

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstände: Prof. Dr. med. Volker ter Meulen
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

**Genetische und funktionale Vereinfachung
eines komplexen Retrovirus am Beispiel des
Primaten Foamy Virus Typ 1
(PFV-1)**

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

vorgelegt von
Thomas Schenk
aus Würzburg

Würzburg, August 2001

Referent: Prof. Dr. med. Axel Rethwilm
Koreferent: Prof. Dr. med. Tiemo Grimm
Dekan: Prof. Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2002

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

Elli Schenk

Dr. Wolfgang Schenk †

gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.1.1 Geschichte und Taxonomie	1
1.1.2 Struktur retroviraler Genome und Partikel	3
1.1.3 Replikation der Retroviren	6
1.1.4 HIV als komplexes Retrovirus	11
1.1.5 Vereinfachung retroviraler Genome	14
1.2 Sonderstellung der Foamyviren	15
1.2.1 Geschichte der Foamyviren	15
1.2.2 Foamyviren sind komplexe Retroviren	16
1.2.3 Replikation der Foamyviren	19
1.3 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material	22
2.1 Geräte und Materialien	22
2.2 Chemikalien	24
2.3 Radiochemikalien	26
2.4 Enzyme	26
2.5 Kits	27
2.6 Nukleinsäuren	27
2.7 Oligonukleotide	27
2.8 Plasmide	28
2.9 Seren	29
2.10 Kompetente Bakterien	29
2.11 Zelllinien	29
2.12 Lösungen, Medien und Puffer	30
2.12.1 Bakterienkultur	30
2.12.2 Plasmidpräparation	30
2.12.3 Agarosegel-Elektrophorese	31
2.12.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese	32

2.12.5	Western Blot	32
2.12.6	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay (RIPA)	33
2.12.7	Indirekte Immunfluoreszenz	34
2.12.8	-Galactosidase-Färbung von BHK/LTRlacZ-Zellen	34
2.12.9	Zellkultur	35
2.12.10	Calziumphosphat-Transfektion	36
2.12.11	Kristallviolett-färbung	37
2.12.12	Infectious Centre Assay (ICA)	37
2.12.13	Induktion mit 5-Azacytidin (AZC)	37
2.12.14	Stimulation mit Natriumbutyrat	37
2.12.15	FACS-Analyse	38
2.12.16	Luciferase-Assay	38
3	Methoden	39
3.1	Klonierung und Nachweis von DNA	39
3.1.1	Transformation kompetenter Bakterien	39
3.1.2	Präparation von Plasmiden in kleinem Maßstab (Minipräparation)	39
3.1.3	Präparation von Plasmiden in großem Maßstab (Maxipräparation)	40
3.1.4	Präparation von DNA aus Zellkulturen	41
3.1.5	Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	42
3.1.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
3.1.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	43
3.1.8	Klenow-Reaktion	44
3.1.9	Dephosphorylierung von 5'-Enden	44
3.1.10	Phosphorylierung von 5'-Enden	44
3.1.11	Ligation von DNA-Molekülen	45
3.1.12	Ethanol-Präzipitation	45
3.1.13	Phenol-Chloroform-Extraktion	46
3.1.14	Agarosegel-Elektrophorese	46
3.1.15	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
3.1.16	Sequenzierung	47

3.2	Nachweis von Proteinen	48
3.2.1	Herstellung von Zelllysaten für Western Blot	48
3.2.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	49
3.2.3	Western Blot	50
3.2.4	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay (RIPA)	51
3.2.5	Indirekte Immunfluoreszenz	52
3.2.6	Nachweis der Tas-Funktion mit BHK/LTRLacZ-Zellen	53
3.3	Zellkultur, Virusanzucht und -Quantifizierung	54
3.3.1	Zellkultur	54
3.3.2	Transfektion mit Calciumphosphat (CaPO ₄)	54
3.3.3	Gewinnung zellfreier Virusüberstände	55
3.3.4	Infektion von Zielzellen	55
3.3.5	Zellfärbung mit Kristallviolett	56
3.3.6	Virustitration mittels Infectious Centre Assay (ICA)	56
3.3.7	Induktion mit 5-Azacytidin (AZC)	57
3.3.8	Stimulation der rekombinanten LTR mit Natriumbutyrat	57
3.3.9	Freisetzung intrazellulärer Viren durch Einfrieren und Auftauen	57
3.3.10	FACS-Messung	58
3.4	Luciferase-Assay zur Analyse der Promotor-Aktivität	58
4	Ergebnisse	60
4.1	Infektiöse PFV-Klone mit konstitutiv aktiven LTR-Promotoren	60
4.1.1	Konstrukte mit rekombinanter 3'LTR	60
4.1.2	Konstrukte mit veränderter 5'- und 3'LTR	61
4.2	Protein-Expression nach transienter Transfektion	63
4.2.1	Nachweis von Gag, Pol und Tas im Western Blot	63
4.2.2	Nachweis von Env mit RIPA	65
4.3	Replikationskompetenz und Virustiter	65
4.3.1	Nachweis der Replikationsfähigkeit	65
4.3.2	Bestimmung der Virustiter in zellfreien Kulturüberständen	68
4.4	Genetische Stabilität der rekombinanten Viren	70
4.4.1	Stabilität der rekombinanten LTR	70

4.4.2	Stabilität des Tas/Bel-1-Gens	72
4.5	Versuche zur Steigerung des Virustiters	75
4.5.1	Induktion mit 5-Azacytidin	75
4.5.2	Stimulation der rekombinanten LTR mit Natriumbutyrat	75
4.5.3	Freisetzung intrazellulärer Viren durch Einfrieren und Auftauen	76
4.6	Promotor-Aktivität der hybriden LTR	77
4.6.1	Luciferase-Expressionsplasmide	77
4.6.2	Analyse der Promotor-Aktivität	78
4.7	Notwendigkeit einer funktionsfähigen Integrase	79
4.7.1	DNA-Konstrukte mit mutierter Integrase	79
4.7.2	FACS-Analyse der Viren mit mutierter Integrase	80
5	Diskussion	83
5.1	Konstruktion der rekombinanten Viren	83
5.1.1	Modifikation der LTR	83
5.1.2	Rekombination zwischen unterschiedlichen LTRs	85
5.2	Virustiter und Replikationskinetik	85
5.2.1	Reduziertes Replikationsverhalten der vereinfachten PFV	85
5.2.2	Negativ regulierende Elemente in der LTR	87
5.2.3	Methylierung der LTR	88
5.2.4	Promotor-Interferenz	88
5.2.5	Deletionen im CMV-Promotor	89
5.2.6	Integration des CMV-Promotors	90
5.2.7	Einfluss von Natriumbutyrat	90
5.2.8	Rolle des Bet-Proteins	91
5.2.9	Hypothese	91
5.3	Integration in das zelluläre Genom	92
5.4	Bedeutung und Ausblick	93
5.4.1	Attenuierung retroviraler Erreger durch genetische Vereinfachung	93
5.4.2	Foamyvirale Vektorsysteme	93
5.4.3	Konstruktion einer effizienteren hybriden LTR	94

6	Zusammenfassung	96
7	Abkürzungen	98
8	Literatur	102

1 Einleitung

1.1 Retroviren

1.1.1 Geschichte und Taxonomie

Das ausgehende zweite Jahrtausend unserer Zeitrechnung wurde in medizinischer Hinsicht von der weltweiten Ausbreitung des Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS) dominiert. Mit der Entdeckung von HIV (Human Immunodeficiency Virus) als Verursacher von AIDS (Barré-Sinoussi et al., 1983; Sarngadharan et al., 1984; Coffin et al., 1986) rückte die Gruppe der Retroviren in den Mittelpunkt des infektiologischen Interesses.

Dabei war bereits der Beginn der Retrovirusforschung durch eine wissenschaftliche Sensation gekennzeichnet. Genauso wie heute die Möglichkeit einer reversen Translation absurd erscheint, galt bis in die 60er Jahre des 20. Jahrhunderts das Gesetz des unidirektionalen Flusses genetischer Information, also strikt von DNA über RNA zu Protein. Für die Entdeckung, dass ein Teil dieser Strecke eben doch keine Einbahnstraße ist (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970), wurden Temin und Baltimore 1975 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Sie fanden bei RNA-Tumoviren das Enzym reverse Transkriptase (RT), das in der Lage ist, RNA in eine komplementäre DNA zu transkribieren. Dieser rückwärts gerichtete, also retrograde Mechanismus gab den Retroviren ihren Namen.

Später beschrieb man RT-Aktivität u.a. auch bei den Vertretern der Gruppe der Hepadnaviren (Summers & Mason, 1982) und schließlich auch als Teilfunktion des zellulären Ribonukleoproteins Telomerase, das mit dem Phänomen des Alterns in Verbindung gebracht wird (Zakian, 1995).

Ein zweites Charakteristikum der Retroviren, das sie von allen anderen viralen Erregern abgrenzt, ist die stabile Integration des DNA-Provirus in das Wirtszellgenom. Diese ermöglicht ihnen zum einen die Persistenz in den infizierten Zellen, eröffnet ihnen aber auch durch Befall der Keimbahn die Möglichkeit der vertikalen Übertragung von Parental- auf Filialorganismen (Goff, 2001).

Die früher gültige Klassifikation der Retroviren nach der Partikelmorphologie im elektronenmikroskopischen Bild in A- bis D-Typ-Viren ist heute ebenso überholt wie die Unterscheidung von Onko-, Lenti- und Spumaviren nach biologischen Eigenschaften. Eine neuere Einteilung berücksichtigt zusätzlich moderne Kriterien wie genetische Sequenzhomologien und differenziert zwischen sechs Genera der Orthoretroviren, denen die Spumaviren nun gegenübergestellt werden (Tabelle 1; modifiziert nach Goff, 2001)

Orthoretroviridae	Vertreter	Genom
Alpharetrovirus	Rous Sarcoma Virus (RSV) Avian Leukosis Virus (ALV)	Einfach
Betaretrovirus	Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV)	Einfach
Gammaretrovirus	Murine Leukemia Virus (MuLV) Feline Leukemia Virus (FeLV)	Einfach
Deltaretrovirus	Human T-Lymphotropic Virus (HTLV) -1, -2 Bovine Leukemia Virus (BLV)	Komplex
Epsilonretrovirus	Walleye Dermal Sarcoma Virus	Komplex
Lentivirus	Human Immunodeficiency Virus (HIV) -1, -2 Simian Immunodeficiency Virus (SIV)	Komplex
Spumaviridae	Primate Foamy Virus (PFV) -1 Feline Foamy Virus (FFV)	Komplex

Tab. 1:

Einteilung der Retroviren in Spumaviren und sechs Genera der Orthoretroviren mit Angabe von Hauptvertretern und Komplexität des Genoms (modifiziert nach Goff, 2001).

Nach der Struktur des Genoms ist außerdem eine Einteilung in einfache und komplexe Retroviren möglich (Cullen, 1991). Einfache Retroviren, die zu den Orthoretrovirusgenera Alpha-, Beta- oder Gammaretrovirus gehören, besitzen fast ausschließlich nur die Gene Gag, Pro, Pol und Env. Komplexe Retroviren (Deltaretro-, Epsilonretro-, Lenti- und Spumaviren) dagegen tragen zusätzlich noch Gene für regulatorische Proteine, die die virale Genexpression auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene beeinflussen können. HIV kann als Prototyp eines komplexen Retrovirus angesehen werden (Cullen, 1991).

1.1.2 Struktur retroviraler Genome und Partikel

Die infektiösen Partikel der Retroviren sind sphärisch und haben einem Durchmesser von ca. 100nm. Die von der Wirtszellmembran abgeleitete Virushülle mit eingelagerten viral kodierten Glycoproteinen umgibt das Kapsid. In diesem befinden sich die enzymatisch aktiven Proteine und die beiden +Strang RNA-Genome, die von 7kb beim MuLV bis zu 13kb bei Foamyviren in der Größe variieren. Die genetische Information liegt also in diploider Form vor. Fig. 1 zeigt schematisch den Aufbau eines retroviralen Partikels.

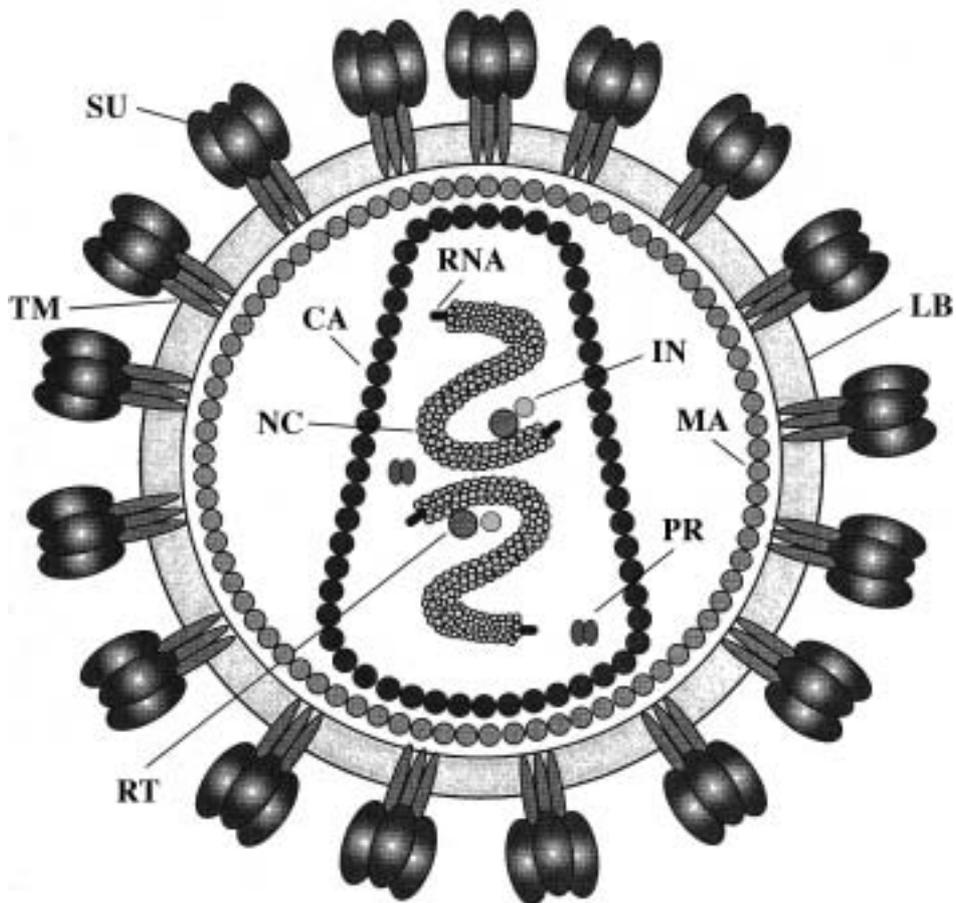


Fig. 1:

Aufbau eines retroviralen Partikels. Die beiden RNA-Genome sind eng mit dem Nucleokapsid (NC) assoziiert und befinden sich zusammen mit der reversen Transkriptase (RT), der Integrase (IN) und der Protease (PR) im Inneren des Cores, das durch Kapsid-Proteine (CA) gebildet wird. Das Core wird von einer Schicht aus Matrix-Proteinen (MA) umgeben. Die Hüllmembran besteht aus einem Lipidbilayer (LB), in das die Transmembran-Glycoproteine (TM) eingelagert sind. Diese sind mit den Surface-Glycoproteinen (SU) assoziiert (modifiziert nach Freed & Martin, 2001).

Die Struktur des RNA-Genoms eines einfachen Retrovirus ist in Fig. 2 dargestellt. Im Partikel interagieren die beiden identischen RNA-Genome im 5'-Bereich mit Hilfe der Dimer Linkage Structure (DLS), einer selbst-komplementären Region (Goff, 2001). Wie bei zellulären mRNAs befindet sich am 5'-Ende ein Cap, am 3'-Ende ein etwa 200nt langer Poly-A-Schwanz (Coffin, 1990).

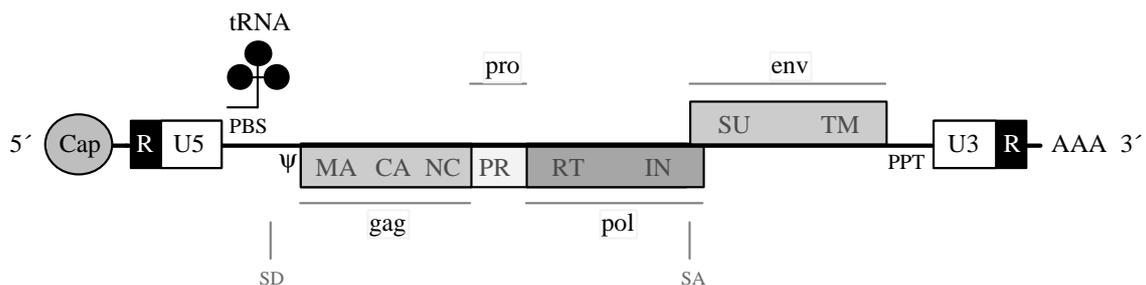


Fig. 2:

Schematische Darstellung eines einfachen retroviralen Genoms (Erläuterungen im Text).

Stromabwärts der Cap-Struktur befindet sich die 5'R-Region. Diese kurze Sequenz wiederholt sich am 3'-Ende des Genoms, daher R für Repeat oder redundante Region. Das doppelte Vorhandensein ist wichtig für den Mechanismus der reversen Transkription. An die R-Region schließt in 3'-Richtung der U5-Bereich (unique, also im Gegensatz zu R nur einmal vorhanden und am 5'-Ende) an, der für die Integration wichtige Sequenzen beinhaltet, gefolgt von der Primer Binding Site (PBS). Diese hat eine Länge von 18nt und ist im Partikel an eine zelluläre tRNA, die als Primer für die Synthese von -Strang DNA benötigt wird, gebunden.

Auf die PBS folgt der Leader-Bereich mit einem für alle gespleißten RNAs verwendeten Spleißdonator (SD) und dem Verpackungssignal ψ , das sich z.B. bei MuLV auch bis in das Gag-Gen erstrecken kann (Bender et al., 1987) und für den Einschluss der genomischen RNA in das Partikel wichtig ist (Coffin, 1990).

Das Gag-Gen kodiert für alle inneren Strukturproteine des Partikels. Von 5' nach 3' liegen die Sequenzen für die Untereinheiten Matrix (MA), Kapsid (CA) und Nukleokapsid (NC). Im Partikel (Fig. 1) interagieren die NC-Proteine über basische Bereiche und ein bis zwei Cys-His-Boxen, die Ähnlichkeit zu nukleinsäurebindenden Zink-Finger-Motiven aufweisen, mit den RNA-Genomen. CA als weiteres Gag-

Genprodukt formt das Viruskapsid oder Core, eine Proteinkapsel, die die RNA-Genome und assoziierte NC-Proteine, sowie die pol-kodierten Proteine mit einschließt. Das Kapsid ist meist sphärisch geformt, aber auch konische oder zylindrische Formen sind beschrieben. Zwischen dem Kapsid und der Virushülle befindet sich das Matrix-Protein, das am Aminoterminus meist myristiniert ist und so mit der Lipidmembran der Hülle interagiert (Goff, 2001).

Das Pro-Gen, das die virale Protease (PR) kodiert, wird je nach dem Verhältnis zu den angrenzenden Leserastern Gag (z.B. bei ALV) oder Pol (z.B. bei HIV) zugeordnet, oder als eigenes Gen bezeichnet, wenn das Pro-Leseraster sowohl gegenüber dem Gag- als auch dem Pol-Leseraster verschoben ist, wie dies bei HTLV der Fall ist. Das Genprodukt, die virale Protease, eine Aspartat-Protease, liegt im Inneren des Kapsides als Dimer vor (Goff, 2001).

Stromabwärts der Pro-Sequenzen liegt das Pol-Gen, das im 5'-Bereich für die reverse Transkriptase (RT) und am 3'-Ende für die Integrase (IN) kodiert. Beide Genprodukte befinden sich im Partikel im Inneren des Kapsides.

Das Env-Gen trägt die Sequenzen für die beiden Glykoproteine der Virushülle, das Surface- (SU) und das Transmembranprotein (TM). Die Hülle besteht aus der Phospholipiddoppelschicht der Wirtszellmembran. Das TM-Protein ist mit einem hydrophoben Bereich von etwa 20 Aminosäuren in der Membran verankert, das SU-Protein ist in der Regel nichtkovalent an den außerhalb der Membran gelegenen Teil von TM gebunden (Modrow & Falke, 1997).

Bei komplexen Retroviren schließen sich nach den Genen für Gag, Pro, Pol und Env noch weitere akzessorische Gene zur Regulation der Genexpression an. In 1.1.4 ist der Aufbau von HIV als Beispiel für ein komplexes Retrovirus näher erläutert.

