse (1995). "Testing anti-HIV drugs in the FIV model." Nat Med **1**(5): 410-1.
- Nowrouzi, A., M. Dittrich, C. Klanke, M. Heinkelein, M. Rammling, T. Dandekar, C. von Kalle and A. Rethwilm (2006). "Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line." J Gen Virol **87**(Pt 5): 1339-47.
- Pahl, A. and R. M. Flügel (1993). "Endonucleolytic cleavages and DNA-joining activities of the integration protein of human foamy virus." J Virol **67**(9): 5426-34.
- Pahl, A. and R. M. Flügel (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**(7): 2957-66.
- Parks, W. P. and G. J. Todaro (1972). "Biological properties of syncytium-forming ("foamy") viruses." Virology **47**(3): 673-83.

- Parks, W. P., G. J. Todaro, E. M. Scolnick and S. A. Aaronson (1971). "RNA dependent DNA polymerase in primate syncytium-forming (foamy) viruses." Nature **229**(5282): 258-60.
- Patton, G. S., S. A. Morris, W. Chung, P. D. Bieniasz and M. O. McClure (2005). "Identification of domains in gag important for prototypic foamy virus egress." J Virol **79**(10): 6392-9.
- Peters, K., T. Wiktorowicz, M. Heinkelein and A. Rethwilm (2005). "RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles." J Virol **79**(11): 7005-13.
- Petit, C., M. L. Giron, J. Tobaly-Tapiero, P. Bittoun, E. Real, Y. Jacob, N. Tordo, H. De The and A. Saib (2003). "Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3433-42.
- Pfrepfer, K. I., M. Löchelt, H. R. Rackwitz, M. Schnolzer, H. Heid and R. M. Flügel (1999). "Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus." J Virol **73**(9): 7907-11.
- Pfrepfer, K. I., H. R. Rackwitz, M. Schnolzer, H. Heid, M. Löchelt and R. M. Flügel (1998). "Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease." J Virol **72**(9): 7648-52.
- Pfrepfer, K. I., J. Reed, H. R. Rackwitz, M. Schnolzer and R. M. Flügel (2001). "Characterization of peptide substrates and viral enzyme that affect the cleavage site specificity of the human spumaretrovirus proteinase." Virus Genes **22**(1): 61-72.
- Picard-Maureau, M., G. Jarmy, A. Berg, A. Rethwilm and D. Lindemann (2003). "Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process." J Virol **77**(8): 4722-30.
- Pietschmann, T., M. Heinkelein, M. Heldmann, H. Zentgraf, A. Rethwilm and D. Lindemann (1999). "Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export." J Virol **73**(4): 2613-21.
- Pietschmann, T., H. Zentgraf, A. Rethwilm and D. Lindemann (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**(10): 4474-82.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna and R. C. Gallo (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7415-9.
- Pope, B. and H. M. Kent (1996). "High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli." Nucleic Acids Res **24**(3): 536-7.
- Pozniak, A. L., J. E. Gallant, E. DeJesus, J. R. Arribas, B. Gazzard, R. E. Campo, S. S. Chen, D. McColl, J. Enejosa, J. J. Toole and A. K. Cheng (2006). "Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz versus fixed-dose zidovudine/lamivudine and efavirenz in antiretroviral-naive patients: virologic, immunologic, and morphologic changes--a 96-week analysis." J Acquir Immune Defic Syndr **43**(5): 535-40.
- Rabson, A. B. and B. J. Graves (1997). "Synthesis and processing of viral RNA." *In*: J. M. Coffin, S. H. Hughes et E. V. Varmus. "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
- Reid, P., H. MacInnes, M. E. Cong, W. Heneine and J. G. Garcia-Lerma (2005). "Natural resistance of human immunodeficiency virus type 2 to zidovudine." Virology **336**(2): 251-64.
- Remington, K. M., B. Chesebro, K. Wehrly, N. C. Pedersen and T. W. North (1991). "Mutants of feline immunodeficiency virus resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine." J Virol **65**(1): 308-12.
- Renne, R., E. Friedl, M. Schweizer, U. Fleps, R. Turek and D. Neumann-Haefelin (1992). "Genomic organization and expression of simian foamy virus type 3 (SFV-3)." Virology **186**(2): 597-608.
- Rethwilm, A. (2003). "The replication strategy of foamy viruses." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 1-26.
- Rethwilm, A., O. Erlwein, G. Baunach, B. Maurer and V. ter Meulen (1991). "The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(3): 941-5.