Vor dem Beginn der U3-Region befindet sich noch der Polypurintrakt (PPT), ein Bereich von mindestens 9 A- oder G-Basen, der für die Initiation der +Strang DNA bei der reversen Transkription wichtig ist (Coffin, 1990).

Zwischen dem PPT und dem 3'-R-Bereich liegt die U3-Region (unique 3'). Sie enthält wie die U5-Region für die Integration wichtige Sequenzen. Zusätzlich trägt sie aber auch noch den viralen LTR-Promotor, der die Genexpression des integrierten Provirus steuert, und cis-aktive Elemente, die über Interaktion mit zellulären, oder bei komplexen

Retroviren auch viralen Faktoren, die Genexpression regulieren (Modrow & Falke, 1997)

1.1.3 Replikation der Retroviren

Am Beginn des retroviralen Replikationszyklus steht die spezifische Interaktion mit einem zellulären Rezeptor und die Einschleusung des Partikelkerns in das Zellinnere. Die dabei ablaufenden Mechanismen sind im Detail noch nicht geklärt. Die SU-Untereinheit erkennt spezifisch ein zelluläres Oberflächenprotein. Dies führt vermutlich zu einer Konformationsänderung der Env-Proteine, die eine durch die TM-Untereinheit vermittelte Fusion der Virushülle mit der Zellmembran ermöglicht. Das Kapsid wird dabei in das Zellinnere ausgestülpt (Goff, 2001). Heute kennt man die zellulären Rezeptoren für eine Vielzahl von Retroviren. Das CD4-Oberflächenprotein, das als Hauptrezeptor essentiell für eine Infektion mit HIV-1 ist, wurde als erstes identifiziert (Dalglish et al., 1984; Klatzman et al., 1984).

Nachdem das Kapsid in das Zytoplasma entlassen wurde, beginnt die reverse Transkription. Diese findet in einem Komplex statt, der mindestens aus NC, RT und IN sowie der genomischen RNA besteht (Bowerman et al., 1989). Die Gag-Proteine müssen hierfür in prozessierter Form vorliegen, d.h. das Gag-Vorläuferpeptid muss von der viralen Protease in die reifen Untereinheiten gespalten worden sein (Goff, 2001). Die Schlüsselrolle spielt die pol-kodierte reverse Transkriptase, eine von divalenten Kationen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) abhängige DNA-Polymerase, die sowohl RNA als auch DNA als Vorlage nutzen kann. Sie besitzt keine Proofreading-Aktivität, was dazu führt, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} Mutationen geschehen. Der carboxyterminale Bereich der RT besitzt RNase H-Aktivität, ist also in der Lage, die RNA in RNA-DNA-Hybriden abzubauen (Cullen, 1990; Modrow & Falke, 1997).

Die reverse Transkription ist ein komplexer Prozess, der in Fig. 3 schematisch dargestellt ist. Beginnend am 3'-Ende der an die PBS gebundenen tRNA wird von der reversen Transkriptase zunächst in 5'-3'-Richtung eine komplementäre -Strang strong-stop DNA über die U5- und R-Region synthetisiert. Der RNase H-Anteil der RT baut dabei den RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrides ab, bevor die strong-stop DNA vom 5'- zum 3'-Ende des Genoms springt und dort über die komplementären R-Regionen interagiert. Jetzt wird die Verlängerung der strong-stop DNA zur langen -Strang DNA

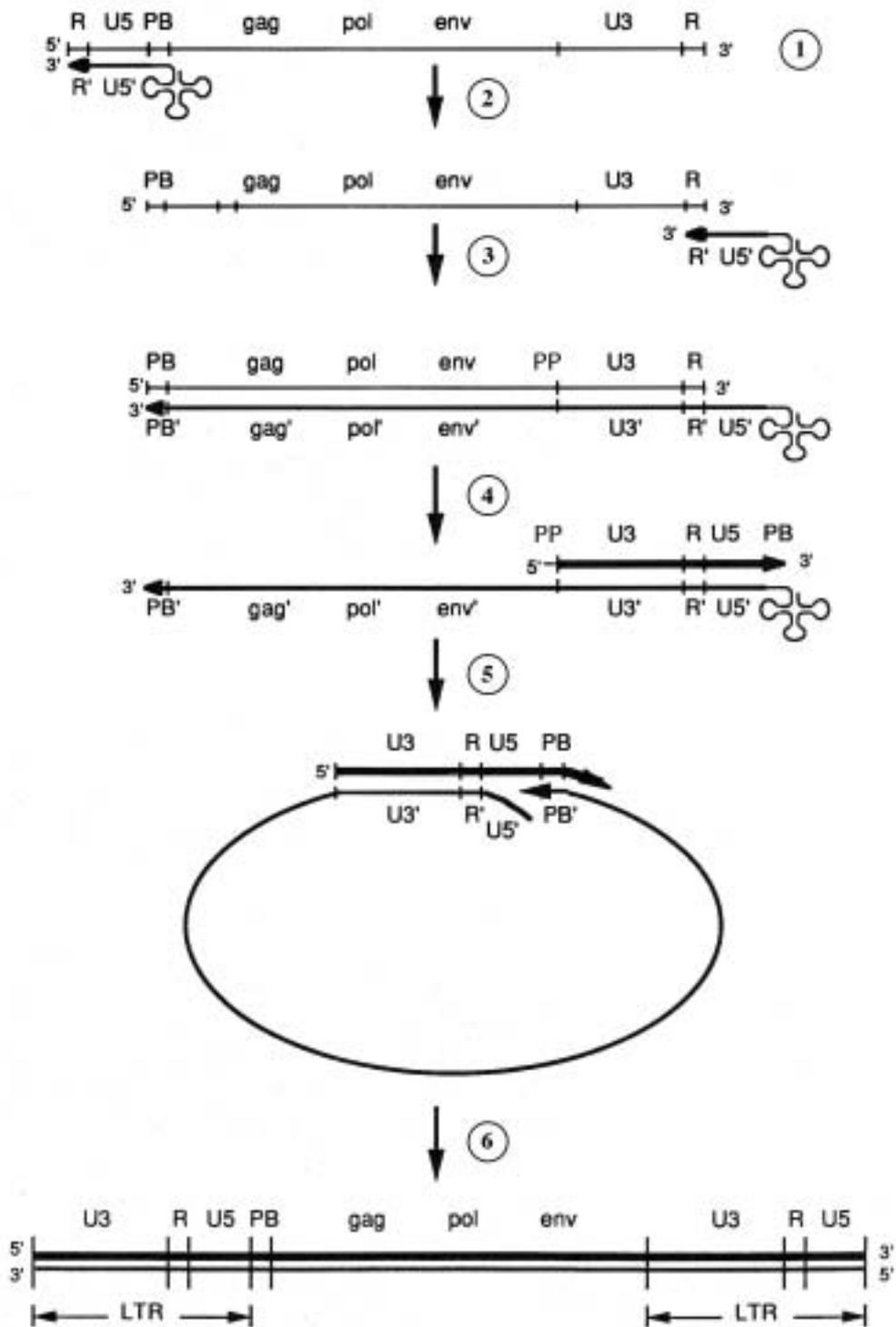


Fig. 3:

Mechanismus der reversen Transkription (Coffin, 1990). Feine Linien repräsentieren RNA, mittelstarke -Strang DNA und fette Linien markieren +Strang DNA. (1) Synthese von -Strang strong-stop DNA, (2) 1. Umlagerung, Synthese (3) der langen -Strang DNA und (4) von +Strang strong-stop DNA, (5) Bildung eines zirkulären Intermediates, (6) Vervollständigung der - und +Strang DNA zur linearen Virus-DNA. PB = Primer Binding Site, PP = Polypurintrakt

über das gesamte Genom bis zur PBS möglich. Im nun vorliegenden RNA-DNA-Hybrid kann der RNA-Anteil wieder durch die RNase H abgebaut werden. Lediglich der PPT am 3'-Ende des Genoms ist zunächst gegen den Abbau resistent und dient als Primer für die Synthese der +Strang strong-stop DNA, wird aber schließlich auch eliminiert. Die +Strang strong-stop DNA erstreckt sich über U3, R, U5 und die PBS. Die nun nicht mehr benötigte tRNA wird durch RNase H abgebaut. Jetzt kann eine zweite Umlagerung erfolgen, die +Strang strong-stop DNA kann über die PBS mit der langen -Strang DNA hybridisieren. Dies geschieht in Form eines zirkulären Intermediates. Nun können + und -Strang DNA vervollständigt werden und der Zirkel öffnet sich zur linearen Virus-DNA, die an beiden Enden jetzt eine vollständige LTR (Long Terminal Repeat) mit U3-, R- und U5-Region in 5'-3'-Abfolge besitzt (Goff, 2001).

Die lineare Virus-DNA gelangt als Präintegrationskomplex mit Kapsidkomponenten entweder nach der Auflösung und Wiederherstellung der Zellmembran im Rahmen der Mitose oder im Falle von Lenti- und Foamyviren durch aktiven Transport in den Nukleus (Bukrinsky et al., 1992; Saib et al., 1997).

Die Integration des Provirus in das Wirtszellgenom ist ein essentieller Schritt im Replikationszyklus der Retroviren. Er wird durch die pol-kodierte Integrase vermittelt, die entweder als Dimer oder aber auch als Tetramer auftritt. Sowohl ein DNA-bindendes Zink-Finger-Motiv im N-terminalen Bereich, als auch die sauren Aminosäuren eines DD35E-Motivs im aktiven Zentrum sind hochkonserviert (Goff, 2001; Kulkosky et al., 1992).

Die virale Integrase schneidet zunächst die äußeren Enden der LTRs, die z.B. bei MuLV aus einem CATT-Motiv (inverted repeat) bestehen (Fig. 4). Je ein TT-Dinukleotid wird entfernt, an beiden Seiten verbleiben überhängende 5'-Enden aus je zwei Adenosinresten. Durch eine Umlagerung der Phosphodiesterbindungen wird die zelluläre DNA geöffnet, wobei 5'-Überhänge von vier bis sechs Basen entstehen. Gleichzeitig erfolgt die Verknüpfung der 5'-terminalen Basen der Wirtszell-DNA mit den 3'-terminalen Basen des Provirusgenoms. Die viralen 5'-AA-Überhänge bleiben dabei frei. Die Ergänzung der Lücken und der Abbau der 5'-Überhänge erfolgt durch zelluläre Reparaturenzyme. So werden die flankierenden zellulären Sequenzen

verdoppelt, während von der linearen Virus-DNA die jeweils endständigen zwei Basenpaare verloren gehen (Goff, 2001).

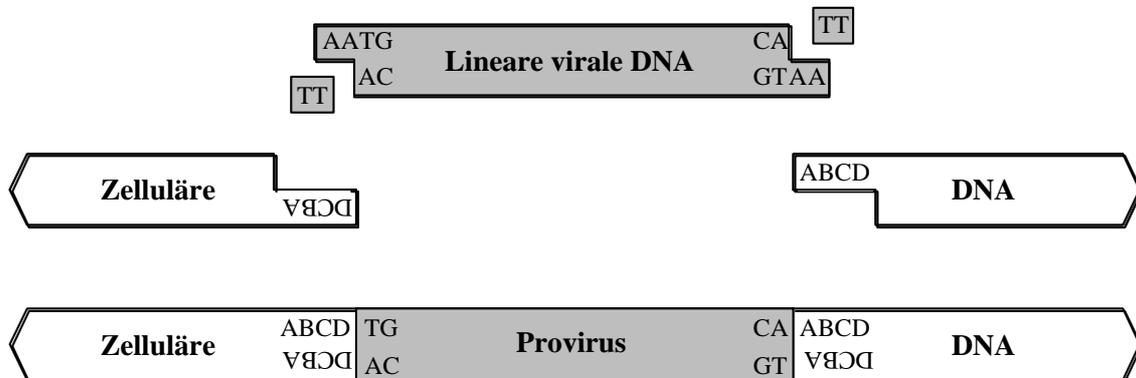


Fig. 4:

Umorganisation der DNA-Sequenzen bei der Integration der Virus-DNA in das Wirtszellgenom. Vier bis sechs Basenpaare der zellulären DNA werden verdoppelt, während an den Enden der linearen viralen DNA jeweils zwei Basenpaare verloren gehen. ABCD symbolisieren vier beliebige Nukleotide, komplementäre Basen sind durch horizontale Spiegelung dargestellt.

Mit der Integration des Provirus endet die frühe Phase der Infektion und geht in die späte Phase über. Die U3-Region enthält den LTR-Promotor mit TATA- und CCAAT-Box als typische Konsensus-Sequenzen und Enhancer-Elemente, die über Interaktion mit zellulären Faktoren die Expression regulieren. Komplexe Retroviren exprimieren zusätzlich zu den Proteinen einfacher Retroviren regulatorische Proteine, wie Tax bei HTLV-1, das als Transaktivator die Aktivität des U3-Promotors steigern kann, oder Tat bei HIV-1, das über Wechselwirkung mit einem RNA-Element (TAR) die Elongation der Transkripte ermöglicht (Goff, 2001).

Die Transkription der viralen RNA erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II und beginnt am Übergang U3-R. Sie endet stromabwärts des retroviralen Genoms in der zellulären DNA. Zelluläre Mechanismen modifizieren die RNA, indem sie am 5'-Ende ein Cap anfügen und das 3'-Ende nach einer Spaltung an der R-U5-Grenze mit einem Poly-A-Schwanz versehen. Die meisten Retroviren haben ein AAUAAA-Motiv als Polyadenylierungssignal in der R-Region (Goff, 2001).

Alle Orthoretroviren benutzen ein solches RNA-Transkript in voller Länge (Fig. 2) als RNA-Genom für neue Viren und als mRNA für die Expression von Gag, Pro und Pol.

Einfache Retroviren generieren lediglich eine gespleißte RNA. Diese wird zur Expression von Env verwendet. Komplexe Retroviren nutzen dagegen mehrere subgenomische RNAs für die Synthese von Env und akzessorischen Proteinen. Alle gespleißten RNAs werden durch Verwendung desselben 5'-Spleißdonators, meist im Leader-Bereich (Fig. 2), in Kombination mit verschiedenen stromabwärts gelegenen Spleißdonatoren und -Akzeptoren hergestellt und haben jeweils die terminalen 5'- und 3'-Enden mit der genomischen RNA gemeinsam. Die Leseraster subgenomischer RNAs besitzen eigene Startcodons (Coffin, 1990).

Die prozessierten RNAs werden aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert und stehen dort für die Verpackung in Viruspartikel oder für die Translation zur Verfügung. Die RNA-Transkripte voller Länge werden für die Synthese von Gag- und Pol-Vorläuferproteinen genutzt. In etwa 5% der Fälle liest das Ribosom die RNA nicht nur bis zum Gag-Stopcodon ab, sondern translatiert auch noch die pol-kodierenden Sequenzen zur Produktion des Gag-Pol-Vorläuferproteins. Für dieses Überlesen des Stopcodons gibt es zwei verschiedene Mechanismen. Liegen Gag und Pol nicht im selben Leseraster (bei Alpharetroviren und Lentiviren), ermöglicht eine RNA-Haarnadelschleife in Verbindung mit einer homopolymeren Oligo-A oder Oligo-U-Region das Rückwärtsrutschen des Ribosoms um eine Base. Das nun in einem anderen Leseraster liegende Gag-Stopcodon wird nicht erkannt. Bei einem von Gag und Pol unterschiedlichen Pro-Leseraster (bei Beta- und Deltaretroviren) erfolgen zwei Rasterwechsel zur Synthese eines Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins. Die andere Möglichkeit ist eine Unterdrückung des Gag-Stopcodons durch Verwendung einer Glutamin-tRNA anstelle des Abbruchs der Translation bei Gamma- und Epsilonretroviren, bei denen Gag, Pro und Pol im gleichen Leseraster liegen (Goff, 2001).

Die an freien Ribosomen translatierten Gag-Vorläuferproteine fügen sich entweder bereits im Zytoplasma zu Virionen zusammen (B- und D-Typ Viren) oder erst nach dem Transport zur Zellmembran (C-Typ Viren). Dabei werden über die Gag-Pro bzw. Gag-Pro-Pol-Vorläufer auch Pro- und Pol-Proteine mit eingebaut. Über Wechselwirkung der Cys-His-Boxen des NC-Anteils von Gag mit dem Verpackungssignal ψ der genomischen RNA werden zwei RNA-Genome ins Partikel gebracht. Auch ein Gemisch zellulärer tRNAs wird mitverpackt.

Der Aminoterminus des Env-Proteins besteht aus einer hydrophoben Signalsequenz, die die wachsende Peptidkette ins raue endoplasmatische Retikulum leitet, dort aber von einer Signalase abgespalten wird. Das Protein wird glykolysiert, vermutlich zu Trimeren oligomerisiert und in den Golgi-Apparat exportiert. Dort werden die Kohlenhydratketten modifiziert und der Vorläufer von einer Furinprotease in die SU- und TM-Untereinheiten gespalten. Nach dem Transport zur Zellmembran erfolgt die Interaktion des zytoplasmatischen Teils von TM mit dem Gag-Aminoterminus.

Die so entstehenden Partikel sind noch unreif und erlangen ihre Infektiosität erst durch Prozessierung der Vorläuferproteine. Die virale Protease schneidet sich zunächst autokatalytisch aus den Vorläufern heraus, um diese dann als aktives Dimer in ihre Untereinheiten zu spalten.

Das Partikel trennt sich durch Knospung von der Zelle und nimmt dabei einen Teil der Zellmembran mit eingelagerten Env-Proteinen als Virushülle mit (Goff, 2001).

1.1.4 HIV als komplexes Retrovirus

Als komplexes Retrovirus besitzt HIV-1 neben dem minimalen Satz retroviraler Gene Gag, Pro, Pol und Env noch zusätzliche Leseraster für die Expression von sechs regulatorischen oder akzessorischen Proteinen (Fig. 5).

HIV-1

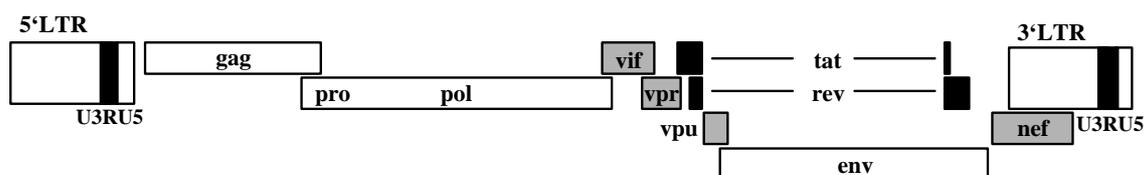


Fig. 5:

Struktur eines HIV-1-Provirus. Die allen Retroviren gemeinsamen Gene Gag, Pro, Pol und Env sind farblos, die Gene für die regulatorischen Proteine Tat und Rev sind schwarz und die Leseraster für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef grau unterlegt.

Die unter der Kontrolle der 5'LTR erzeugten RNA-Transkripte sind bei HIV komplizierten Spleißvorgängen unterworfen. Einfache Retroviren verwenden außer genomischer RNA, die auch als mRNA für Gag und Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteine dient, nur eine einfach gespleißte mRNA zur Synthese von Env. In HIV-infizierten

Zellen konnten mehr als 30 verschieden gespleißte RNA-Transkripte gefunden werden (Purcell & Martin, 1993; Schwartz et al., 1990). Möglich wird dies durch die alternative Kombination von 5 Spleißdonatoren mit mehr als 10 Spleißakzeptoren. Dabei entstehen neben der ungespleißten genomischen RNA partiell gespleißte RNA-Moleküle für die Expression von Vif, Vpr, Vpu und Env und mehrfach oder komplett gespleißte RNAs für die Synthese der Tat-, Rev- und Nef-Proteine. Dasselbe Proteine kann so von mehreren unterschiedlichen Spleißprodukten translatiert werden (Freed & Martin, 2001).

Zwei der zusätzlichen Proteine, Tat und Rev, sind Regulatoren der Genexpression. Das Tat-Protein (transactivator of transcription) ist für die Replikation von HIV essentiell und wird früh im Infektionszyklus synthetisiert. Es existiert in zwei Varianten: Einmal als 101 AS großes Produkt zweier Exons und als mit 72 AS kürzere Variante, die nur von einem Exon kodiert wird. Ohne die Anwesenheit von Tat im Nukleus kommt es zum vorzeitigen Abbruch der Transkription mit der Bildung unterschiedlich langer insuffizienter RNAs. Tat bindet im Zellkern zunächst an den zellulären Elongationsfaktor P-TEFb und dann an TAR (transactivator response region), ein RNA-Element, das am 5'-Terminus aller viralen Transkripte vorhanden ist. Eine so an den Ort der Transkription gebrachte Untereinheit von P-TEFb kann nun die Polymerase II phosphorylieren, wodurch die Bildung langer Transkripte ermöglicht wird (Freed & Martin, 2001).

Das Rev-Protein (regulator of expression of virion proteins) ist ein posttranskriptionaler Regulator der Genexpression. Es ist 116 AS lang, liegt als Multimer vor und wird von zwei Exons translatiert, die mit denen von Tat überlappen. Ohne die Anwesenheit von Rev werden lediglich die mehrfach gespleißten mRNAs, die für Tat, Rev und Nef kodieren, vom Kern in das Zytoplasma exportiert. Translatiertes Rev kann dann über Interaktion mit zellulären Transportproteinen der Importin- β -Gruppe und dem Kernporenkomplex in den Zellkern eindringen (Freed & Martin, 2001). Dort bindet es an das RRE (rev response element), ein RNA-Element im Env-Gen, das auf allen einfach oder ungespleißten viralen RNAs vorhanden ist. Diese für Gag, Gag-Pro-Pol, Env, Vif, Vpr oder Vpu kodierenden RNAs können nun über erneute Interaktion von Rev mit zellulären Transportmechanismen in das Zytoplasma exportiert werden (Modrow & Falke, 1997).

Die akzessorischen Proteine Vif, Vpu, Vpr und Nef sind für die Replikation *in vitro* nicht unbedingt nötig, haben aber ihre Bedeutung bei der Replikation *in vivo* und für die Pathogenese von HIV.

Das Vif-Protein (viral infectivity factor) wird von einem Leserahmen translatiert, der mit Pol und Vpr überlappt. Seine Bedeutung ist noch nicht vollständig geklärt. In manchen Zelllinien produzierte vif-defekte Viren sind aufgrund einer inkompletten reversen Transkription nicht infektiös. Auch wurde bei diesen Viren eine veränderte Partikelmorphologie beobachtet (Modrow & Falke, 1997).

Das Vpr-Gen (viral protein rapid) überlappt mit dem Vif- und Tat-Leseraster. Es wird durch Interaktion mit dem C-Terminus des Gag-Proteins in das Partikel eingebaut. Vermutlich ist Vpr am aktiven Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern beteiligt, der es HIV im Gegensatz zu den meisten anderen Retroviren ermöglicht, nicht proliferierende Zellen zu infizieren. Auch eine schwache Transaktivierung der viralen LTR durch Vpr und eine Arretierung infizierter Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus ist beschrieben (Freed & Martin, 2001).

Das ausschließlich in HIV-1 und SIV der Schimpansen (SIVcpz) kodierte Vpu-Gen (viral protein u) wird von einer bicistronischen Vpu-Env-mRNA translatiert. Das Produkt ist ein Membran-Phosphoprotein, das als Multimer vorliegt und kationenselektive Ionenkanäle bildet (Ewart et al., 1996). In Abwesenheit von Vpu ist die Freisetzung viraler Partikel vermindert. Im endoplasmatischen Retikulum vermittelt Vpu die Degradation von CD4 und verhindert so eine Komplexbildung zwischen CD4 und dem Env-Vorläuferprotein (Freed & Martin, 2001).

Der Leserahmen des Nef-Proteins (negative factor) überlappt mit der U3-Region der 3'LTR. Frühere Berichte über einen negativ-regulierenden Einfluss auf die LTR wurden widerlegt. Nef ist ein membranassoziiertes Protein, das in der Lage ist, die Expression von CD4- und MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche zu reduzieren, die virale Infektiosität zu erhöhen und möglicherweise in die zelluläre Signaltransduktion einzugreifen (Freed & Martin, 2001).

1.1.5 Vereinfachung retroviraler Genome

Das Bovine Leukämie Virus (BLV) ist ebenfalls ein komplexes Retrovirus. Im 3'-Bereich des Genoms befinden sich die Leseraster für die beiden Proteine Tax und Rex, die von mehrfach gespleißten mRNAs transkribiert werden und mit den cis-aktiven Sequenzen TRE (tax response element) bzw. RxRE (rex response element) für eine Regulation der Genexpression sorgen. Das Tax-Protein bewirkt zusammen mit dem TRE in der 5'U3-Region eine Aktivierung der Transkription. Rex ist mit dem Rev-Protein bei HIV vergleichbar und fördert über Wechselwirkung mit dem RxRE in der 3'R-Region den nukleären Export ungespleißter genomischer und einfach gespleißter Env-mRNA. Tax und Rev sind beide für die Replikation von BLV essentiell.

Boris-Lawrie et al. beschrieben die tax- und rex-unabhängige Replikation einer vereinfachten BLV-Variante mit hybrid konstruierten LTRs (Fig. 6). Die terminalen Integrationssequenzen von BLV wurden beibehalten, die restliche U3- und die R-Region stammte vom Spleen Necrosis Virus (SNV), einem einfachen Retrovirus ohne Abhängigkeit von einem transkriptionalen Transaktivator wie Tax. Auf diese Weise wurden das TRE und das RxRE eliminiert und eine tax-unabhängige Transkription erreicht. Die U5-Bereiche, die Gene Gag, Pro, Pol und Env, sowie der PPT, die PBS und das Verpackungssignal von BLV waren erhalten, die Leseraster für Tax und Rex jedoch deletiert. Um rex-unabhängige Expression zu erreichen, wurden die Splice-Stellen für die Env-mRNA entfernt und das Env-Gen unter der Kontrolle eines IRES-Elementes von einer polycistronischen Gag-Pro-Pol-Env-mRNA translatiert (Boris-Lawrie & Temin, 1995; Boris-Lawrie et al., 1997).

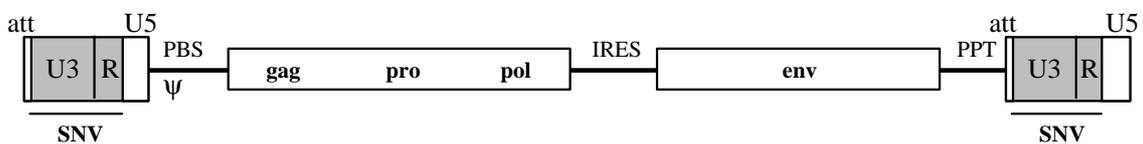


Fig. 6:

Struktur der vereinfachten BLV-Variante (Provirus) nach Boris-Lawrie et al. (1997). Die U3-Region bis auf die Integrationssequenzen (att) und die R-Region stammen vom SNV (grau hinterlegt), das IRES-Element vom Poliovirus (Beschriftung wie Fig. 2).

Die Replikationskompetenz dieser vereinfachten BLV konnte über mehrere Passagen in Zellkulturen nachgewiesen werden. Bei in vivo Infektions-Experimenten mit Ratten wurde gezeigt, dass eine mit Wildtyp-BLV vergleichbare serologische Immunantwort auftritt und mindestens ein Replikationszyklus in mononukleären Zellen des peripheren Blutes möglich ist (Boris-Lawrie et al., 1997).

Es wurden auch partiell vereinfachte HIV-1-Varianten beschrieben, bei denen Teile des Enhancer-Bereichs der U3-Region durch ein immediate early gene Enhancer-Fragment des Cytomegalievirus ersetzt wurden. Diese Viren waren auch nach funktionaler Deletion des Tat-Gens durch Einführung von Stopcodons in einigen Zellkulturen lymphoiden Ursprungs replikationsfähig (Chang & Zhang, 1995).

1.2 Die Sonderstellung der Foamyviren

1.2.1 Geschichte der Foamyviren

Foamyviren (Spumaviren) werden wegen einiger Besonderheiten ihrer Replikation (s.u.) den Orthoretroviren gegenübergestellt. Ihren Namen verdanken sie dem charakteristischen zytopathischen Effekt (CPE) in infizierten Zellkulturen. Es bilden sich große multinukleäre Synzytien mit einem schaumig (engl.: foamy) erscheinenden polyvakuolisierten Zytoplasma.

Erstmals beschrieben wurden sie 1954 in Zellkulturen aus Affennierengewebe (Enders & Peebles, 1954). 1971 gelang die Isolation eines Foamyvirus aus lymphoblastoiden Zellen eines Patienten mit Nasopharynxkarzinom (Achong et al., 1971), die erste Isolation eines Retrovirus aus menschlichem Gewebe überhaupt. Das Virus wurde Humanes Foamy Virus (HFV) bzw. Humanes Spumaretrovirus (HSRV) genannt, später wurden infektiöse Klone etabliert (Rethwilm et al., 1990; Löchelt et al., 1991).

Auch in vielen anderen Spezies wurden Foamyviren nachgewiesen, darunter in vielen Primaten, Katzen (Riggs et al., 1969), Rindern (Malmquist et al., 1969) und Pferden (Tobaly-Tapiero et al., 2000).

Im Laufe der Zeit wurden Foamyviren mit einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen in Verbindung gebracht. Darunter z.B. Chronische Myeloische Leukämie (Young et al., 1973), Amyotrophe Lateralsklerose (Westarp et al., 1992), Morbus

Basedow (Wick et al., 1993) und viele andere. Heute besteht weitgehend Konsens darüber, dass Foamyviren trotz des spektakulären CPEs, der in vitro in Zellkulturen auftritt, in vivo apathogen sind (Linial, 2000). Lediglich für immuninkompetente Nacktmäuse kann die Infektion lethal sein (Imrich et al., 1999).

Frühe serologisch orientierte Prävalenzstudien ergaben eine endemische Verbreitung der Foamyviren in der Bevölkerung der pazifischen Inseln und Afrikas (Achong & Epstein, 1978; Achong & Epstein, 1983; Loh et al., 1980; Müller et al., 1980). Neuere Untersuchungen mit mehreren kombinierten Testmethoden konnten jedoch zeigen, dass es kein natürliches Reservoir für Foamyviren in der menschlichen Bevölkerung gibt. Lediglich bei Laborpersonal mit Kontakt zu Affen konnten akzidentelle Foamyvirusinfektionen bestätigt werden (Schweizer et al., 1995; Schweizer et al., 1997; Ali et al., 1996; Heneine et al., 1998). Eine horizontale Übertragung auf andere Menschen konnte dabei bisher nicht nachgewiesen werden (Callahan et al., 1999).

Weiterhin konnte durch Sequenzvergleiche gezeigt werden, dass HFV nahezu identisch zu Isolaten von SFV aus Schimpansen ist (Herchenröder et al., 1994). Dies und die Tatsache, dass Menschen offenbar keine natürlichen Wirte für Foamyviren sind, führte dazu, dass HFV mehrfach umbenannt und seither als SFVcpz(hu), CFV/hu (Chimpanzee Foamy Virus strain human) bzw. PFV-1 (Primate Foamy Virus Type 1) bezeichnet wird.

Wissenschaftliches Interesse erlangten Foamyviren in jüngeren Zeit vor allem durch die Aufdeckung ihrer funktionalen Mittelstellung zwischen Retro- und Hepadnaviren einerseits (Rethwilm, 1996; Linial, 1999) und Retroviren und Retrotransposons (Heinkelein et al., 2000) andererseits.

1.2.2 Foamyviren sind komplexe Retroviren

Foamyviren sind 100 - 140nm große sphärische Partikel, die im Unterschied zu anderen Retroviren eine Vielzahl 5 – 15nm große Spikes auf der Oberfläche tragen. Das Core erscheint im EM im Vergleich zu anderen Retroviren unreif (Saib et al., 1995).

Aufgrund ihres Genomaufbaus werden die Foamyviren den komplexen Retroviren zugeordnet. Neben den üblichen retroviralen Genen Gag, Pro, Pol und Env tragen sie zwei zusätzliche offene Leserahmen Bel-1 und Bel-2 (between Env and LTR), die für akzessorische Proteine kodieren (Rethwilm et al., 1987). Die Struktur des proviralen

Genoms und die durch Verwendung beider Promotoren und verschiedener Spleißstellen entstehenden RNA-Transkripte sind in Fig. 7 schematisch dargestellt.

Das Genom ist mit 12 – 13kb das Längste unter den Retroviren und besitzt wie das Genom der Lentiviren in der Mitte einen zweiten PPT. Neben 5´ im Genom gelegenen Verpackungssignalen wurden weitere cis-aktive Sequenzen im Pol-Bereich gefunden, die für die effiziente Verpackung von Vektoren benötigt werden (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998).

In chronisch infizierten Zelllinien wird eine durch alternatives Spleißen verkürzte Variante mit einer 301bp Deletion im Bel-1-Leserahmen (Δ Tas) gefunden, die als defective interfering virus (DI) wirkt (Saib et al., 1993).

PFV-1

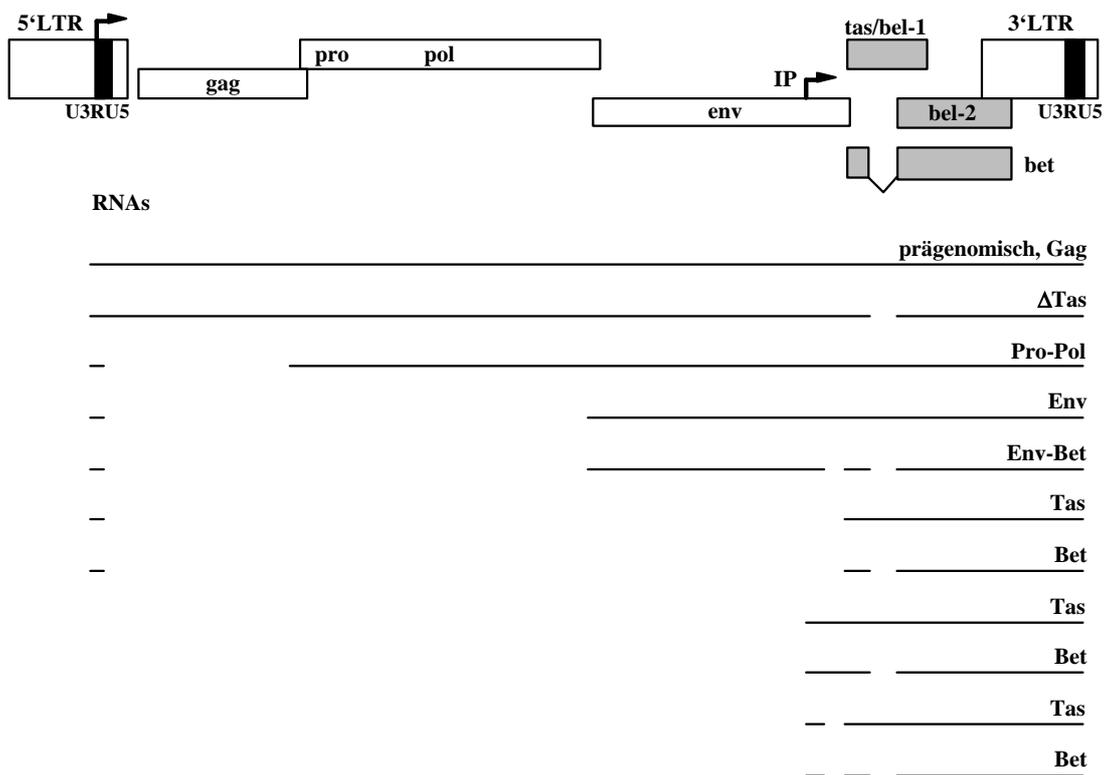


Fig. 7:

Struktur des proviralen Genoms von PFV-1. Die akzessorischen Leserahmen Bel-1 und Bel-2 sowie das Bet-Genprodukt sind grau unterlegt. Mit Strichen dargestellt sind die unterschiedlich gespleißten RNA-Transkripte. Unterbrechungen symbolisieren entfernte Introns. IP = Interner Promotor.

Das Genom wird von den beiden LTRs flankiert, die 5' mit der U3-Region beginnen. Diese enthält neben den terminalen Integrationssequenzen mehrere Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (Maurer et al., 1991) und Erkennungsstellen für den transkriptionalen Transaktivator Tas (Erlwein & Rethwilm, 1993).

Nach der 5' LTR und einer kurzen Leadersequenz folgt das Gag-Gen. Es wird von der genomischen RNA translatiert. Das synthetisierte 71kD Vorläuferprotein wird teilweise am Carboxyterminus von der viralen Protease gespalten, so dass im Partikel beide Formen p71 und p68 vorliegen. Diese Spaltung ist für die Infektiosität essentiell (Enssle et al., 1997). Eine Teilung in die Komponenten MA, CA und NC wie bei anderen Retroviren findet jedoch nicht statt (Pfrepper et al., 1999). Im Gegensatz zu den meisten anderen Retroviren ist das foamyvirale Gag-Protein nicht myristiniert und enthält statt der üblichen Cys-His-Boxen drei Glycin-Arginin-reiche basische Boxen (GR-Boxen). GR1 wirkt als nukleinsäurebindende Domäne, während GR2 als NLS für die nukleäre Lokalisation des Gag-Proteins verantwortlich ist (Schliephake & Rethwilm, 1994). Das Core-Protein des Hepatitis-B Virus (HBV) interagiert ebenfalls über Glycin-Arginin-reiche Boxen mit Nukleinsäuren.

Das Pol-Gen überlappt 22nt mit dem Gag-Gen und ist im Leseraster um +1 gegenüber Gag verschoben. Pol wird wie das HBV-P-Protein anders als bei allen anderen Retroviren von einer eigenen gespleißten Pol-RNA translatiert (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996). Das 127kD-Vorläuferprotein wird im Partikel teils autokatalytisch von der viralen Protease in die Untereinheiten gespalten. Im Unterschied zu den übrigen Retroviren findet man in infizierten Zellen nur eine 80kD PR-RT- und eine 40kD IN-Untereinheit. Das aktive Zentrum der Integrase beinhaltet das übliche DD35E-Motiv. Da kein Gag-Pro-Pol-Fusionsprotein existiert, ist noch unklar, wie die Pol-Genprodukte ins Partikel gelangen.

Das Env-Protein wird wie bei anderen Retroviren von einer einfach gespleißten mRNA translatiert. Der 130kD-Vorläufer wird durch eine zelluläre Protease in die gp80 SU- und gp48 TM-Untereinheit gespalten. Wie das HBV-S enthält die TM-Untereinheit ein ER retrieval signal (Goepfert et al., 1997), das den Transport an die Zelloberfläche hemmt. Im Gegensatz zu anderen Retroviren ist die Knospung der Partikel ohne Env genauso unmöglich (Baldwin & Linial, 1998; Fischer et al., 1998) wie eine Pseudotypisierung mit heterologem Env (Pietschmann et al., 1999). Die Funktion eines

kürzlich entdeckten 170kD Env-Bet Fusionsproteins, das durch mehrfaches Spleißen entsteht, ist unbekannt (Lindemann et al., 1998).

Die zusätzlichen Leserahmen Bel-1 und Bel-2 werden unter der Kontrolle eines internen Promotors (IP) im Env-Gen transkribiert (Löchelt et al., 1993). Dies ist unter Retroviren einmalig und wird durch das Fehlen eines posttranskriptionalen Regulators, wie Rev bei HIV-1, nötig. Während der LTR-Promotor ohne Tas fast gar keine Transkription zulässt, besitzt der IP eine deutliche Basalaktivität (Yang et al., 1997).

Der transkriptionale Transaktivator Tas (36kD) wird durch das Bel-1-Gen kodiert und ist für die Replikation essentiell (Keller et al., 1991; Rethwilm et al., 1991). Er bindet sequenzspezifisch an die TREs und aktiviert sowohl den U3-Promotor der LTR als auch den internen Promotor (He et al., 1996).

Das Bet-Protein (60kD) entsteht durch Translation einer multigespleißten mRNA. Die ersten 88 AS sind Bel-1-, der Rest Bel-2-kodiert. Die Funktion des Bet-Proteins ist noch unklar. Für die Replikation *in vitro* ist es nicht essentiell. Bet-defekte Mutanten erreichen bei gleichen intrazellulären Partikelzahlen jedoch nur um etwa den Faktor 10 reduzierte extrazelluläre Virustiter (Yu & Linial, 1993). Bet wird von den Zellen in den Überstand abgegeben und stabil bet-exprimierende Zelllinien zeigten sich resistent gegen Superinfektion (Bock et al., 1998). Vermutet wird eine Funktion des Bet-Proteins für die Persistenz des Virus *in vivo* (Linial, 1999; Lecellier & Saib, 2000).

1.2.3 Replikation der Foamyviren

Der Replikationsmechanismus der Foamyviren unterscheidet sich in vielen Punkten erheblich von dem retroviraler Prototypen und ähnelt in Teilaspekten dem von Hepadnaviren und Retrotransposons.

Foamyviren besitzen keinen posttranskriptionalen Regulator. Die zeitliche Koordination der Proteinexpression wird durch das Zusammenspiel von Tas und TREs geregelt. Der IP hat eine deutliche Basalaktivität, während der U3-Promotor ohne Tas fast inaktiv ist (Yang et al., 1997). So werden IP-gesteuert zunächst Tas und Bet synthetisiert. Das TRE des IP hat eine höhere Affinität zu Tas als die TREs des U3-Promotors (Kang et al., 1998). Tas stimuliert also seine eigene Expression, bis es ausreichend vorhanden ist, um die Transkription genomischer RNA und der mRNAs für Pol und Env zu ermöglichen.