- Rhodes-Feuillette, A., F. Saal, J. Lasneret, P. Dubouch and J. Peries (1979). "Isolation and characterization of a new simian foamy virus serotype from lymphocytes of a *Papio cynocephalus* baboon." J Med Primatol **8**(5): 308-20.
- Riggs, J. L., Oshirls, D. O. Taylor and E. H. Lennette (1969). "Syncytium-forming agent isolated from domestic cats." Nature **222**(5199): 1190-1.
- Rinke, C. S., P. L. Boyer, M. D. Sullivan, S. H. Hughes and M. L. Linial (2002). "Mutation of the catalytic domain of the foamy virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity." J Virol **76**(15): 7560-70.
- Robbins, G. K., V. De Gruttola, R. W. Shafer, L. M. Smeaton, S. W. Snyder, C. Pettinelli, M. P. Dube, M. A. Fischl, R. B. Pollard, R. Delapenha, L. Gedeon, C. van der Horst, R. L. Murphy, M. I. Becker, R. T. D'Aquila, S. Vella, T. C. Merigan and M. S. Hirsch (2003). "Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection." N Engl J Med **349**(24): 2293-303.
- Robert-Koch-Institut (2007). "HIV-Infektionen/AIDS: Halbjahresbericht II/2006." Epidemiologisches Bulletin Sonderausgabe A/2007.
- Rogers, N. G., M. Basnight, C. J. Gibbs and D. C. Gajdusek (1967). "Latent viruses in chimpanzees with experimental kuru." Nature **216**(5114): 446-9.
- Rosenblum, L. L., G. Patton, A. R. Grigg, A. J. Frater, D. Cain, O. Erlwein, C. L. Hill, J. R. Clarke and M. O. McClure (2001). "Differential susceptibility of retroviruses to nucleoside analogues." Antivir Chem Chemother **12**(2): 91-7.
- Roy, J. and M. L. Linial (2007). "Role of the foamy virus Pol cleavage site in viral replication." J Virol **81**(10): 4956-62.
- Roy, J., W. Rudolph, T. Juretzek, K. Gartner, M. Bock, O. Herchenröder, D. Lindemann, M. Heinkelein and A. Rethwilm (2003). "Feline foamy virus genome and replication strategy." J Virol **77**(21): 11324-31.
- Russell, D. W. and A. D. Miller (1996). "Foamy virus vectors." J Virol **70**(1): 217-22.
- Russell, R. A., H. L. Wiegand, M. D. Moore, A. Schafer, M. O. McClure and B. R. Cullen (2005). "Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors." J Virol **79**(14): 8724-31.
- Rustigian, R., P. Johnston and H. Reihart (1955). "Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents." Proc Soc Exp Biol Med **88**(1): 8-16.