In foamyvirus-infizierten Zellen ist die große Menge linearer nichtintegrierter DNA auffällig (Schweizer et al., 1989). Diese ist von proviraler Länge und enthält eine einzelsträngige Lücke, vermutlich aufgrund der diskontinuierlichen +Strang DNA-Synthese bei zwei PPT (Kupiec et al., 1988). Weiterhin konnte in einem Teil der Viruspartikel statt RNA DNA nachgewiesen werden (Yu et al., 1996). Durch Versuche mit dem RT-Hemmer Azidothymidin konnte schließlich gezeigt werden, dass die reverse Transkription bei Foamyviren wie bei Hepadnaviren nicht früh, sondern spät im Replikationszyklus stattfindet, d.h. größtenteils vor Freisetzung der neu gebildeten Partikel (Moebes et al., 1997), und dass die so synthetisierte DNA infektiös ist (Yu et al., 1999).

Die Integration der proviralen DNA scheint bei Foamyviren mit einer asymmetrischen Prozessierung der viralen DNA einherzugehen. Während am 3'-Ende das terminale CAAT-Motiv bei Integration zu CA reduziert wird, bleiben die Nukleotide am 5'-Terminus (TGTG) vollständig erhalten. Vier Basenpaare der zellulären DNA werden verdoppelt (Enssle et al., 1999).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Foamyviren zu einem intrazellulären Replikationszyklus fähig sind. Durch die späte reverse Transkription ist es ihnen möglich, die neu entstandene virale DNA in den Zellkern zu importieren und dort als weitere Proviruskopien zu integrieren. In dieser Hinsicht verhalten sich Foamyviren wie Retrotransposons (Heinkelein et al., 2000). Dies ähnelt auch dem Replikationsmechanismus der Hepadnaviren, bei denen die intrazelluläre Replikation als Mechanismus der Persistenz benötigt wird, da Hepadnaviren im Unterschied zu Retroviren nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren (Nassal & Schaller, 1993).

Die Knospung der fertigen Partikel erfolgt im Falle von PFV-1 größtenteils intrazellulär in das ER, nur ein geringer Teil wird von der Zellmembran aus freigesetzt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Für das komplexe Retrovirus BLV konnte bereits gezeigt werden, dass eine genetische Vereinfachung und damit Replikation unabhängig von den regulatorischen Proteinen nur mit den Genen Gag, Pro, Pol und Env möglich ist. Foamyviren sind ebenfalls komplexe Retroviren, die sich jedoch in vielen Punkten von allen anderen Retroviren deutlich abgrenzen und eine funktionale Mittelstellung zwischen Retroviren, Retrotransposons und Hepadnaviren einnehmen. Die Ziele dieser Arbeit waren deshalb:

1. Konstruktion einer genetisch vereinfachten Variante des PFV-1 durch Einführung eines konstitutiv aktiven Promotors in einer hybriden LTR und Deletion der akzessorischen Gene.
2. Untersuchung der Replikationskompetenz und Stabilität der vereinfachten Viren.
3. Versuche zur Steigerung des erreichbaren Virustiters in zellfreien Kulturüberständen.
4. Analyse der Promotor-Aktivität der hybriden LTR.
5. Untersuchung der Bedeutung einer funktionsfähigen Integrase für die Replikation der vereinfachten Viren.

2 Material

2.1 Geräte und Materialien

Autoklav	Münchner Medizin Mechanik & Melag
Bakterienbrutschrank	Heraeus
Bakterienschüttler	Certomat H und R, Fa. B. Braun
Blotkammer	Institutswerkstatt
Chamberslide-Objektträger	Nunc
Einmalpipetten (5ml, 10ml)	Hartenstein
Einwegspritzen	Primo
Eismaschine	Scotsman AF 10
Elektrophoresegeräte	Consort E 455, Pharmacia LKB MultiDrive XL
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
FACScan	Becton & Dickinson
FACS-Röhrchen	Hartenstein
Feinwaage	Sartorius
Filme	Agfa, Ilford, Kodak
Filterpapier	Whatman
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Fotokamera	Nikon
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
Glasmaterial	Hartenstein
Handschuhe	Baxter
Heizblock	Thermostat 5320, Eppendorf
Kühlschrank (+4°C)	Bosch
Kunststoffmaterial	Eppendorf, Greiner, Falcon, Nunc
Laborwaage	Precisa 800 M-200 C
Magnetrührer	Flatspin 2
Mikroskop	Leitz DM IL
Mikrowelle	Space Cube 40, Phillips
Neubauerzählkammer	GLW

Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schüll
pH-Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten Weilheim
Photometer	Pharmacia
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Pipettenspitzen	Hartenstein
Quarzküvetten	Helma
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
Röntgenfilme	Fuji RX, Kodak X-Omat AR
Rotationsmischer	Heidolph
Sequenziergerät	ABI 310, Perkin Elmer
Steril-Arbeitsbank	Nuaire, Class II Type A/B3
Sterilfilter	Millipore 0,45µm
Thermocycler	Perkin Elmer Cetus
Transilluminator	MWG-Biotech
UV-Handlampe	Bachofer
Vakuumtrockner	BioRad 583
Vortex	Heidolph
Wasserbad	IKA TER 2, MGW
Well-Platten	Costar
Wippe	Edmund Bühler
Zellkulturbrutschrank	Heraeus
Zellkulturflaschen	Greiner
Zentrifugen	Eppendorf 5417C Heraeus Hettich Rotanta Sorvall RC 5B, Du Pont
Zentrifugenrotoren	Sorvall GS3, SS34

2.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von den Firmen Ferak, Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

Acrylamid Gel40

Adenosintriphosphat (ATP)

Agarose

Gibco

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)

Ammoniumpersulfat (APS)

Ampicillin

Amplify

Amersham

Aprotinin

5-Azacytidin (AZC)

Bovines Serum Albumin (BSA)

Bromphenolblau (BPB)

1-Butanol

Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)

Chloroform

Desoxynukleotide (dNTPs)

Roche-Boehringer

Dimethylformamid

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

DTT (Dithioerythritol)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Gibco

E64

EDTA

Ethanol

Ethidiumbromid

Essigsäure

Fötales Kälberserum (FCS)

Gibco

Geneticin (G418)

PAN-Systems

Glucose

Glutamin

Fluka

Glutaraldehyd	
Glycerol	Applichem
Glycin	
Hepes	
Isopropanol	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	
Kaliumferricyanid	
Kaliumferrocyanid	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	
Kristallviolett	
LB Broth-Base	Gibco
Luciferin	
Magermilchpulver	Wertkauf
Magnesiumacetat (MgOAc)	
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	
Minimal Essential Medium (MEM)	
Methanol	
β-Mercaptoethanol	
MES (2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure)	
Natriumazetat	
Natriumazid	
Natriumbutyrat	
Natriumchlorid (NaCl)	
Natriumdesoxycholat	
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	
Natriumhydroxid (NaOH)	
NP40	
Penicillin	Grünenthal

Pepstatin	
Phenol	
PMSF	
Protein-A-Sepharose	Pharmacia
Rainbow-Marker	Amersham
Rubidiumiodid	
Streptomycin	Hefa
Sucrose	
TEMED	
Tricine	
Tris	
Triton X-100	Applichem
Trypsin	Roche-Boehringer
Tween 20	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	
X-Gal	

2.3 Radiochemikalien

³⁵ S-Promix	Amersham
¹⁴ C-methylierter Proteinmarker CFA 755	Amersham

2.4 Enzyme

Calf Intestine Phosphatase (CIP)	Roche-Boehringer
Klenow-Polymerase	Roche-Boehringer
Panscript-Polymerase	PAN-Systems
Powerscript-Polymerase (Pwo)	Roche-Boehringer
Proteinase K	Roche-Boehringer

Restriktionsendonukleasen	Roche-Boehringer, MBI, NEB
RNase A	Pharmacia
T4-DNA-Ligase	MBI
T4-DNA-Polynukleotid-Kinase	NEB

2.5 Kits

AmpliTaqFS	Perkin Elmer
ECL	Amersham
Geneclean III	Bio 101
Plasmid Maxi	QIAGEN
QIAmp Tissue	QIAGEN

2.6 Nukleinsäuren

λ -DNA	Roche-Boehringer
----------------	------------------

2.7 Oligonukleotide

Oligonukleotid-Primer für präparative PCR:

#422 5'-CCA TCG ATA ATG AGT CAT GTG-3'

#423 5'-CCG CTC GAG GTG ACC ACT TTC CAG CC-3'

#424 5'-CCG CTC GAG CGA TGT ACG GGC CAG ATA TAC G-3'

#425 5'-CCA TCG ATA TGA GTA GGT TCT CGA ATC AAG TC-3'

Oligonukleotid-Primer für analytische PCR:

#10 5'- CCT CTT CCC AGA AGG G-3'

#139 5'-CTT CGA CTG GAC ATT CAC GAG-3'

#213 5'-CGG GAT CCA GTA AAA ATG TGT TAG CAC T-3'

#239 5'-GCA GAT CTT GTC TAT TGG CTT TTA TAT GC-3'

#256 5'-CGC TCT AGA GCC CCA CGT TGG GCG-3'

#534 5'-CAA GGA GGA GAG TAT TAC AGG GAA GGA-3'

Oligonukleotid-Primer für Sequenzierung:

#23 5'-CAT GGT TAC TAA GCA GCT AT-3'

#68 5'-GCA ATG CTT TCT GCA T-3'

#121 5'-TAA AAT ATT TCT TAT AAA ACC TGG AG-3'

#151 5'-CTT TAC AGC CCC TTT TAA CCT G-3'

#163 5'-GCT TTG CAG TTT CAT AG-3'

#218 5'-AGT AGT GAC ACT ATG GCC AAT GAG CCA GGA TCA-3'

#248 5'-GGG AAG AGG TTT ATG GGG-3'

#256 5'-CGC TCT AGA GCC CCA CGT TGG GCG-3'

#266 5'-GGA CTA GTG ATA GAA ATA GTA TAT A-3'

#422 5'-CCA TCG ATA ATG AGT CAT GTG-3'

#423 5'-CCG CTC GAG GTG ACC ACT TTC CAG CC-3'

#424 5'-CCG CTC GAG CGA TGT ACG GGC CAG ATA TAC G-3'

#425 5'-CCA TCG ATA TGA GTA GGT TCT CGA ATC AAG TC-3'

2.8 Plasmide

pBSKS-	Stratagene
pCEP4/bel1-SDm	(A. Rethwilm)
pcHSRV2	(Moebes et al., 1997)
pcHSRV2/M73	(Enssle et al., 1999)
pGL2-Basic	Promega
pHSRV2	(Schmidt & Rethwilm, 1995)
pLTR5luci	(Erlwein & Rethwilm, 1993)
pMH3	(M. Heinkelein)
pMH9	(M. Heinkelein)
pSP65	Promega

2.9 Seren

Als primäre Antikörper wurden folgende Kaninchenseren verwendet:

α Gag 011	Gegen das komplette Gag-Protein gerichtet (Hahn et al., 1994)
α Gag 127	Gegen das c-terminale Gag-Protein (Aguzzi, 1993)
α RH	Gegen die RNase H-Komponente des Pol-Proteins (Kögel et al., 1995)
α Tas 017	Gegen das Tas-Protein (Baunach et al., 1993)
α SU	Gegen die Surface-Untereinheit des Env-Proteins (Lindemann & Rethwilm, 1998)

Sekundäre Antikörper:

FITC swine α rabbit	Dako
POD swine α rabbit	Dako

RIPA-Präimmunserum:

Rabbitserum	Gibco
-------------	-------

2.10 Kompetente Bakterien

E. coli DH5 α

E. coli HB101

E. coli JM109

2.11 Zelllinien

BHK-21	Hamsternieren-Fibroblasten (ATCC: CRL-8303)
BHK/LTRlacZ	BHK-Zellen mit LacZ-Gen unter der Kontrolle der PFV-1-LTR (Schmidt & Rethwilm, 1995)
KMST-6	Humane Hautfibroblasten (Namba et al., 1985)

293T Humane embryonale Nierenzellen mit SV40 Large T-Antigen
(DuBridge et al., 1987)

2.12 **Lösungen, Medien und Puffer**

2.12.1 **Bakterienkultur**

5x LB-Medium

100g LB Broth-Base

25g NaCl

5g Glucose

Ad 1l A. bidest

Sterilisierung durch Autoklavieren

Ampicillin-Stocklösung

100mg/ml

1x LB-Medium mit Ampicillin

20ml 5x LB-Medium

100 l Ampicillin (100mg/ml)

Ad 100ml A. bidest

2.12.2 **Plasmidpräparation**

Lösung I

50mM Glucose

10mM EDTA pH 8,0

25mM Tris pH 8,0

Sterilisierung durch Autoklavieren

Lösung II

0,2N NaOH
1% SDS

Lösung III

3M Natriumazetat pH 5,4

Ethanol (70%)

70ml Ethanol abs.
Ad 100ml A. bidest

TE-Puffer

10mM Tris pH 7,5
1mM EDTA

2.12.3 Agarosegel-Elektrophorese

50x TAE-Puffer

242g Tris
57,1ml Essigsäure
18,6g EDTA
Ad 1l A. bidest

Ethidiumbromid-Stocklösung

10mg/ml

6x Bromphenolblau (BPB)

40g Sucrose
0,125g Bromphenolblau
1ml SDS 10%
Ad 100ml A. bidest

2.12.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Gelpuffer

3M Tris

0,3% SDS

10x Anodenpuffer

2M Tris pH 8,9

5x Kathodenpuffer

0,5M Tris pH 8,25

0,5M Tricine

0,5% SDS

2x Proteinproben-Puffer (PPP)

0,125M Tris

4% SDS

20% Glycerol

10% β -Mercaptoethanol

0,1% Bromphenolblau

2.12.5 Western Blot

Blotpuffer

5,81g Tris

2,93g Glycin

0,37g SDS

200ml Methanol

Ad 1l A.bidest

Blocklösung

10g Magermilchpulver

Ad 200ml PBS

Antikörper-Verdünnungs-Lösung

5% BSA in PBS

Waschlösung

5ml Tween 20

Ad 1l PBS

2.12.6 Radio-Immuno-Präzipitations-Assay (RIPA)

Labeling-Medium

500ml MEM (-Met/-Cys)

20ml NaHCO₃ (5,6%)

RIPA-Puffer

20mM Tris pH 7,4

0,3M NaCl

1% Natrium-Desoxycholat

1% Triton X-100

0,1% SDS

Proteaseinhibitoren

	Stocklösung	Gebrauchslösung
Aprotinin	1 mg/ml	2µg/ml
E64	1 mg/ml	10µg/ml
Na ₂ -EDTA	0,5M	0,5mg/ml
Pepstatin	700µg/ml	0,7µg/ml
PMSF	10mg/ml	170µg/ml

Waschpuffer

10mM Tris pH 7,7

0,1% NP40

Fixierlösung

45ml Methanol

10ml Essigsäure

Ad 100ml A. bidest

2.12.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Antikörper-Verdünnungs- und Waschlösung

0,1% BSA in PBS

Eindeckmedium

9ml Glycerol

1ml 1M Tris pH 8,0

2.12.8 β -Galactosidase-Färbung von BHK/LTRlacZ-Zellen

Fixierlösung

0,5% Glutaraldehyd in PBS

Färbelösung

4mM Kaliumferrocyanid (Stocklösung 400mM, vor Licht schützen)

4mM Kaliumferricyanid (Stocklösung 400mM, vor Licht schützen)

2mM MgCl₂ (Stocklösung 200mM)

0,4mg/ml X-Gal (Stocklösung 20mg/ml in Dimethylformamid, Lagerung
bei -20°C)

2.12.9 Zellkultur

MEM (Minimal Essential Medium) – 5% FCS

500ml	MEM (4,8g in 500ml A.bidest)
3,5ml	Glutamin (5%)
25ml	FCS (Komplementinaktiviert durch 30 Min. 56°C)
1,2ml	Antibiotikamix

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – 10% FCS

500ml	DMEM mit Glutamax
50ml	FCS (Komplementinaktiviert durch 30 Min. 56°C)
1,2ml	Antibiotikamix

Antibiotikamix

30mg/ml	Penicillin
50mg/ml	Streptomycin

G418 (Geneticin), Stocklösung

100mg/ml

PBS (Phosphate Buffered Saline)

8,0g	NaCl
0,2g	KCl
0,167g	CaCl ₂ x 6 H ₂ O
0,1g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
1,15g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0,2g	KH ₂ PO ₄
Ad 1l	A. bidest

ATV

8,0g NaCl
0,27g KCl
1,15g NaH₂PO₄
0,20g KH₂PO₄
0,10g MgSO₄ x 7 H₂O
1,125g Na₂-EDTA
1,25g Trypsin
Ad 1l A. bidest

2.12.10 Calciumphosphat-Transfektion

CaCl₂

2M in A. bidest (0,2µm sterilfiltriert und bei -20°C gelagert)

2x HBS

8,18g NaCl
0,2g Na₂HPO₄
5,95g Hepes
pH 7,05 bis 7,10 einstellen
Ad 500ml A. bidest
0,2µm Sterilfiltration und Lagerung bei +4°C

Natriumbutyrat

50x Stocklösung: 500mM in PBS
0,2µm Sterilfiltration und Lagerung bei +4°C

2.12.11 Kristallviolettffärbung

Färbelösung

10mg Kristallviolett

2ml Ethanol abs.

Ad 10ml A. bidest

2.12.12 Infectious Centre Assay (ICA)

Antikörper-Verdünnungs- und Waschlösung

0,1% BSA in PBS

Färbelösung

50mM Natriumazetat pH 5.0

200µg/ml 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)

0,5µl/ml H₂O₂

AEC-Stocklösung

4mg/ml in Dimethylformamid

Lagerung lichtgeschützt bei -20°C

2.12.13 Induktion mit 5-Azacytidin (AZC)

AZC-Stocklösung

244,21µg/ml (1mM)

Lichtgeschützte Lagerung bei -20°C

2.12.14 Stimulation mit Natriumbutyrat

50x Natriumbutyrat-Stocklösung

500mM in PBS

0,2µm Sterilfiltration und Lagerung bei +4°C

2.12.15 FACS-Analyse

FACS-Puffer

0,1% BSA
0,02% Natriumazid
2µg/ml Rubidiumiodid
in PBS

2.12.16 Luciferase-Assay

Lysepuffer

50mM Tris pH 7,8
50mM MES (2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure)
1mM DTT (Stocklösung 0,5M)
0,1% Triton X-100 (Stocklösung 10%)

Messpuffer

125mM Tris pH 7,8
125mM MES
25mM Mg₂OAc (Stocklösung 1M)
5mM ATP (Stocklösung 100mM)

Tris-MES-Stocklösung

1M Tris pH 7,8
1M MES

Luciferinlösung

5mM KHPO₄ pH 7,8
1mM Luciferin (M=280,33g/mol)

3 Methoden

3.1 Klonierung und Nachweis von DNA

3.1.1 Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einbringen freier DNA in Bakterienzellen. Diese müssen zuvor kompetent gemacht worden sein, d.h. sie müssen in einen Zustand versetzt worden sein, der ihnen die Aufnahme von DNA durch Zellwand und Zellmembran ermöglicht. Dies geschah im Falle der verwendeten kompetenten Escherichia coli-Stämme durch Aufnahme in CaCl₂-haltigem Medium. Kompetente Zellen müssen bei -70°C gelagert werden.

Die zu transformierenden Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zu 100µl der Bakteriensuspension wurden 100ng Plasmid-DNA oder 20µl Ligationsansatz gegeben und 20 Min. auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde durch einen 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad induziert und die Bakteriensuspension anschließend 5 Min. auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 300µl 1x LB-Medium ohne Ampicillin hinzugefügt und anschließend 30 Min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde schließlich auf Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Das Ampicillin-Resistenzgen im transformierten Plasmid ermöglichte den Bakterien das Wachstum auf der Antibiotikaplatte.

3.1.2 Präparation von Plasmiden in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Die Minipräparation dient der schnellen Aufreinigung von Plasmiden aus kleinen Bakterienkulturvolumina für eine anschließende analytische Spaltung mit Restriktionsenzymen. So kann eine große Anzahl bakterieller Klone untersucht und diejenigen identifiziert und für eine Präparation in größerem Maßstab genutzt werden, die das gewünschte Plasmid aufgenommen und vermehrt haben.

Von einer über Nacht bei 37°C bebrüteten Agarplatte mit Ampicillin wurde mit einem sterilen Zahnstocher je eine einzelne Bakterienkolonie in ein Röhrchen mit 3ml 1x LB-

Medium mit Ampicillin überimpft und das Medium über Nacht in einem Bakterienschüttler bei 37°C und 180rpm inkubiert.

Am folgenden Tag wurde 1ml der Übernachtskultur in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 5000rpm 1 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet in 100µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 100µl Lösung II erfolgte bei der 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur die alkalische Lyse der Bakterien. Hierbei werden nach Zerstörung der Zellmembranen die Proteine denaturiert und die chromosomale DNA in Einzelstränge getrennt, was bei den zirkulären Plasmiden nur partiell geschieht. Durch die Zugabe von 150µl Lösung III wurde der pH-Wert im Reaktionsansatz neutralisiert. Während die Plasmide renaturierten, konnten die nun aggregierten Proteine und chromosomalen DNA-Moleküle in der nachfolgenden Zentrifugation bei 14.000rpm während 5 bis 10 Min. abgetrennt werden. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA durch Zugabe von 1ml Ethanol abs. gefällt und durch Zentrifugation bei 14.000rpm für 10 Min. pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 500µl 70%igem Ethanol, erneuter Zentrifugation bei 14.000rpm für 15 Min. und Verwerfen des Überstandes wurde die Plasmid-DNA in 50µl TE-Puffer aufgenommen.

Der anschließende Restriktionsenzymverdau wurde in einem Gesamtansatz von 20µl mit 10µl der Plasmid-DNA-Lösung unter Zugabe von 0,4µl RNase A (20mg/ml) durchgeführt.

3.1.3 Präparation von Plasmiden in großem Maßstab (Maxipräparation)

Mit Hilfe der Maxipräparation ist es möglich, größere Mengen eines Plasmides in hohem Reinheitsgrad, z.B. für Transfektionen, zu gewinnen. Mit dem verwendeten QIAGEN Plasmid Maxi Kit ist eine Ausbeute bis zu 500µg Plasmid-DNA pro Ansatz möglich.

500ml 1x LB-Medium mit Ampicillin wurden mit 100µl Übernachtskultur einer Minipräparation inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180rpm in einem Bakterienschüttler inkubiert.

Am Folgetag wurde die Bakteriensuspension in 500ml-Zentrifugenbecher überführt und bei 6000rpm und 4°C 15 Min. zentrifugiert (Sorvall GS3-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das bakterielle Pellet in 10ml Puffer P1 mit RNase A resuspendiert.

Durch Zugabe von 10ml Puffer P2, Mischen durch mehrfaches Invertieren und Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur erfolgte die alkalische Lyse. Dann wurde der Ansatz durch Zugabe von 10ml gekühltem (4°C) Puffer P3 und Inkubation für 20 Min. auf Eis neutralisiert. Die Zelltrümmer konnten durch Zentrifugation bei 13.000rpm (Sorvall SS34-Rotor) und 4°C für 30 Min. pelletiert werden. Der plasmidhaltige Überstand wurde durch mit Gazestreifen gefüllte 1000µl-Pipettenspitzen gefiltert, um nicht pelletierte unlösliche Bestandteile abzutrennen, und auf zuvor mit 10ml Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 500-Säulen gegeben. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde zweimal mit je 30ml Puffer QC gewaschen und schließlich mit 15ml Puffer QF eluiert. Dann folgte eine Präzipitation mit 10.5ml raumtemperiertem Isopropanol und Pelletierung durch Zentrifugation bei 4000rpm und 4°C für 30 Min. in 50ml-Gefäßen. Nach dem Waschen des Pellets mit 5ml 70%igem Ethanol, Zentrifugation bei 4000rpm und 4°C für 10 Min. und Lufttrocknung des Pellets konnte die Plasmid-DNA in 1ml TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt werden.

3.1.4 Präparation von DNA aus Zellkulturen

Zur DNA-Präparation aus Zellkulturen wurde der QIAmp Tissue Kit verwendet. Die Zellen wurden mit ATV abgelöst, in ein 15ml Gefäß überführt und das Volumen mit PBS auf 15ml aufgefüllt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000rpm und 4°C wurde das Zellpellet in 200µl PBS resuspendiert und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß übertragen. Nach Zugabe von 40µl RNase A (10mg/ml) und 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden 25µl Proteinase K-Lösung (20mg/ml) sowie 200µl Puffer AL hinzugegeben, der Ansatz durch Vortexen gemischt und über Nacht bei 56°C im Wasserbad gehalten. Am Folgetag wurde nach Zugabe von 210µl Ethanol abs. das gesamte Volumen auf die im Kit enthaltenen Säulen gegeben und diese bei 13.000rpm eine Minute zentrifugiert, um die Flüssigkeit durch die Säulenmatrix zu treiben. Die Säulen wurden dann zweimal mit 500µl Puffer AW gewaschen und 2 Min. bei 13.000rpm trocken zentrifugiert. Die Elution der DNA aus der Säulenmatrix erfolgte durch Zugabe von 100µl A. bidest, Inkubation für 3 Min. bei 72°C im Wasserbad, Zentrifugation für 1 Min. bei 13.000rpm und erneute Zugabe von 100µl A. bidest mit nachfolgender Zentrifugation.

3.1.5 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Das Prinzip der photometrischen Konzentrations-Bestimmung von Nukleinsäuren beruht auf der konzentrationsabhängigen Extinktion spezifischer Wellenlängen im UV-Bereich beim Durchtritt eines Lichtstrahles durch die Lösung.

Die zu vermessende DNA wurde in einer Quarzglasküvette mit A. bidest im Verhältnis 1:100 auf 300µl Endvolumen verdünnt. Als Referenzprobe wurde eine Küvette mit 300µl A. bidest verwendet. Aus der im Photometer gemessenen optischen Dichte bei 260nm Wellenlänge (OD_{260}) konnte mittels folgender Formel, die sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ableitet, die Konzentration der DNA bestimmt werden:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = OD_{260} \times V \times F \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} c = \text{Konzentration} \\ V = \text{Verdünnungsfaktor} \\ F = \text{Multiplikations-Koeffizient} \\ \text{(dsDNA: 50}\mu\text{g/ml)} \end{array}$$

Der Reinheitsgrad der DNA-Lösung wurde mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte sprechen für eine Kontamination mit anderen Substanzen, z.B. Proteinen.

3.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986) ermöglicht die Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnittes. Dieser wird durch spezifische, an die flankierenden Regionen des zu amplifizierenden Bereichs bindende Oligonukleotid-Primer in Sense- und Antisense-Orientierung von 20 bis 30 Nukleotiden Länge definiert.

Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Während der Denaturierung bei 94°C werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt. Der nachfolgende Annealing-Schritt bei 50°C bis 55°C ermöglicht die Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an das DNA-Template. Bei 72°C erfolgt schließlich von den gebundenen Primern aus mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase die Elongation eines zum

Template-Strang komplementären, neusynthetisierten DNA-Stranges. Mit jedem Zyklus wird so die Menge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes verdoppelt.

Die PCRs wurden in 0,5ml-Reaktionsgefäßen als analytischer Ansatz mit Panscript-Polymerase (Pan) oder als präparativer Ansatz mit Powerscript-Polymerase (Pwo, mit Proofreading-Aktivität) durchgeführt:

	Präparativer Ansatz	Analytischer Ansatz
Template	100ng Plasmid-DNA	100ng Plasmid-DNA bzw. 500ng Zellkultur-DNA
Primer, sense	30pmol	20pmol
Primer, antisense	30pmol	20pmol
dNTPs (10mM)	2µl	2µl
Puffer (10x)	10µl	5µl
MgCl ₂ (50mM)	-	2µl
Polymerase	5u Pwo	5u Pan
A. bidest	Ad 100µl Endvolumen	Ad 50µl Endvolumen

Bei der Verwendung von Thermocyclern mit ungeheiztem Deckel wurde der Ansatz noch mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Falls nicht anders erwähnt, wurden als Standardprogramm 35 Zyklen mit je 30 Sek. 94°C, 1 Min. 50°C und 2 Min. 72°C gewählt.

3.1.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die spezifische palindromische DNA-Sequenzen erkennen und spalten.

Für analytische Spaltungen wurden 0,2 bis 1,0µg DNA in 20µl Endvolumen verwendet, für präparative Spaltungen 5 bis 10µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 30-50µl. Die Reaktionen wurden mit Pufferlösungen nach Herstellerangabe und, falls nötig, unter Zugabe von 0,01 Volumenanteilen BSA durchgeführt. Das jeweilige Enzym wurde, um unvollständige Spaltung zu verhindern, im 2- bis 5-fachen Überschuss zugegen und bei der empfohlenen Reaktionstemperatur 2 bis 16 Stunden inkubiert.

3.1.8 Klenow-Reaktion

Klenow-Polymerase wurde verwendet, um den komplementären Strang zu überhängenden 5'-DNA-Enden, wie sie nach Spaltung mit Restriktionsenzymen entstehen, aufzufüllen. So entstehen aus Enden mit 5'-Überhang glatte Enden (blunt ends).

Dem Restriktionsverdau wurde Folgendes zugegeben:

5µl	Puffer NEB 4 (10x)
0,5µl	BSA
2µl	dNTPs (10mM)
1µl	Klenow-Enzym (8u)

Ad 50 µl A. bidest

Der Reaktionsansatz wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert. Hinterher wurde die DNA über Phenol-Chloroform-Extraktion mit nachfolgender Ethanol-Präzipitation wieder gereinigt.

3.1.9 Dephosphorylierung von 5'-Enden

T4-Ligase benötigt zum Verknüpfen von DNA-Fragmenten phosphorylierte 5'-Enden. Damit es bei dem Versuch, ein DNA-Fragment in einen linearisierten Plasmid-Vektor zu inserieren, nicht zur Selbstligation der freien Enden des Plasmid-Vektors kommt, wurden diese zuvor mit Kälberdarm-Phosphatase (CIP, Calf Intestine Phosphatase) dephosphoryliert.

Dem Restriktionsverdau wurde zugegeben:

5 µl	Puffer NEB 4 (10x)
1 µl	CIP (20u/µl)

Ad 50 µl A. bidest

Der Reaktionsansatz wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert.

3.1.10 Phosphorylierung von 5'-Enden

Da T4-Ligase nur phosphorylierte 5'-DNA-Enden verknüpfen kann, wurden PCR-Fragmente vor einer Blunt-end-Klonierung mittels T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) behandelt.

Die PCR-Fragmente wurden zunächst mit dem GeneClean III Kit (Bio 101) aufgereinigt. Dazu wurde zu den PCR-Fragmenten das 3-fache Volumen NaI-Lösung und 5µl Glasmilchsuspension gegeben und 10 Min. auf Eis inkubiert. Die weitere

Aufreinigung entsprach der Methode zur Elution von DNA aus Agarosegelen (3.1.15). Die so gereinigten PCR-Fragmente wurden in 25µl A. bidest aufgenommen und folgender Reaktionsansatz pipettiert:

25µl PCR-Fragment
3 µl Kinasepuffer (10x)
1 µl ATP (10mM)
1 µl PNK (10u/µl)

Die Reaktion erfolgte bei 37°C über 30 Min.

3.1.11 Ligation von DNA-Molekülen

T4-Ligase ist in der Lage, freie phosphorylierte 5'-DNA-Enden mit 3'-DNA-Enden zu verbinden. Dabei entsteht unter ATP-Verbrauch und Einbeziehung der 5'-Phosphatgruppe sowie der Hydroxylgruppe am 3'-Ende der DNA eine Phosphodiesterbindung. Als Vektor-DNA dient ein linearisiertes dephosphoryliertes Plasmid, das ein Ampicillin-Resistenzgen trägt.

Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

ca. 100 ng Vektor-DNA
3- bis 10-facher molarer Überschuss Insert-DNA
2µl Ligase-Puffer
1µl T4-DNA-Ligase (1u/µl)
Ad 20µl A. bidest

Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

3.1.12 Ethanol-Präzipitation

Mit der Ethanol-Präzipitation ist es möglich, DNA-Lösungen von Salzen zu reinigen, z.B. zwischen Spaltungen mit zwei Restriktionsenzymen, die in verschiedenen Puffern aktiv sind. Auch ein Aufkonzentrieren von DNA ist möglich, wenn diese nach der Fällung in einem geringeren Volumen wieder aufgenommen wird.

Der DNA-Lösung wurden 0,1 Vol. 3M Natriumacetat pH 5.8 und 2,5 Vol. Ethanol abzugeben. Dabei präzipitiert die DNA durch Entzug der Hydrathülle. Bei kleinen DNA-Fragmenten (bis wenige hundert Basenpaare) wurde zusätzlich 1 l (10mg/ml) Glykogen hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation bei 14.000rpm für 10 Min. erfolgte ein Waschen des Pellets mit 500µl 70%igem Ethanol. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 14.000rpm für 10 Min. konnte das Pellet bei 37°C für 10 Min.

luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen A. bidest oder TE-Puffer aufgenommen werden.

3.1.13 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde benutzt, um DNA-Lösungen von Proteinen zu reinigen. So können z.B. vorher zugegebene Enzyme inaktiviert und entfernt werden. Zu der zu reinigenden DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen Phenol gegeben und der Ansatz gründlich durch Invertieren gemischt. Nach Zentrifugation bei 14.000rpm für 30 Sek. wurde die DNA enthaltende obere wässrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform vermischt. Nach Zentrifugation bei 14.000rpm für 30 Sek. wurde erneut die obere wässrige Phase mit der DNA abgenommen und einer Ethanol-Präzipitation unterzogen.

3.1.14 Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente können der Molekülgröße nach, bedingt durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, auf einem Agarosegel aufgetrennt werden. Je höher dabei die Agarose im Gel konzentriert ist, umso mehr verschiebt sich der optimale Trennbereich in Richtung kleinerer DNA-Fragmente. Die DNA wird mit Ethidiumbromid gefärbt, das zwischen die DNA-Stränge interkaliert und bei Anregung durch UV-Licht (254 oder 365nm) die Nukleinsäure als fluoreszierende Banden sichtbar macht.

Je nach benötigtem Trennbereich wurden 0,8 bis 2,0g Agarose in 100ml TAE-Puffer gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Es folgte die Zugabe von 3µl Ethidiumbromid (1mg/ml). Nach Abkühlung auf ca. 50°C konnte die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen werden. Das erstarrte Gel wurde in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer versenkt und die in 1x BPB aufgenommene DNA aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Potentialdifferenz von 60 - 120V. Als Größenmarker diente HindIII-gespaltene λ-Phagen-DNA und HpaII-gespaltene pSP65. Die DNA-Banden wurden entweder auf einem Transilluminator oder, im Falle einer präparativen Elektrophorese, mit einer UV-Handlampe, die Strahlung geringerer Intensität emittiert, sichtbar gemacht.

3.1.15 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem GeneClean III Kit (Bio 101). Die DNA-Fragmente wurden mit einer UV-Handlampe (254 bzw. 365nm) sichtbar gemacht, die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1ml NaI-Lösung wurden die Agarosegel-Stücke durch 10-minütige Inkubation bei 56°C geschmolzen. Nach dem Hinzufügen von 5µl Glasmilchsuspension erfolgte die Bindung der DNA an die Glaskügelchen über 10 Min. auf Eis. Die Glasmilch wurde durch Zentrifugieren bei 8.000rpm für 1 Min. pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal durch Resuspendierung in 500µl New-Wash-Puffer mittels Vortex und erneute Zentrifugation gewaschen. Nach Verwerfen des letzten Überstandes wurde die Glasmilch in 30µl A. bidest oder TE-Puffer resuspendiert und 5 Min. bei 56°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Glasmilch für 1 Min. bei 14.000rpm konnte nun der DNA-haltige Überstand abgenommen werden.

3.1.16 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten mit dem AmpliTagFS-System und wurden auf einem ABI 310 (Perkin Elmer) automatisch ausgewertet. Grundlage ist dabei die Methode des stochastischen Kettenabbruchs nach Sanger (Sanger et al., 1977), hier unter Verwendung fluorochrom-markierter Didesoxynukleotide.

Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wurde zunächst durch eine azyklische PCR mit einem Primer amplifiziert.

Reaktionsansatz im 500µl-Gefäß:	500 ng DNA
	25 ng Primer
	0,5 µl DMSO
	Ad 7,5 µl A. bidest
	2,5 µl Tag-Seq-Mix

Der Reaktionsansatz wurde bei Verwendung von Thermocyclern mit ungeheiztem Deckel mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und durchlief 35 Wiederholungen mit je 30 Sek. 96°C, 15 Sek. 50°C und 4 Min. 60°C.

Der Ansatz wurde in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und wie folgt ergänzt:

10µl PCR-Ansatz
90µl A. bidest
10µl 3M Natriumacetat pH 5.8
250µl Ethanol abs.

Nach Durchmischen der Lösung konnte die DNA durch Zentrifugation bei 14.000rpm für 20 Min. pelletiert, zweifach mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in 15µl TSR aufgenommen werden. Die DNA in TSR wurde durch 2-minütige Inkubation bei 94°C im Wasserbad denaturiert, in ein Sequenziergefäß überführt und bis zur automatischen Analyse bei 4°C gelagert.

3.2 Nachweis von Proteinen

3.2.1 Herstellung von Zellysaten für Western Blot

Zur Gewinnung von Lysaten aus transfizierten Zellkulturen wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen auf Trockeneis gefroren und anschließend bei 37°C wieder getaut. Die durch diesen Einfrier-Auftau-Schritt aufgebrochenen Zellen wurden in 200µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. 20µl dieses Lysates wurden mit 20µl 2x PPP versetzt und für 3 Min. bei 95°C im Wasserbad denaturiert, anschließend auf Eis gehalten. Durch Vortexen und damit Scheren der hochmolekularen Nukleinsäuren wurde die Viskosität vermindert. Die Proben wurden baldmöglichst auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -70°C gelagert.

Bei der Herstellung von Lysaten aus infizierten Zellen wurden diese zunächst mit ATV abgelöst und die Zellsuspension in einem 15ml-Gefäß mit PBS auf ein Volumen von 10ml aufgefüllt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000rpm wurde das Zellpellet in 10ml PBS gewaschen und nach erneutem Abzentrifugieren in 100µl PBS resuspendiert. Infektiöse Viruspartikel wurden 10 Min. bei 72°C im Wasserbad inaktiviert. 20µl der Suspension wurden mit 20µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren versetzt und nach

Zugabe von 40µl 2x PPP 3 Min. bei 95°C im Wasserbad denaturiert, anschließend auf Eis gehalten. Nach Verminderung der Viskosität durch Vortexen wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -70°C eingefroren.

3.2.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Es wurde eine modifizierte Tricine-SDS-Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow (Schägger & von Jagow, 1987) verwendet, um Proteine bis 130kD aufzutrennen.

Die zwei Gelkomponenten wurden nach folgendem Schema hergestellt, APS und TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gießen zugefügt:

	Sammelgel (4%)	Trenngel (7,5%)
Gel 40	2ml	3,75ml
Gelpuffer	5ml	6,6ml
Glycerol		2,2ml
A. bidest	13ml	7,5ml
APS (10%)	200µl	200µl
TEMED	20µl	20µl

Zunächst wurde das Trenngel bis zu 80% der Endhöhe des Gesamtgels gegossen, mit wassergesättigtem 1-Butanol überschichtet, um eine saubere obere Kante zu erhalten, und die Polymerisierung abgewartet. Das 1-Butanol wurde abgekippt und die Gelkante mit A. bidest gewaschen. Schließlich wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Geltaschenkamm eingeführt. Nach der Polymerisierung wurde die obere Kammer der Gelapparatur mit Kathodenpuffer, die untere mit Anodenpuffer gefüllt und der Geltaschenkamm entfernt. Die Sammelgeltaschen wurden mit Kathodenpuffer gespült bevor je 80µl der gebrauchsfertigen Proben und 5µl Rainbow-Marker als Größenstandard aufgetragen werden konnten. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei einem Stromfluss von 35mA.

3.2.3 Western Blot

Beim Western Blot (Towbin et al., 1979) werden die Proteinproben zunächst entsprechend ihrer Größe durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt, um dann auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen zu werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Blotten. Auf der Membran kann ein erster spezifischer Antikörper das nachzuweisende Protein erkennen. Ein zweiter Antikörper, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet und mit Peroxidase gekoppelt ist kann nun an den Komplex binden und diesen markieren. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde der ECL-Kit verwendet, bei dem durch die peroxidase-vermittelte Oxidation von Luminol Licht emittiert wird, das auf einem Röntgenfilm nach Entwicklung eine sichtbare Schwärzung hinterlässt.

Zum Blotten wurden auf die Kathodenplatte der Blotapparatur 3 Lagen mit Blotpuffer angefeuchtetes Filterpapier, die ebenfalls blotpufferfeuchte Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und wieder zwei Lagen blotpufferfeuchtes Filterpapier luftblasenfrei aufgebracht. Dann wurde die Anodenplatte aufgesetzt und 90 Min. bei einem Stromfluss von 150mA geblottet.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran auf einer Wippe 1 Stunde bei Raumtemperatur in 100ml Blocklösung geschwenkt. Der erste Antikörper wurde in 10ml PBS - 5% Albumin verdünnt (Verdünnungsfaktor je nach Antikörper) und die Membran 1 Std. auf der Wippe damit inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend dreimal 5 Min. in Waschlösung geschwenkt. Nach Zugabe des 1:1000 in 15ml PBS - 5% Albumin verdünnten 2. Antikörpers erfolgte eine weitere Inkubation für 1 Std. auf der Wippe, gefolgt von drei weiteren Waschschritten à 5 Min.