- Saag, M. S., P. Tebas, M. Sension, M. Conant, R. Myers, S. K. Chapman, R. Anderson and N. Clendeninn (2001). "Randomized, double-blind comparison of two nelfinavir doses plus nucleosides in HIV-infected patients (Agouron study 511)." Aids **15**(15): 1971-8.
- Saib, A., M. H. Koken, P. van der Spek, J. Peries and H. de The (1995). "Involvement of a spliced and defective human foamy virus in the establishment of chronic infection." J Virol **69**(9): 5261-8.
- Saib, A., J. Peries and H. de The (1993). "A defective human foamy provirus generated by pregenome splicing." Embo J **12**(11): 4439-44.
- Saib, A., F. Puvion-Dutilleul, M. Schmid, J. Peries and H. de The (1997). "Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step." J Virol **71**(2): 1155-61.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Sandstrom, P. A., K. O. Phan, W. M. Switzer, T. Fredeking, L. Chapman, W. Heneine and T. M. Folks (2000). "Simian foamy virus infection among zoo keepers." Lancet **355**(9203): 551-2.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Santillana-Hayat, M., J. Valla, M. Canivet, J. Peries and J. M. Molina (1996). "Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human foamy virus by dideoxynucleosides." AIDS Res Hum Retroviruses **12**(15): 1485-90.
- Sarafianos, S. G., A. D. Clark, Jr., K. Das, S. Tuske, J. J. Birktoft, P. Ilankumaran, A. R. Ramesha, J. M. Sayer, D. M. Jerina, P. L. Boyer, S. H. Hughes and E. Arnold (2002). "Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA." Embo J **21**(23): 6614-24.
- Sarafianos, S. G., K. Das, A. D. Clark, Jr., J. Ding, P. L. Boyer, S. H. Hughes and E. Arnold (1999). "Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase

- involves steric hindrance with beta-branched amino acids." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10027-32.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-79.
- Schiffer, C., C. H. Lecellier, A. Mannioui, N. Felix, E. Nelson, J. Lehmann-Che, M. L. Giron, J. C. Gluckman, A. Saib and B. Canque (2004). "Persistent infection with primate foamy virus type 1 increases human immunodeficiency virus type 1 cell binding via a Bet-independent mechanism." J Virol **78**(20): 11405-10.
- Schinazi, R. F., R. M. Lloyd, Jr., M. H. Nguyen, D. L. Cannon, A. McMillan, N. Ilksoy, C. K. Chu, D. C. Liotta, H. Z. Bazmi and J. W. Mellors (1993). "Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolane-cytosine nucleosides." Antimicrob Agents Chemother **37**(4): 875-81.
- Schliephake, A. W. and A. Rethwilm (1994). "Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein." J Virol **68**(8): 4946-54.
- Schmidt, M. and A. Rethwilm (1995). "Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes." Virology **210**(1): 167-78.
- Schweizer, M., V. Falcone, J. Gange, R. Turek and D. Neumann-Haefelin (1997). "Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual." J Virol **71**(6): 4821-4.
- Schweizer, M. and D. Neumann-Haefelin (1995). "Phylogenetic analysis of primate foamy viruses by comparison of pol sequences." Virology **207**(2): 577-82.
- Schweizer, M., H. Schleier, M. Pietrek, J. Liegibel, V. Falcone and D. Neumann-Haefelin (1999). "Genetic stability of foamy viruses: long-term study in an African green monkey population." J Virol **73**(11): 9256-65.
- Schweizer, M., R. Turek, H. Hahn, A. Schliephake, K. O. Netzer, G. Eder, M. Reinhardt, A. Rethwilm and D. Neumann-Haefelin (1995). "Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans." AIDS Res Hum Retroviruses **11**(1): 161-70.

- Scolnick, E., E. Rands, S. A. Aaronson and G. J. Todaro (1970). "RNA-dependent DNA polymerase activity in five RNA viruses: divalent cation requirements." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(4): 1789-96.
- Shafer, R. W., L. M. Smeaton, G. K. Robbins, V. De Gruttola, S. W. Snyder, R. T. D'Aquila, V. A. Johnson, G. D. Morse, M. A. Nokta, A. I. Martinez, B. M. Gripshover, P. Kaul, R. Haubrich, M. Swingle, S. D. McCarty, S. Vella, M. S. Hirsch and T. C. Merigan (2003). "Comparison of four-drug regimens and pairs of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection." N Engl J Med **349**(24): 2304-15.
- Shirasaka, T., M. F. Kavlick, T. Ueno, W. Y. Gao, E. Kojima, M. L. Alcaide, S. Choekijchai, B. M. Roy, E. Arnold, R. Yarchoan and et al. (1995). "Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2398-402.
- Smith, M. S., E. L. Brian and J. S. Pagano (1987). "Resumption of virus production after human immunodeficiency virus infection of T lymphocytes in the presence of azidothymidine." J Virol **61**(12): 3769-73.
- Smith, R. A., K. M. Remington, B. D. Preston, R. F. Schinazi and T. W. North (1998). "A novel point mutation at position 156 of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus confers resistance to the combination of (-)-beta-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine." J Virol **72**(3): 2335-40.
- Spence, R. A., W. M. Kati, K. S. Anderson and K. A. Johnson (1995). "Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors." Science **267**(5200): 988-93.
- Stange, A., I. Mannigel, K. Peters, M. Heinkelein, N. Stanke, M. Cartellieri, H. Gottlinger, A. Rethwilm, H. Zentgraf and D. Lindemann (2005). "Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity." J Virol **79**(9): 5466-76.
- Staszewski, S., P. Keiser, J. Montaner, F. Raffi, J. Gathe, V. Brotas, C. Hicks, S. M. Hammer, D. Cooper, M. Johnson, S. Tortell, A. Cutrell, D. Thorborn, R. Isaacs, S. Hetherington, H. Steel and W. Spreen (2001). "Abacavir-lamivudine-zidovudine vs indinavir-lamivudine-zidovudine in antiretroviral-

- naive HIV-infected adults: A randomized equivalence trial." Jama **285**(9): 1155-63.
- Staszewski, S., J. Morales-Ramirez, K. T. Tashima, A. Rachlis, D. Skest, J. Stanford, R. Stryker, P. Johnson, D. F. Labriola, D. Farina, D. J. Manion and N. M. Ruiz (1999). "Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team." N Engl J Med **341**(25): 1865-73.
- Stenbak, C. R. and M. L. Linial (2004). "Role of the C terminus of foamy virus Gag in RNA packaging and Pol expression." J Virol **78**(17): 9423-30.
- Stiles, G. E., J. L. Bittle and V. J. Cabasso (1964). "Comparison of Simian Foamy Virus Strains Including a New Serological Type." Nature **201**: 1350-1.
- Svicher, V., T. Sing, M. M. Santoro, F. Forbici, F. Rodriguez-Barrios, A. Bertoli, N. Beerenwinkel, M. C. Bellocchi, F. Gago, A. d'Arminio Monforte, A. Antinori, T. Lengauer, F. Ceccherini-Silberstein and C. F. Perno (2006). "Involvement of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations in the regulation of resistance to nucleoside inhibitors." J Virol **80**(14): 7186-98.
- Swanstrom, R. and J. W. Wills (1997). "Synthesis, assembly and processing of viral proteins." *In*: J. M. Coffin, S. H. Hughes et E. V. Varmus. "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
- Switzer, W. M., V. Bhullar, V. Shanmugam, M. E. Cong, B. Parekh, N. W. Lerche, J. L. Yee, J. J. Ely, R. Boneva, L. E. Chapman, T. M. Folks and W. Heneine (2004). "Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates." J Virol **78**(6): 2780-9.
- Switzer, W. M., M. Salemi, V. Shanmugam, F. Gao, M. E. Cong, C. Kuiken, V. Bhullar, B. E. Beer, D. Vallet, A. Gautier-Hion, Z. Tooze, F. Villinger, E. C. Holmes and W. Heneine (2005). "Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates." Nature **434**(7031): 376-80.
- Telesnitsky, A. and S. P. Goff (1997). "Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA." *In*: J. M. Coffin, S. H. Hughes et E. V. Varmus. "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
- Temin, H. M. and S. Mizutani (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." Nature **226**(5252): 1211-3.