Für die Fotoreaktion wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet und auf eine Glasplatte gelegt. Je 1ml der ECL-Lösungen I und II wurden vermischt und auf der Membran verteilt. Nach einer Einwirkzeit von 1 Min. wurde die überschüssige Flüssigkeit durch Auflegen der Membran auf ein Filterpapier abgesaugt, die Membran auf eine Glasplatte gelegt und mit Klarsichtfolie überzogen. Die Lichtreaktion wurde durch Exposition eines Röntgenfilms für 15 Sek. bis 5 Min. dokumentiert.

3.2.4 Radio-Immuno-Präzipitations-Assay (RIPA)

Beim hier verwendeten Radio-Immuno-Präzipitations-Assay werden zunächst die mit ^{35}S Schwefel radioaktiv markierten Aminosäuren Methionin und Cystein von den Zellkulturen verstoffwechselt und zur Proteinsynthese genutzt. Nach der Lyse der Zellen erfolgt die Präzipitation unspezifischer Bindungswerten mit einem Präimmunsereum, bevor mit einem spezifischen zweiten Antikörper das nachzuweisende Protein angereichert wird. Mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird das Proteingemisch aufgetrennt und durch Exposition eines Röntgenfilms das Bandenmuster dokumentiert.

Die zu markierenden Zellkulturen wurden am ersten Tag in 6-Well Platten (7×10^5 Zellen pro Well) ausgesät und am Folgetag mit je $5 \mu\text{g}$ DNA transfiziert. Am Tag 3 erfolgte die Stimulation mit Natriumbutyrat. Nach 8 Std. wurde das Medium abgenommen, die Zellkulturen mit Labeling-Medium gewaschen, je 1ml Labeling-Medium und $7 \mu\text{l}$ ($100 \mu\text{Ci}$) ^{35}S -Promix zugegen und über Nacht im Zellkultur-Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit je $200 \mu\text{l}$ eiskaltem RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren während 10 Min. lysiert. Die Lysate wurden in $1,5 \text{ml}$ Snapcap-Gefäße überführt und die hochmolekularen Nukleinsäuren durch Vortexen geschert.

Zum Vorpräzipitieren wurde den Lysaten $4 \mu\text{l}$ Präimmunsereum zugegeben und die Ansätze bei 4°C 2 Std. in einem Rotationsmischer inkubiert. Währenddessen wurden je Ansatz 20mg Protein-A-Sepharose in 15ml RIPA-Puffer über 30 Min. hydriert und nach Pelletierung durch 5-minütige Zentrifugation bei 2.000rpm in einer geeigneten Menge RIPA-Puffer (Endkonzentration der Protein-A-Sepharose $0,1 \text{mg}/\mu\text{l}$) resuspendiert. Nach Ablauf der 2-stündigen Vorpräzipitation wurde den Ansätzen je $100 \mu\text{l}$ Protein-A-Sepharose ($0,1 \text{mg}/\mu\text{l}$) in RIPA-Puffer zugegeben. Nach einer weiteren Stunde bei 4°C im Rotationsmischer wurden die gebildeten Antigen-Antikörper-Sepharose-Komplexe durch Zentrifugation für 2 Min. bei 13.000rpm und 4°C pelletiert und der Überstand in ein neues $1,5 \text{ml}$ Snapcap-Gefäß überführt.

Für die Immunpräzipitation wurde dem Überstand $5 \mu\text{l}$ spezifisches Immunsereum zugegeben und bei 4°C 2 Std. im Rotationsmischer inkubiert. Nach Zugabe von je

100µl hydrierter Protein-A-Sepharose (0,1mg/µl) in RIPA-Puffer und erneuter einstündiger Inkubation bei 4°C unter Durchmischung wurden die Antigen-Antikörper-Sepharose-Komplexe wie oben pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1ml RIPA-Puffer aufgenommen, durch Invertieren resuspendiert und bei 13.000rpm 3 Min. abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal mit 1ml RIPA-Puffer und einmal mit 1ml Waschpuffer durchgeführt, bevor das Pellet schließlich in 50µl 2x PPP aufgenommen wurde.

Vor der Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit einem 7,5%igen Trenngel (siehe 3.2.2) wurden die Proben 3 Min. bei 95°C im Wasserbad denaturiert und anschließend bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gehalten. Als Größenstandard wurden 5µl eines ¹⁴C-methylierten Proteinmarkers verwendet. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 35mA.

Am Folgetag wurde das Gel erst 30 Min. in Fixierungslösung, dann 30 Min. in Amplify-Lösung inkubiert, bevor es in einem Vakuumtrockner 2 Std. bei 80°C und langsam ansteigendem Temperaturprofil dehydriert wurde. Anschließend wurde mit dem getrockneten Gel ein Röntgenfilm bei -80°C exponiert. Die Expositionszeit variierte je nach Intensität der radioaktiven Strahlung zwischen mehreren Min. und Tagen.

3.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit der indirekten Immunfluoreszenz gelingt der optische Nachweis von Proteinen in situ in Zellkulturen. Die Zellen werden zunächst fixiert und die Zellmembranen permeabilisiert. Ein erster spezifischer Antikörper bindet an das nachzuweisende Protein und wird wiederum von einem zweiten Antikörper erkannt, der einen Fluoreszenzmarker, hier FITC, trägt.

Die zu untersuchenden Zellkulturen wurde mit ATV abgelöst, eine der Fläche entsprechende Menge in 300µl Zellkulturmedium je Napf auf Chamberslide-Objektträger ausgesät und im Zellkulturschrank inkubiert. Nach zwei Tagen wurde das Medium abgenommen, die Kulturen mit 300µl PBS je Napf gespült und in eiskaltem Methanol bei -20°C 30 Min. fixiert.

Nach kurzer Trocknung der Objektträger wurde der Zellkulturaufsatz entfernt und mit je 100µl des spezifischen, 1:200 in PBS - 0,1% BSA verdünnten Antikörpers bei 37°C

1 Std. in einer feuchten Kammer inkubiert. Der spezifische Antikörper wurde abgeschüttelt, die Objektträger kurz mit PBS - 0,1% BSA gespült und dreimal 10 Min. bei Raumtemperatur mit PBS - 0,1% BSA in einer Hellendahl-Küvette auf einem Magnetrührer gewaschen.

Der FITC-markierte sekundäre Antikörper wurde 1:500 in PBS - 0,1% BSA verdünnt und die Objektträger mit 100µl je Napf bei 37°C 1 Std. in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneuten Waschschritten, wie zuvor beschrieben, wurden die Objektträger kurz getrocknet, die Gummibegrenzung der Näpfe abgezogen, einige Tropfen Eindeckmedium aufgetragen und das Deckglas luftblasenfrei aufgelegt.

Die Fotoemission des FITC wurde durch UV-Licht mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes angeregt und ausgewertet.

3.2.6 Nachweis der Tas-Funktion mit BHK/LTRlacZ-Zellen

BHK/LTRlacZ-Zellen (Schmidt & Rethwilm, 1995) sind Indikatorzellen, die ein LacZ-Gen unter der Kontrolle der transaktivator-abhängigen PFV-1-LTR besitzen. Wird eine solche Zelle mit PFV-1 infiziert, ermöglicht der virale Transaktivator Tas durch Interaktion mit der PFV-LTR die Expression von β -Galaktosidase. Die betreffende Zelle lässt sich nach Fixierung und Substratzugabe blau anfärben.

BHK/LTRlacZ-Zellen wurden zur Titrierung PFV-haltiger Zellkulturüberstände entwickelt, in der vorliegenden Arbeit wurden sie zum Nachweis der Tas-Funktion in einem Kokultivierungsassay genutzt. Bei der Kokultivierung gebildete Synzytien aus BHK/LTRlacZ- und infizierten KMST-6-Zellen sollten sich bei Anwesenheit von funktionsfähigem Tas blau anfärben lassen.

Dazu wurden 10% der zu untersuchenden KMST-Zellen einer konfluenten T25-Zellkulturflasche zusammen mit 5×10^4 BHK/LTRlacZ-Zellen je Well einer 12-Well-Platte kultiviert. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 1ml PBS gewaschen und 10 Min. mit 1ml Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1ml PBS wurde 1ml der frisch angesetzten Färbelösung zugegeben und 4 Std bei 37°C auf dem Zellrasen belassen.

3.3 Zellkultur, Virusanzucht und –Quantifizierung

3.3.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an Steril-Arbeitsbänken durchgeführt und die Zellen in Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in Zellkultur-Brutschränken gehalten. Je nach Zelllinie wurden folgende Kulturmedien verwendet:

BHK-21	MEM + 5% FCS
BHK/LTRlacZ	MEM + 5% FCS mit G418 (1,0mg/ml)
KMST-6	DMEM + 10% FCS
293T	DMEM + 10% FCS

Wenn sich die Zellen bis zur Konfluenz vermehrt hatten, wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gespült. Durch ATV-Zugabe und 5-minütige Inkubation im Zellkultur-Brutschrank wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Nach Verdünnung in Kulturmedium wurde 80 - 95% der Zellsuspension verworfen und das Volumen mit neuem Medium aufgefüllt.

3.3.2 Transfektion mit Calciumphosphat (CaPO₄)

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von DNA in eukaryote Zellen. Bei der Calciumphosphat-Methode bildet sich ein CaPO₄-DNA-Präzipitāt, das sich auf dem Zellrasen niederschlägt und von den Zellen aufgenommen wird.

Wenn nicht anders angegeben, wurden am ersten Tag 2 - 3x10⁶ Zellen in 6cm-Schalen ausgesät. Am Folgetag wurden zunächst die benötigten Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt und eine Stunde vor Transfektion das Zellkulturmedium erneuert, bevor der Transfektionsmix angesetzt wurde:

10 µg	DNA
62 µl	2M CaCl ₂
Ad 500 µl	A. bidest

Langsames Dazutropfen von 500 µl 2x HBS

Der Ansatz wurde mehrfach durch Invertieren gemischt, 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich in kreisenden Bewegungen gleichmäßig auf die Zellkultur aufgebracht. Nach 8 Stunden Inkubation im Zellkultur-Brutschrank wurde das Kulturmedium erneut gewechselt.

Wurden 293T-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die Proteine unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, erfolgte am 3. Tag eine Induktion der Proteinsynthese durch Zugabe von Kulturmedium mit 10mM Natriumbutyrat, das nach 8 Std. wieder abgenommen wurde.

3.3.3 Gewinnung zellfreier Virusüberstände

Zur Herstellung von Virusüberständen transfizierter Zellen wurden die Zellkulturen einen Tag nach Natriumbutyrat-Induktion auf Trockeneis gefroren und anschließend bei 37°C wieder getaut. Dieses thermische Aufbrechen der Zellen sollte über die Freisetzung intrazellulärer Viruspartikel eine Erhöhung des Virustiters im Überstand bewirken. Die so behandelten Zellen lösten sich spontan ab bzw. ließen sich leicht abspülen. Die Suspension wurde in ein 15ml-Reaktionsgefäß gegeben und die Zelltrümmer 10 Min. bei 1000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine 5 bzw. 10ml Einwegspritze gefüllt und durch einen Sterilfilter mit 0,45µm Porengröße gepresst. Die so gewonnenen zellfreien Virusüberstände wurden bei -80°C gelagert oder gleich zur Infektion von Zielzellen verwendet.

Die Gewinnung zellfreier Überstände von infizierten Langzeit-Kulturen erfolgte ohne Einfrier-Auftau-Schritt durch Abnahme des Zellkulturmediums und nachfolgende Sterilfiltration.

3.3.4 Infektion von Zielzellen

Als Zielzellen für Infektions-Versuche zum Nachweis der Infektiosität und Replikationskompetenz der Konstrukte wurden KMST-6-Zellen verwendet. Pro T25-Zellkulturflasche wurden 10^4 KMST-6-Zellen ausgesät und deren Absetzen abgewartet. Dann wurde 3ml zellfreier Virusüberstand zum Kulturmedium hinzugegeben und die Zellen im Zellkultur-Brutschrank weiter kultiviert. Um lytisch infizierte Zellkolonien längere Zeit halten zu können, wurden bei Bedarf frische, nicht infizierte Zellen zugegeben.

3.3.5 Zellfärbung mit Kristallviolett

Um den optischen Kontrast für die fotografische Dokumentation zu steigern, wurden Zellkulturen mit Kristallviolett gefärbt.

Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, der Zellrasen mit Färbelösung überschichtet und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen der Flüssigkeit und Lufttrocknung konnten die Zellkulturen fotografiert werden.

3.3.6 Virustitration mittels Infectious Centre Assay (ICA)

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

In eine 48-Well-Platte wurden 5×10^5 BHK-21-Zellen je Well ausgesät und nach Absetzen der Zellen mit dem zu titrierenden Überstand in Verdünnungsstufen von 10^0 bis 10^{-5} infiziert. Nach 24 Std. erfolgte ein Mediumwechsel. Am vierten Tag p.i. wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit 0,5ml PBS – 0,1% BSA je Napf gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol bei -20°C 30 Min. fixiert.

Der spezifische Antikörper $\alpha\text{Gag 011}$ wurde 1:200 in PBS – 0,1% BSA verdünnt. Zu jedem Napf der 48-Well-Platte wurden 100 μl der Antikörper-Verdünnung gegeben und 45 Min. bei 37°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit 0,5ml PBS – 0,1% BSA für je 5 Min. auf einer Wippe. Der sekundäre peroxidase-gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls 1:200 in PBS – 0,1% BSA verdünnt und je 100 μl pro Napf für eine 45-minütige Inkubation bei 37°C verwendet. Nach weiteren 3 Waschschrten wie zuvor wurde 0,5ml der frisch angesetzten Färbelösung pro Napf zugegeben und die Reaktion 30 Min. in Dunkelheit gehalten. Nach Abnehmen der Färbelösung und einmaligem Spülen mit A. bidest wurden die Platten getrocknet und bei 4°C gelagert bzw. unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

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

3.3.7 Induktion mit 5-Azacytidin (AZC)

Um den Einfluss von 5-Azacytidin auf die Aktivität der rekombinanten LTR zu untersuchen, wurden infizierte KMST-6-Zellen nach dem Splitten in einer der Kulturfläche entsprechenden Menge parallel in je 2 Näpfe einer 12-well-Platten ausgesät. Je einer von beiden Ansätzen wurde dabei in Zellkulturmedium mit 4 μ M AZC gehalten. 24 Std. später erfolgte ein Mediumwechsel, jeweils mit bzw. ohne Zugabe von AZC. 72 Std. nach der ersten Zugabe von AZC wurden zellfreie Virusüberstände präpariert und mittels Infectious Centre Assay die Anzahl infektiöser Viruspartikel im Überstand als Maß für die Aktivität der rekombinanten LTR bestimmt.

3.3.8 Stimulation der rekombinanten LTR mit Natriumbutyrat

Die Stimulierbarkeit des CMV-Promotors durch Natriumbutyrat im Kontext der rekombinanten LTR wurde durch Analyse der Expression des Gag-Proteins im Western Blot untersucht.

Konfluente KMST-6-Zellen wurden mit ATV abgelöst und 1:3 verdünnt auf 6-Well-Platten ausgesät. Jeweils eine von zwei parallel in gleicher Dichte ausgesäten Zellkulturen wurde am Folgetag 7 Std. in Medium mit 10mM Natriumbutyrat inkubiert bevor anschließend bei allen Kulturen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. 24 Std. später wurden Zelllysate für eine vergleichende Analyse im Western Blot hergestellt.

3.3.9 Freisetzung intrazellulärer Viren durch Einfrieren und Auftauen

Von lytisch infizierten Zellkulturen wurde der Überstand (5ml) abgenommen, in eine Einmalspritze gegeben und durch einen 0,45 μ m Sterilfilter gepresst. Die Titration erfolgt mittels ICA.

Der verbleibende Zellrasen wurde mit ATV abgelöst, die Zellsuspension in ein 15ml-Gefäß überführt und das Volumen mit PBS auf 5ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden dreimal auf Trockeneis eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Die Suspension der auf diese Weise thermisch aufgebrochenen Zellen wurde 10 Min. bei 1000rpm zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde wie der Zellkulturüberstand sterilfiltriert und titriert.

3.3.10 FACS-Analyse

Die Expression des Reportergens GFP wurde automatisiert mit einem FACScan-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter) ausgewertet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit ATV abgelöst und ein Teil der Zellsuspension in einem 15ml-Gefäß mit PBS auf ein Volumen von 10ml aufgefüllt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000rpm wurde das Zellpellet in 10ml PBS gewaschen und nach erneutem Abzentrifugieren in 1ml FACS-Puffer resuspendiert.

Die durch Analyse mit dem FACScan erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Softwarepakete Lysis II und CellQuest ausgewertet.

3.4 Luciferase-Assay zur Analyse der Promotor-Aktivität

Das Enzym Luciferase lässt in der Natur die Glühwürmchen leuchten. Auch in vitro katalysiert das Protein eine Licht emitierende Reaktion, wenn unter entsprechenden Bedingungen das Substrat Luciferin und als Cosubstrat ATP angeboten werden. Die Stärke der Lichtreaktion kann dabei quantifiziert werden und lässt so Rückschlüsse auf die Menge der in einer Zellkultur synthetisierten Luciferase und damit auf die Aktivität des Promotors, der diese Expression kontrolliert, zu (Gould & Subramani, 1988).

Je Napf einer 6-Well-Platte wurden 8×10^5 293T-Zellen ausgesät. Am Folgetag wurden je 5µg der Luciferase-Expressions-Plasmide zusammen mit 5µg eines Tas-Expressions-Plasmides bzw. eines tas-negativen Kontrollplasmides mit der Calciumphosphat-Methode kotransfiziert. Die verwendeten DNA-Konstrukte sind im Ergebnisteil näher erläutert.

48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellkulturen einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von je 200µl frisch angesetztem Lysepuffer mit einem Kunststoffspatel mechanisch vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt. Die Suspension wurde in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Vortexen homogenisiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 14.000rpm pelletiert und der Überstand in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt.

Für die Quantifizierung der Lichtreaktion wurde ein Berthold Mikrolumat Luminometer verwendet. Kurz vor der Messung wurden der Messpuffer und die Luciferin-Lösung

frisch angesetzt und für jede zu vermessende Probe 50µl des Messpuffers in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Luciferin-Lösung wurde in das Gerät gegeben, wo sie später zum Start der Reaktion automatisch zu den Proben injiziert wurde. Unmittelbar vor der Messung wurden je 50µl einer 1:50 Verdünnung der Zelllysate zu dem vorgelegten Messpuffer in die Mikrotiterplatte gegeben, diese in das Gerät eingesetzt und der Messvorgang automatisiert durchgeführt. Die Messergebnisse wurden in relativen Lichteinheiten ausgegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Infektiöse PFV-Klone mit konstitutiv aktiven LTR-Promotoren

4.1.1 Konstrukte mit rekombinanter 3'LTR

Das Plasmid pHSRV2 (Fig. 8) ist ein infektiöser Klon des Primaten Foamy Virus Typ 1 (PFV-1) mit verkürzten U3-Regionen in 5'- und 3'LTR. Diese Deletionen beeinträchtigen die Replikationsfähigkeit in Zellkulturen nicht (Schmidt & Rethwilm, 1995). In pHSRV2 als Basis wurde die U3-Region in der 3'LTR bis auf die ersten 212bp deletiert und so der tas-abhängige LTR-Promotor entfernt. Ersetzt wurde dieser durch den konstitutiv aktiven immediate early gene (IE) Promotor und Enhancer des Cytomegalievirus (CMV). Nach Transfektion in Zellkulturen und Durchlaufen des viralen Replikationszyklus sollten so infektiöse Viren entstehen, bei denen sowohl 3'- als auch 5'LTR rekombinant sein sollten.

Zunächst wurde durch eine PCR mit den Primern #422 (sense) und #423 (antisense) vom Plasmid pHSRV2 ein 949bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Dieses entsprach dem Bel-U3-Übergangsbereich von der ClaI-Spaltstelle 228bp vor dem Bel-1-Stopcodon bis inklusive der BstEII-Spaltstelle 212bp nach Beginn der U3-Region in der 3'LTR. Am 3'-Ende dieses PCR-Fragmentes wurde durch entsprechende Konstruktion des Antisense-Primers eine XhoI-Spaltstelle angefügt. Das Amplifikat wurde über ein Agarosegel aufgereinigt, mit T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert, nach Phenol-Chloroform-Extraktion mit XhoI gespalten und vor der Ligation mit dem Vektor pBSKS- erneut über ein Agarosegel gereinigt. Der Vektor pBSKS- war zuvor mit XhoI gespalten, nach Ethanol-fällung mit EcoRV verdaut, durch CIP dephosphoryliert und über ein Agarosegel aufgereinigt worden. Als Ligationsprodukt entstand der Vorklon pTS1.