- Thümer, L., A. Rethwilm, E. C. Holmes and J. Bodem (2007). "The complete nucleotide sequence of a New World simian foamy virus." Virology.
- Tisdale, M., S. D. Kemp, N. R. Parry and B. A. Larder (1993). "Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5653-6.
- Tobaly-Tapiero, J., P. Bittoun, M. L. Giron, M. Neves, M. Koken, A. Saib and H. de The (2001). "Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N terminus of Gag." J Virol **75**(9): 4367-75.
- Tobaly-Tapiero, J., P. Bittoun, M. Neves, M. C. Guillemin, C. H. Lecellier, F. Puvion-Dutilleul, B. Gicquel, S. Zientara, M. L. Giron, H. de The and A. Saib (2000). "Isolation and characterization of an equine foamy virus." J Virol **74**(9): 4064-73.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Trobridge, G., N. Josephson, G. Vassilopoulos, J. Mac and D. W. Russell (2002). "Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences." Mol Ther **6**(3): 321-8.
- Trobridge, G. and D. W. Russell (2004). "Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors." J Virol **78**(5): 2327-35.
- Trobridge, G. D., D. G. Miller, M. A. Jacobs, J. M. Allen, H. P. Kiem, R. Kaul and D. W. Russell (2006). "Foamy virus vector integration sites in normal human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1498-503.
- UNAIDS/WHO (2006). "AIDS Epidemic Update: December 2006." Report UNAIDS, Genf
- van Leeuwen, R., C. Katlama, R. L. Murphy, K. Squires, J. Gatell, A. Horban, B. Clotet, S. Staszewski, A. van Eeden, N. Clumeck, M. Moroni, A. T. Pavia, R. E. Schmidt, J. Gonzalez-Lahoz, J. Montaner, F. Antunes, R. Gulick, D. Banhegyi, M. van der Valk, P. Reiss, L. van Weert, F. van Leth, V. A. Johnson, J. P. Sommadossi and J. M. Lange (2003). "A randomized trial to

- study first-line combination therapy with or without a protease inhibitor in HIV-1-infected patients." Aids **17**(7): 987-99.
- Vassilopoulos, G., G. Trobridge, N. C. Josephson and D. W. Russell (2001). "Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors." Blood **98**(3): 604-9.
- Venkatesh, L. K. and G. Chinnadurai (1993). "The carboxy-terminal transcription enhancement region of the human spumaretrovirus transactivator contains discrete determinants of the activator function." J Virol **67**(7): 3868-76.
- Verschoor, E. J., S. Langenhuijzen, S. van den Engel, H. Niphuis, K. S. Warren and J. L. Heeney (2003). "Structural and evolutionary analysis of an orangutan foamy virus." J Virol **77**(15): 8584-7.
- Vogt, V. M. (1997a). "Historical introduction to the general properties of retroviruses." *In*: J. M. Coffin, S. H. Hughes et E. V. Varmus. "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
- Vogt, V. M. (1997b). "Retroviral virions and genomes." *In*: J. M. Coffin, S. H. Hughes et E. V. Varmus. "Retroviruses." Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York), 27-70.
- Volberding, P. A., S. W. Lagakos, M. A. Koch, C. Pettinelli, M. W. Myers, D. K. Booth, H. H. Balfour, Jr., R. C. Reichman, J. A. Bartlett, M. S. Hirsch and et al. (1990). "Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases." N Engl J Med **322**(14): 941-9.
- Wagner, A., A. Doerks, M. Aboud, A. Alonso, T. Tokino, R. M. Flügel and M. Löchelt (2000). "Induction of cellular genes is mediated by the Bell transactivator in foamy virus-infected human cells." J Virol **74**(10): 4441-7.
- Whitcomb, J. M., N. T. Parkin, C. Chappay, N. S. Hellmann and C. J. Petropoulos (2003). "Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates." J Infect Dis **188**(7): 992-1000.
- White, K. L., N. A. Margot, J. K. Ly, J. M. Chen, A. S. Ray, M. Pavelko, R. Wang, M. McDermott, S. Swaminathan and M. D. Miller (2005). "A combination of

- decreased NRTI incorporation and decreased excision determines the resistance profile of HIV-1 K65R RT." Aids **19**(16): 1751-60.
- Wilk, T., F. de Haas, A. Wagner, T. Rutten, S. Fuller, R. M. Flügel and M. Löchelt (2000). "The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer." J Virol **74**(6): 2885-7.
- Wilk, T., V. Geiselhart, M. Frech, S. D. Fuller, R. M. Flügel and M. Löchelt (2001). "Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain." J Virol **75**(17): 7995-8007.
- Winkler, I., J. Bodem, L. Haas, M. Zemba, H. Delius, R. Flower, R. M. Flügel and M. Löchelt (1997). "Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins shows distinct features different from those of primate spumaviruses." J Virol **71**(9): 6727-41.
- Wolfe, N. D., W. M. Switzer, J. K. Carr, V. B. Bhullar, V. Shanmugam, U. Tamoufe, A. T. Prosser, J. N. Torimiro, A. Wright, E. Mpoudi-Ngole, F. E. McCutchan, D. L. Birx, T. M. Folks, D. S. Burke and W. Heneine (2004). "Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters." Lancet **363**(9413): 932-7.
- Wu, M., S. Chari, T. Yanchis and A. Mergia (1998). "cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors." J Virol **72**(4): 3451-4.
- Wu, M. and A. Mergia (1999). "Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors." J Virol **73**(5): 4498-501.
- Yahi, N., C. Tamalet, C. Tourres, N. Tivoli, F. Ariasi, F. Volot, J. A. Gastaut, H. Gallais, J. Moreau and J. Fantini (1999). "Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences." J Clin Microbiol **37**(12): 4099-106.
- Yahi, N., C. Tamalet, C. Tourres, N. Tivoli and J. Fantini (2000). "Mutation L210W of HIV-1 reverse transcriptase in patients receiving combination therapy. Incidence, association with other mutations, and effects on the structure of mutated reverse transcriptase." J Biomed Sci **7**(6): 507-13.
- Yu, S. F., D. N. Baldwin, S. R. Gwynn, S. Yendapalli and M. L. Linial (1996a). "Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses." Science **271**(5255): 1579-82.

- Yu, S. F., K. Edelmann, R. K. Strong, A. Moebes, A. Rethwilm and M. L. Linial (1996b). "The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains." J Virol **70**(12): 8255-62.
- Yu, S. F. and M. L. Linial (1993). "Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay." J Virol **67**(11): 6618-24.
- Yu, S. F., J. Stone and M. L. Linial (1996c). "Productive persistent infection of hematopoietic cells by human foamy virus." J Virol **70**(2): 1250-4.
- Yu, S. F., M. D. Sullivan and M. L. Linial (1999). "Evidence that the human foamy virus genome is DNA." J Virol **73**(2): 1565-72.
- Yvon-Groussin, A., P. Mugnier, P. Bertin, M. Grandadam, H. Agut, J. M. Huraux and V. Calvez (2001). "Efficacy of dideoxynucleosides against human foamy virus and relationship to its reverse transcriptase amino acid sequence and structure." J Virol **75**(15): 7184-7.
- Zemba, M., T. Wilk, T. Rutten, A. Wagner, R. M. Flügel and M. Löchelt (1998). "The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity." Virology **247**(1): 7-13.
- Zou, J. X. and P. A. Luciw (1996). "The transcriptional transactivator of simian foamy virus 1 binds to a DNA target element in the viral internal promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 326-30.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\alpha$	anti
$\psi$	Verpackungssignal (Psi)
3TC	2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidin (Lamivudin)
A	Adenin
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
APOBEC	Apolipoprotein B editing complex
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintrisulfat
AZT	3'-Azido-3'-Deoxythymidin (Azidothymidin, Zidovudin)
AZTTP	Azidothymidintriphosphat
Bet	akzessorisches Protein der Foamyviren (Bel-Tas)
BFV	Bovines Foamyvirus
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CA	Kapsidprotein
CAS	cis-aktive Sequenz
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CPE	zytopathischer Effekt
dest.	destilliert
DDI	Didanosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFV	Equines Immundefizienzvirus
Env	Hüllprotein (engl. <i>envelope</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
FFV	Felines Foamyvirus
FIV	Felines Immundefizienzvirus