Im Plasmid pcHSRV2 (Moebes et al., 1997) ist die U3-Region der 5'LTR durch den IE Promotor und Enhancer des CMV ersetzt (Fig. 8). Der Transkriptionsstart des CMV-Promotors ist dabei identisch zum foamyviralen Transkriptionsstart in pHSRV2. Diese Promotor/Enhancer-Kassette steuert nach transienter Transfektion die Transkription der genomischen RNA und die Expression viraler Proteine. Es entstehen infektiöse Viren mit foamyviralen U3-Regionen in den 5'- und 3'LTRs.

Mittels einer PCR mit den Primern #424 (sense) und #425 (antisense) wurde vom Plasmid pcHSRV2 ein 840bp große Fragment amplifiziert, das die IE Promotor/Enhancer Kasette des CMV, die komplette R-Region und die ersten 7nt der U5-Region der 5'LTR beinhaltet. Durch entsprechende Konstruktion der Primer wurde am 5'-Ende des Amplifikates eine XhoI- und am 3'-Ende eine ClaI-Spaltstelle angefügt. Der Vektor pTS1 wurde mit Asp718 gespalten, der 5'-Überhang mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und nach Spaltung mit XhoI mit dem XhoI- und ClaI-gespaltenen PCR-Fragment zum Vorklon pTS2 (Fig. 8) ligiert. Die über PCR amplifizierten Bereiche von pTS2 wurden mit geeigneten Oligonukleotid-Primern für beide DNA-Stränge sequenziert. Die ermittelte Basenfolge entsprach der der Ausgangsplasmide pHSRV2 und pcHSRV2.

Aus pHSRV2 wurde mittels ClaI-Spaltung ein 2,2kb großes Fragment entfernt und durch das ebenfalls mit ClaI aus pTS2 isolierte 1,8kb Fragment ersetzt. Der resultierende Klon pTS3 (Fig. 8) besitzt eine rekombinante 3'LTR. Diese besteht aus den 5' gelegenen 212bp der foamyviralen U3-Region, gefolgt von einer CMV IE Promotor/Enhancer Kasette, der foamyviralen R-Region und 7nt der U5-Region. Durch die Deletion eines Teils der U3-Region wird der Bel-2-ORF um 135nt gekürzt.

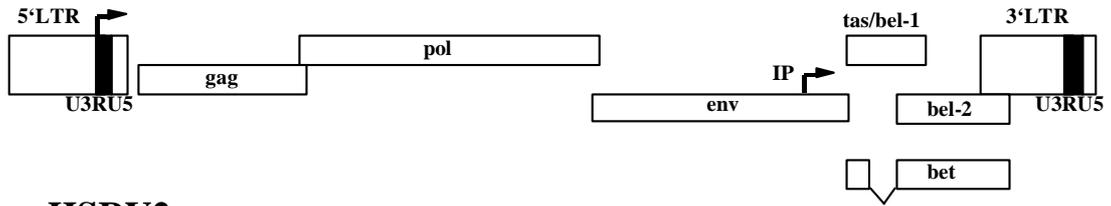
4.1.2 Konstrukte mit veränderter 5'- und 3'LTR

In pTS3 sind zwei unterschiedliche LTRs im selben Plasmid vorhanden. Das CMV-Promotor-Element und der foamyvirale U3-Promotor werden dabei von identischen Sequenzen flankiert. Um eventuelle Rekombinations-Ereignisse zwischen den unterschiedlichen Binnensequenzen der LTRs zu verhindern, wurden weitere Plasmide konstruiert, bei denen die U3-Region in der 5'LTR durch eine zweite CMV IE Promotor/Enhancer Kasette ersetzt wurde. Die Möglichkeit einer Rekombination zwischen zwei unterschiedlichen LTRs ist in 5.1.2 näher erörtert.

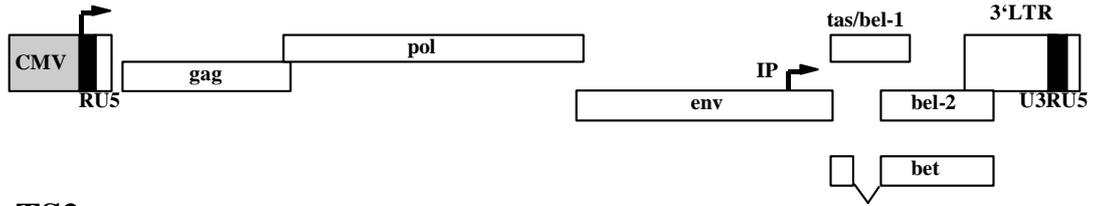
Fig. 8 (nächste Seite):

Überblick über die verwendeten Plasmide, die Struktur der rekombinanten LTR in pTS2, sowie die daraus hervorgehenden infektiösen Klone pTS3, pTS12 und pTS13. Die Transkriptionsstarts sind mit Pfeilen markiert.

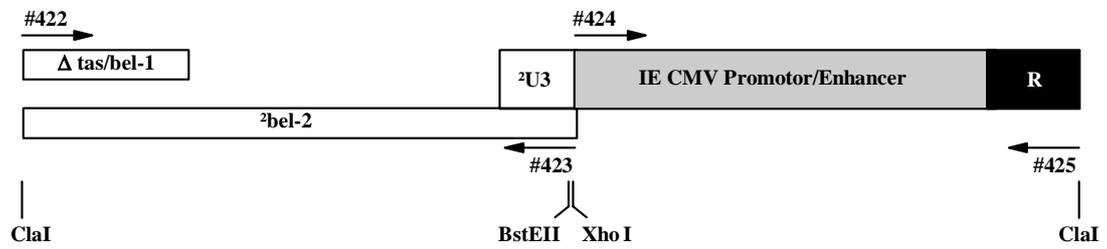
pHSRV2



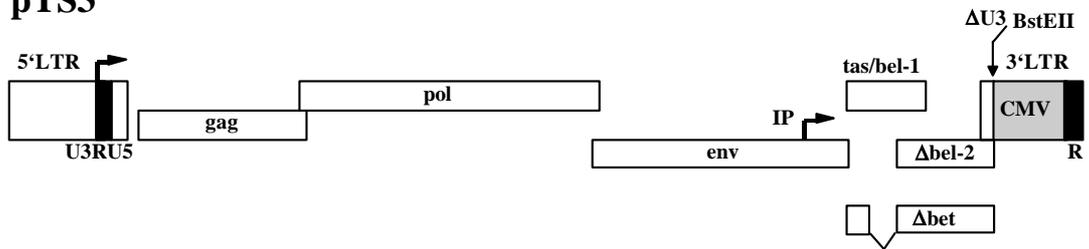
pcHSRV2



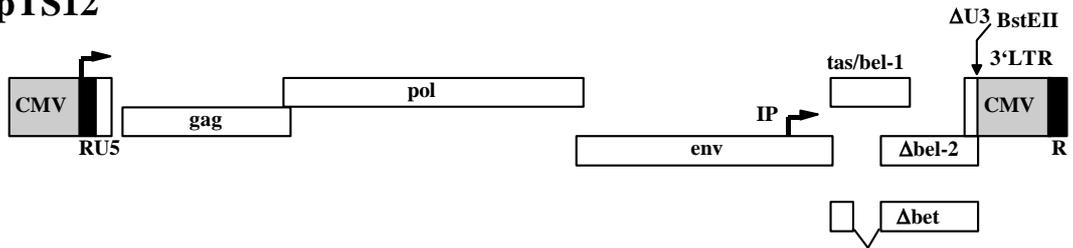
pTS2



pTS3



pTS12



pTS13

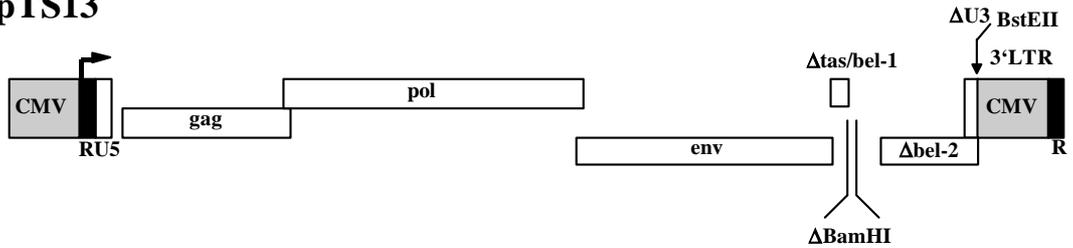


Fig. 8

Das Plasmid pTS3 wurde mit Asp718 gespalten, das 5'-Überhang-Ende mit Klenow-Polymerase geglättet und mit Kpn2I nachgespalten. So wurde ein 7,0kb Fragment, das den Bereich von der 5'LTR bis zum Beginn des Env-Gens enthält, entfernt. Ein entsprechendes Fragment von 6,8kb wurde mit MluI-Spaltung, Glättung durch Klenow-Polymerase und Kpn2I-Nachspaltung aus pcHSRV2 isoliert und in den Vektor pTS3 inseriert. Das resultierende Plasmid war pTS12 (Fig. 8).

Durch Deletion eines 208bp BamHI-Fragmentes im Tas/Bel-1-Gen und Religation von pTS12 entstand pTS13 (Fig. 8) mit funktional deletiertem Tas (Baunach et al., 1993).

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

4.2 Protein-Expression nach transienter Transfektion

4.2.1 Nachweis von Gag, Pol und Tas im Western Blot

Zum Nachweis der Expression von Gag, Pol und Tas wurden eine Mock-Kontrolle und je 10µg pTS12, pTS13 und pcHSRV2 mit der Calciumphosphat-Methode in 293T-Zellen transfiziert. Nach Induktion mit Natriumbutyrat erfolgte 48 Std. p.t. die Ernte der Zellysate. Die in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch Western Blots mit Seren gegen Gag (α Gag 011, 1:400 verdünnt), die RNase H-Domäne des Pol-Proteins (α RH, 1:400) und Tas (α Tas 017, 1:500) spezifisch detektiert. Die beiden Formen des Gag-Proteins p68 und p71 konnten in vergleichbarer Intensität in Zellen, die mit pTS12 und pTS13 transfiziert wurden, wie auch in pcHSRV2-transfizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden (Fig. 9A).

Auch in der Expression des p127 Pol-Vorläuferproteins und der reversen Transskriptase p80 konnte kein Unterschied zwischen pTS12- und pTS13-transfizierten Zellen und pcHSRV2-transfizierten Kontrollzellen festgestellt werden (Fig. 9B).

Bei Inkubation mit tas-spezifischem Serum konnte in pTS12-transfizierten Zellen ein dem Wildtyp entsprechendes 36kD Tas-Protein nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ein von 60kD auf ca. 56kD verkleinertes Bet-Protein, bedingt durch die Verkürzung des Bel-2-Leserahmens in pTS12. In Zellen, die mit der funktional tas-

deletierten Variante pTS13 transfiziert worden waren, konnten aufgrund der Deletion im Tas/Bel-1-Gen weder Tas noch Bet nachgewiesen werden (Fig. 9D).

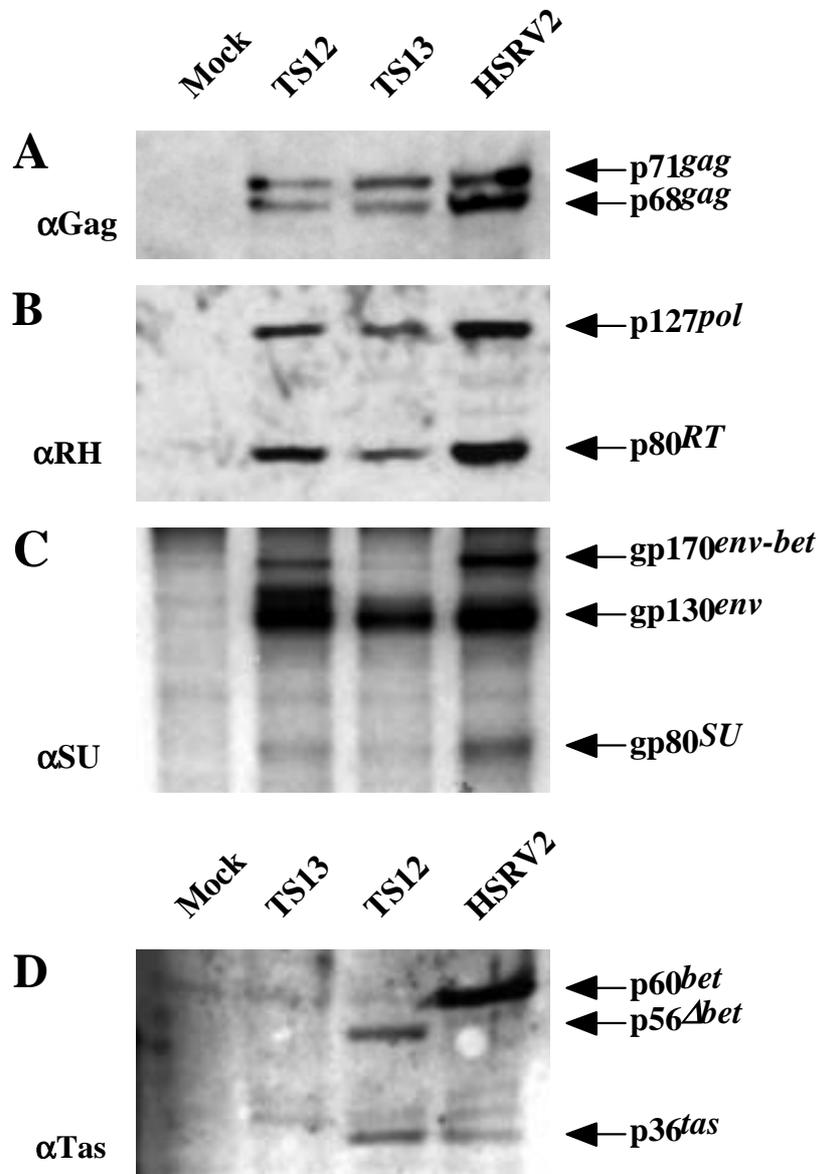


Fig. 9:

Proteinexpression der Konstrukte pTS12 und pTS13 nach transienter Transfektion. Analyse mit den Seren α Gag 011 (A), α RH (B) gegen die RNase H-Domäne von Pol und α Tas 017 (D) im Western Blot, sowie mit α SU (C) gegen die Surface-Untereinheit von Env im RIPA.

Aufgrund des verkürzten Bel-2-Leserahmens in pTS12 ließ sich ein verkürztes Env-Bet-Fusionsprotein (C) und eine auf ca. 56kD verkürzte Bet-Version (D) nachweisen. Die Bel-1-Deletion in pTS13 konnte durch Fehlen von Tas, Bet (D) und des Env-Bet-Fusionsproteins (C) bestätigt werden.

4.2.2 Nachweis von Env mit RIPA

Eine Mock-Kontrolle und jeweils 5µg pTS12, pTS13 und pcHSRV2 wurden in 293T-Zellen transfiziert und nach Natriumbutyrat-Induktion metabolisch radioaktiv markiert. Für den RIPA wurde ein αSU-Serum, das spezifisch die Surface-Untereinheit des Env-Proteins erkennt, verwendet.

Die Expression des gp130 Env-Proteins war in pTS12-, pTS13- und pcHSRV2-transfizierten Zellen vergleichbar. Auch bei der Expression des gp80 Surface-Proteins waren keine wesentlichen Unterschiede feststellbar. Das gp170 Env-Bet-Fusionsprotein zeigte sich in pTS12-transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp wegen des verkürzten Bel-2-Leserahmens in pTS12 geringfügig verkleinert, in pTS13-transfizierten Zellen war es erwartungsgemäß nicht nachweisbar (Fig. 9C).

4.3 Replikationskompetenz und Virustiter

4.3.1 Nachweis der Replikationsfähigkeit

Die Replikationskompetenz der Foamyviren mit rekombinanter LTR wurde in drei unabhängigen Experimenten gezeigt. 3×10^6 293T-Zellen wurden mit einer Mock-Kontrolle und jeweils 10µg pTS12, pTS13 und pcHSRV2 transfiziert und die Expression mit Natriumbutyrat induziert. 48 Std. nach Transfektion erfolgte die Gewinnung zellfreier Lysate und die Infektion von KMST-6-Zielzellen (1. Generation). Diese wurden 20 bis 30 Tage kultiviert, bis von ihnen zellfreie Kulturüberstände gewonnen und damit die Infektion einer zweiten Generation von KMST-6-Zielzellen durchgeführt wurde (siehe Fig. 10).

In den Zielzellkulturen erster Generation waren vier Tage nach Infektion mit Überständen pcHSRV2-transfizierter Zellen deutliche zytopathische Effekte (CPEs) sichtbar. Bei den mit TS12- und TS13-Überständen infizierten Zellen konnte zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zu den mock-infizierten Zellen festgestellt werden.

Zwei Tage nach Infektion wurden Zielzellen erster Generation auf Chamberslide-Objektträgern ausgesetzt, nach weiteren zwei Tagen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Als spezifischer Antikörper wurde αGag 127 verwendet.

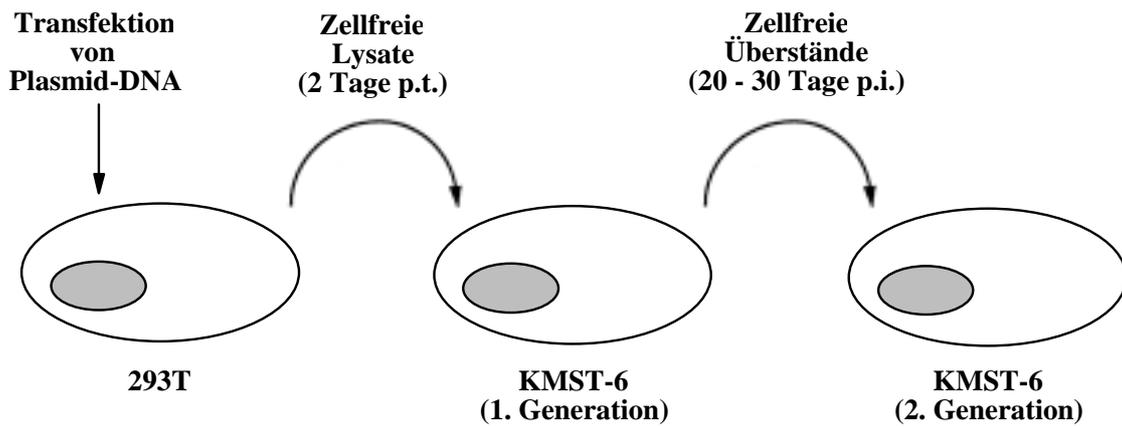


Fig. 10:

Strategie der Infektionsexperimente zum Nachweis der Replikationskompetenz der Konstrukte TS12 und TS13. Zwei Tage nach Transfektion der Plasmid-DNA in 293T-Zellen wurden KMST-6-Zielzellen (1. Generation) mit zellfreien Lysaten infiziert. Der zellfreie Kulturüberstand dieser Zellen wurde 20 bis 30 Tage später zur Infektion der KMST-6-Zielzellen (2. Generation) genutzt.

In den mit TS12- und TS13-Überständen infizierten Zellkulturen waren lediglich einzelne positive Kernfluoreszenzen sichtbar, während in der HSRV2-infizierten Positivkontrolle eine große Anzahl fluoreszierend markierter Zellen erkennbar waren (Fig. 11).

Aus Zielzellen zweiter Generation wurden 20 bzw. 40 Tage nach Infektion Zelllysate für eine Western-Blot-Analyse gewonnen. Mit dem Serum α Gag 011 (1:400) konnten sowohl in mit HSRV2 als auch in TS12- und TS13-infizierten Zellen Gag-Proteine spezifisch nachgewiesen werden (Fig. 12).

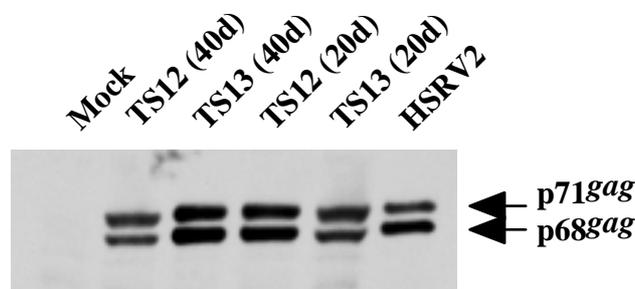


Fig. 12:

Nachweis der Gag-Expression in infizierten KMST-6-Zellen im Western Blot. Die Zellen wurden 20 bzw. 40 Tage nach Infektion lysiert. Als spezifisches Serum wurde α Gag 011 verwendet.