FV	Foamyvirus
G	Guanin
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IN	Integrase
IP	interner Promotor
iPPT	interner Polypurintrakt
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Matrixprotein
min	Minuten
MLV	murines Leukämievirus
mRNA	messenger RNA
MTOC	Mikrotubuli organisierendes Zentrum
NC	Nukleokapsidprotein
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NNRTI	nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Primerbindungsstelle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFV	Prototypisches Foamyvirus (ehemals HFV, Humanes Foamyvirus)
PI	Proteaseinhibitor
PIC	Präintegrationskomplex
Pol	Polymerase
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PPT	Polypurintrakt

PR	Protease
RH	RNaseH
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SAP	alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SFV	Simianes Foamyvirus
SFV <sub>mac</sub>	Simianes Foamyvirus aus Makaken
SFV <sub>mac</sub> <sub>AZTres</sub>	AZT-resistentes Foamyvirus aus Makaken
SFV <sub>cpz</sub>	Simianes Foamyvirus aus Schimpansen
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SU	Oberflächeneinheit des Hüllproteins (engl. <i>surface unit</i> )
T	Thymidin
TAM	Thymidin-Analoga-Mutation
Tas	Transaktivator der Spumaviren
TM	Transmembraneinheit des Hüllproteins
TRE	Tas-responsives Element
tRNA	transfer RNA
U	unit (Enzymeinheit)
UTR	untranslatierte Region
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
ZDV	Zidovudin = Azidothymidin (AZT)

Darüberhinaus wurden die üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet sowie der Einbuchstabencode der Aminosäuren.

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Klassifizierung der Retroviren nach ICTV.....</i>	2
<i>Tabelle 2: Foamyviren und ihre Wirte.....</i>	12
<i>Tabelle 3: Auswahl an simianen Foamyviren.....</i>	13
<i>Tabelle 4: Antiretrovirale Medikamente (Auswahl; erweitert und verändert nach <a href="http://hiv.net/2010/haart/klassen.htm">http://hiv.net/2010/haart/klassen.htm</a>) .....</i>	29
<i>Tabelle 5: verwendete Oligonukleotide.....</i>	43
<i>Tabelle 6: gag- und pol-Mutationen in SFVmac<sub>AZTres</sub>.....</i>	76
<i>Tabelle 7: Aminosäuresubstitutionen in SFVmac<sub>AZTres</sub> .....</i>	77
<i>Tabelle 8: Übereinstimmung von Foamyviren mit SFVmac und SFVmac<sub>AZTres</sub> an den Positionen der AZT-Resistenz-Mutationen.....</i>	81
<i>Tabelle 9: Klonierung von pBK3 .....</i>	84
<i>Tabelle 10: Klonierung von pBK4 und pBK5.....</i>	85
<i>Tabelle 11: Klonierung der SFVmac-Klone pBK30, pBK31, pBK37, pBK38, pBK64, pBK65, pBK76, pBK77, pBK78, pBK79, pBK80 und pBK81.....</i>	88
<i>Tabelle 12: Vergleich des biologisch selektierten SFVmac<sub>AZTres</sub> mit klonierten Derivaten .....</i>	89
<i>Tabelle 13: Übersicht der von pSFV-1 abgeleiteten infektiösen Klone mit AZT- Resistenz-Mutationen .....</i>	98
<i>Tabelle 14: AZT-Resistenz der mutierten SFVmac-Konstrukte .....</i>	103
<i>Tabelle 15: Klonierung der infektiösen PFV-Klone pBK34, pBK35, pBK39, pBK54, pBK56, pBK82, pBK83, pBK84, pBK85 und pBK86 .....</i>	111
<i>Tabelle 16: AZT-Resistenz des PFV-Konstruktes BK54 .....</i>	112
<i>Tabelle 17: AZT-Resistenz verschiedener PFV-Konstrukte .....</i>	113
<i>Tabelle 18: Vergleich von SFVmac-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation K211I.....</i>	120
<i>Tabelle 19: Vergleich von SFVmac-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation I224T .....</i>	122
<i>Tabelle 20: Vergleich von SFVmac-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation S345T.....</i>	125
<i>Tabelle 21: Vergleich von SFVmac-Konstrukten mit und ohne der Pol-Mutation E350K.....</i>	127

Tabelle 22: Reverse Transkriptase und AZT-Resistenz bei verschiedenen Retroviren 137

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Retrovirus .....	3
Abbildung 2: Genom eines einfachen Retrovirus .....	4
Abbildung 3: Ablauf der Reversen Transkription (vereinfacht) .....	9
Abbildung 4: Replikationszyklus eines (einfachen) Retrovirus .....	11
Abbildung 5: Genom, Genexpression und Proteinprozessierung der Foamyviren ....	17
Abbildung 6: Foamyviraler Replikationszyklus .....	25
Abbildung 7: Thymidin und das Thymidinanalogon Zidovudin (AZT) .....	32
Abbildung 8: Aminosäuresubstitutionen in Gag und Pol von SFVmac .....	78
Abbildung 9: Homologie der Pol-Aminosäuresequenzen von SFVmac und SFVmac <sub>AZT<sup>res</sup></sub> mit veröffentlichten Sequenzen anderer Foamyviren .....	80
Abbildung 10: Vergleich der AZT-Resistenzmutationen von SFVmac und HIV .....	82
Abbildung 11: Versuche zur Untersuchung der AZT-Resistenz mit Zugabe von AZT zu unterschiedlichen Zeitpunkt im viralen Replikationszyklus.....	93
Abbildung 12: AZT-Resistenz-Versuche mit SK29 und BK3 bei Zugabe unterschiedlicher AZT-Konzentrationen bei der Titration.....	94
Abbildung 13: AZT-Resistenz-Versuche mit SK29 und BK3 bei Zugabe unterschiedlicher AZT-Konzentrationen bei der Virusproduktion .....	95
Abbildung 14: AZT-Resistenz-Versuche mit SK29 und BK3 bei Zugabe unterschiedlicher AZT-Konzentrationen sowohl bei Virusproduktion als auch bei Titration .....	96
Abbildung 15: Western Blot zum Nachweis der Expression von Gag in Zelllysaten..	99
Abbildung 16: Western Blot zum Nachweis der Expression von Pol in Zelllysaten..	100
Abbildung 17: Western Blot zum Nachweis von Gag in Viruspartikeln .....	100
Abbildung 18: Western Blot zum Nachweis von Pol in Viruspartikeln.....	101
Abbildung 19: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Abwesenheit von AZT .....	104
Abbildung 20: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Anwesenheit von 0,5 µM AZT .....	106
Abbildung 21: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Anwesenheit von 5 µM AZT ..	107
Abbildung 22: Titer der mutierten SFVmac-Klone in Anwesenheit von 50 µM AZT	108

*Abbildung 23: Wahrscheinliche Reihenfolge des Mutationserwerbs in SFVmac<sub>AZTres</sub> .....130*

*Abbildung 24: Hypothese zur Wirkung von 0,5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M AZT bei Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten im viralen Replikationszyklus .....144*