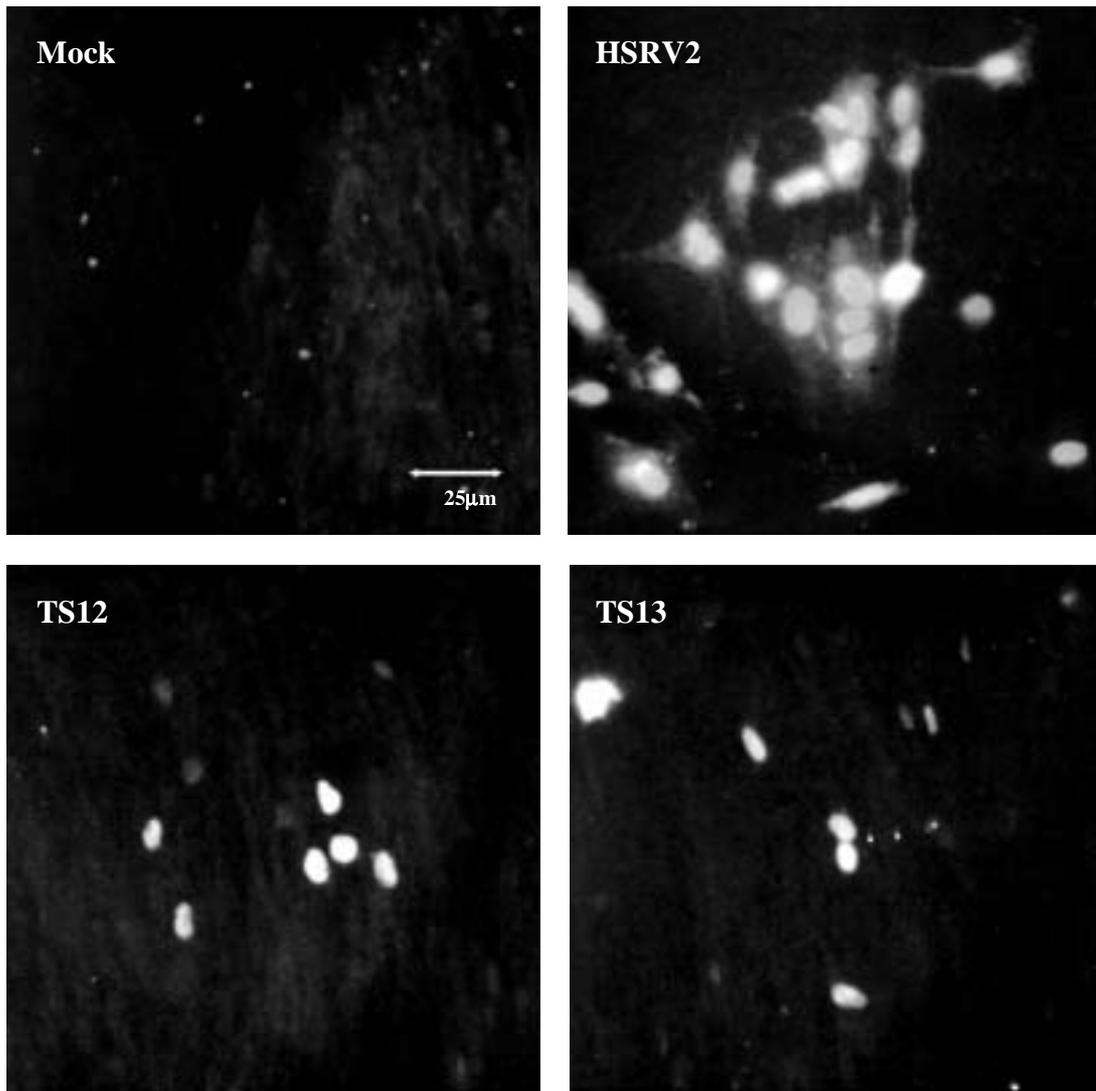


Fig. 11:

Immunfluoreszenz-Färbung infizierter KMST-6-Zellen mit α Gag-127-Serum. Vier Tage nach Infektion ließen sich in TS12- und TS13-infizierten Zellen einzelne Kernfluoreszenzen darstellen. Mockzellen blieben ungefärbt, HSRV-2-infizierte Zellen waren in großer Zahl fluoreszenz-positiv.

Ab dem 20. bis 30. Tag nach Infektion wurden in TS12- und TS13-infizierten Zielzellkulturen (2. Gen.) foamyvirus-typische CPEs als Zeichen der sich langsam entwickelnden lytischen Infektion sichtbar (Fig. 13).

Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass Foamyviren mit rekombinanter LTR in der Lage sind, auch ohne Tas zu replizieren. Im Vergleich zu HSRV2 zeigten dabei aber sowohl TS12 als auch TS13 eine deutlich verlangsamte Replikationskinetik.

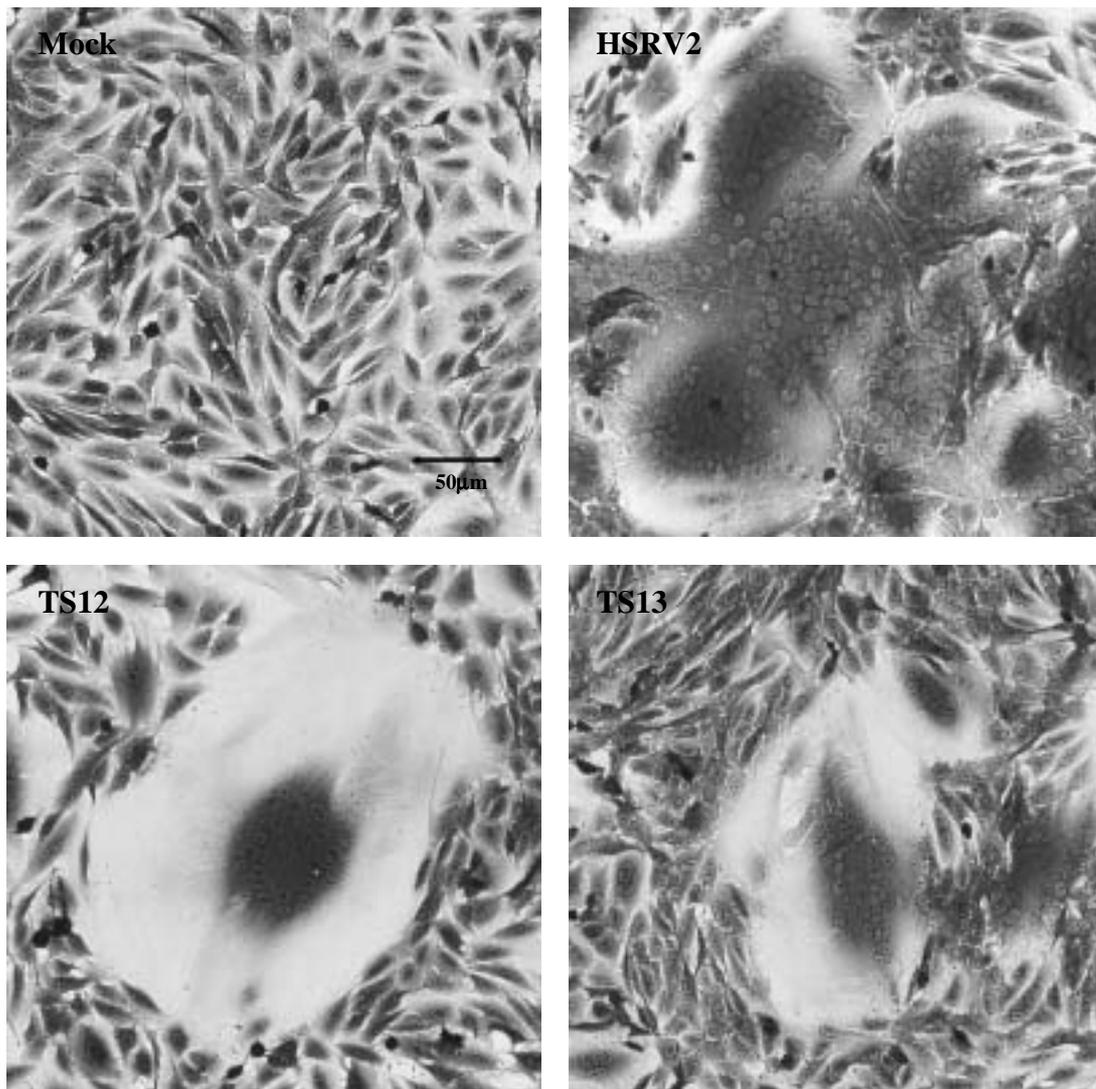


Fig. 13:

Kristallviolett-Färbung infizierte KMST-6-Zellen. 20 bis 30 Tage nach Infektion mit TS12 bzw. TS13 zeigten sich foamyvirus-typische CPEs in Form mehrkerniger Synzytien mit schaumiger Vakuolisierung.

4.3.2 Bestimmung der Virustiter in zellfreien Kulturüberständen

Um die Frage zu untersuchen, inwieweit die offenbar verlangsamte Replikationskinetik der Viren mit hybrider LTR mit geringen Virustitern einhergeht, wurden die in den Zellkulturüberstand freigesetzten infektiösen Partikel quantifiziert.

Zur Ermittlung der Virustiter in zellfreien Überständen foamyvirus-infizierter Zellen wird üblicherweise ein β -Galactosidase-Assay mit der Indikatorzelllinie BHK/LTRlacZ (Schmidt & Rethwilm, 1995) verwendet. Die Zellen tragen das β -Galactosidase-Gen

unter der Kontrolle einer foamyviralen LTR, deren Promotor durch die Anwesenheit von Tas in infizierten Zellen aktiviert wird. Diese lassen sich dann blau anfärben. Bei den hier verwendeten Konstrukten war eine Titration mit dem β -Galactosidase-Assay wegen der funktional tas-deletierten Variante TS13 nicht möglich.

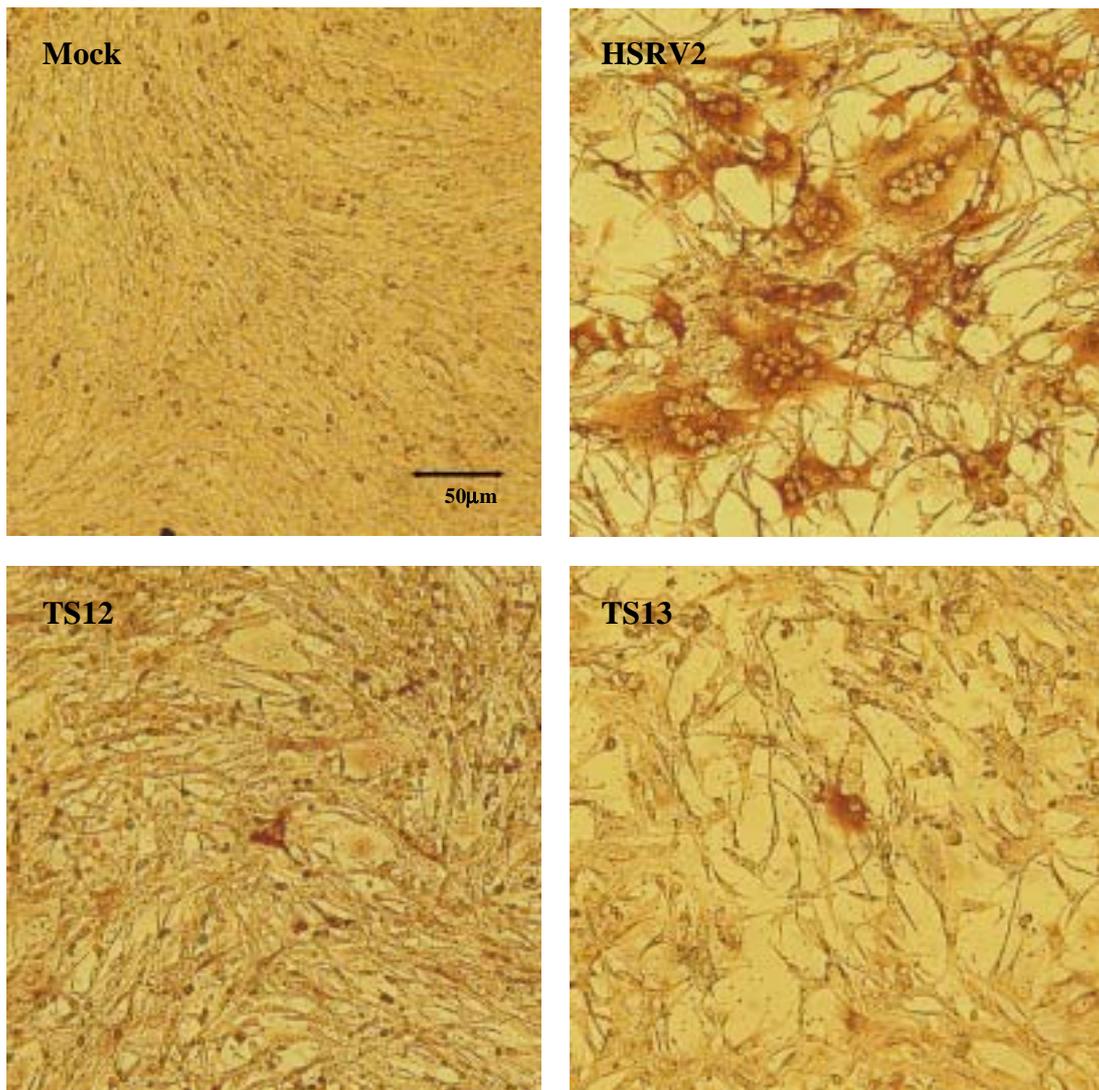


Fig. 14:

Virustiterbestimmung mit ICA. Zellfreie Überstände von Mockzellen, HSRV2-, TS12- und TS13-infizierten Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen zur Infektion von BHK-21-Zellen eingesetzt. Infizierte Zellen, in denen Gag exprimiert wurde, konnten mit der Immunfärbung braunrot markiert werden. Ausgezählt wurden positive Einzelzellen oder klonale Plaques.

Es wurde deshalb ein modifizierter Infectious Centre Assay (ICA) verwendet. Infizierte Zellen werden über Markierung des Gag-Proteins mit einem spezifischen Antiserum (α Gag 011) braunrot angefärbt (Fig. 14). Die Virustiter sind in PFU/ml (plaque forming units) angegeben.

Bei den mit TS12 bzw. TS13 infizierten Zielzellen (2. Gen.) konnten 25 Tage nach Infektion Virustiter im Bereich von $1,6 \times 10^2$ PFU/ml bis $3,0 \times 10^3$ PFU/ml im zellfreien Überstand festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen TS12 und TS13 war dabei nicht erkennbar. HSRV2-infizierte Kulturen produzierten dagegen bereits innerhalb von 2 bis 4 Tagen nach Infektion Titer im Bereich von 5×10^5 PFU/ml bis 5×10^6 PFU/ml. TS12 und TS13 erreichten also beide im Vergleich zu HSRV2 deutlich niedrigere Virustiter im Zellkulturüberstand.

4.4 Genetische Stabilität der rekombinanten Viren

4.4.1 Stabilität der rekombinanten LTR

Auch bei der Replikation *in vitro* in Zellkulturen sind Viren Einflüssen ausgesetzt, die zu einer evolutionären Veränderung der genetischen Information führen können. Daher wurde die genetische Stabilität der artifiziell eingeführten hybriden LTR innerhalb eines gewissen Zeitraumes untersucht.

In zwei unabhängigen Experimenten wurde 20 bzw. 40 Tage nach Infektion DNA aus den KMST-6-Zielzellen (2. Gen.) präpariert. Diese wurde mit PCR (55°C Annealing) unter Verwendung der Oligonukleotide #534 (Beginn der U3-Region, sense) und #239 (Gag-Leader-Bereich, antisense) analysiert. Im Falle der hybriden LTR wurde ein Fragment von 1264bp erwartet, die foamyvirale LTR sollte zur Amplifikation eines 1200bp Fragmentes führen.

Bei den Proben aus TS12- und einer Probe aus TS13-infizierten Zellen (40 Tage nach Infektion) zeigten sich Fragmente in erwarteter Größe. Bei TS13-infizierten Zellen 20 Tage nach Infektion waren zusätzlich zum erwarteten Fragment verkürzte Amplifikate, Deletionen in der hybriden LTR entsprechend, sichtbar (Fig. 15).

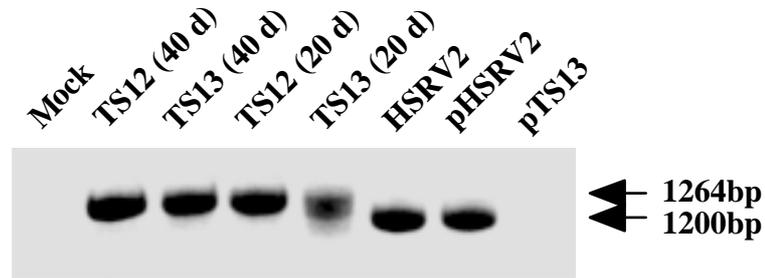


Fig. 15:

PCR zur Analyse der 5'LTR. Bei TS13 (20 Tage nach Infektion) konnten LTR-Deletionen als zusätzliche, verkürzte Banden gefunden werden.

Aufgrund der Struktur des amplifizierten DNA-Bereichs (Fig. 16) konnten die aufgetretenen Deletionen durch Restriktionsenzym-Verdau mit XhoI, NcoI und SacI lokalisiert (Fig. 17) und der CMV-Promotor-Kassette der rekombinanten LTR zugeordnet werden.

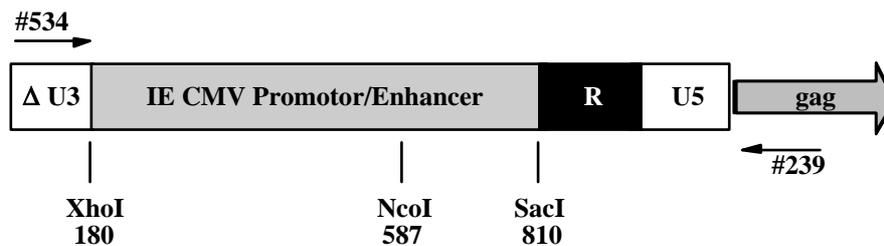


Fig. 16:

PCR-Fragment von 1,26kb zur Analyse der 5'LTR. Positionen der Oligonukleotid-Primer und Restriktionsenzym-Spaltstellen, die zur Lokalisation der aufgetretenen Deletionen verwendet wurden.

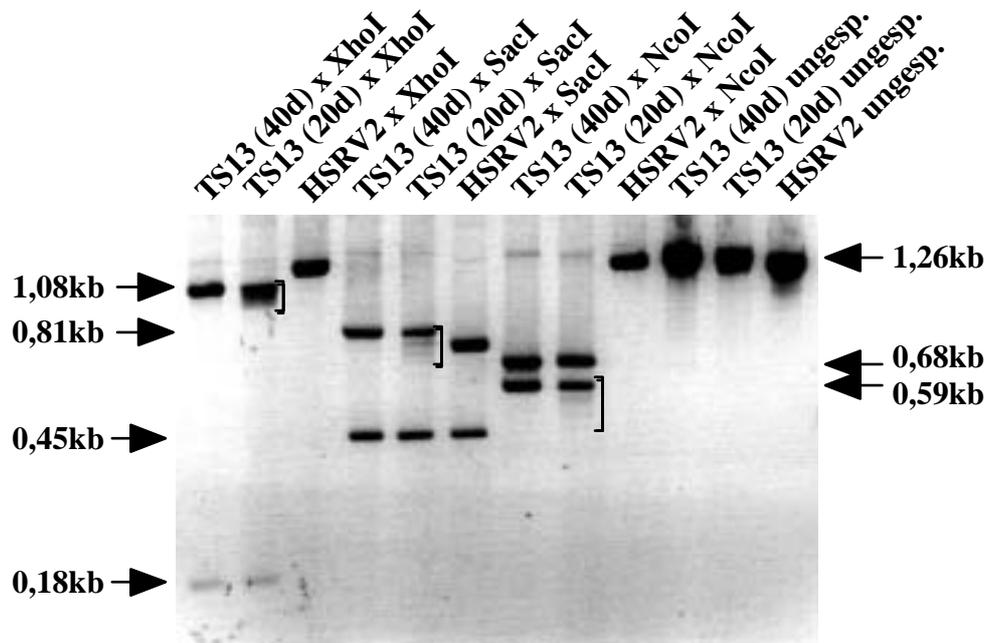


Fig. 17:

Das PCR-Fragment wurde getrennt mit XhoI, SacI und NcoI gespalten. Durch Vergleich der zusätzlich aufgetretenen, verkürzten Banden (Markierung) mit den erwarteten Restriktionsfragmenten konnten die bei TS13 aufgetretenen Deletionen in den CMV-Bereich der hybriden LTR lokalisiert werden.

4.4.2 Stabilität des Tas/Bel-1-Gens

TS12-Viren mit Tas haben offensichtlich im Vergleich zu TS13-Viren ohne Tas keinen Vorteil hinsichtlich der Replikationskinetik und des Virustiters. Um die Frage zu beantworten, ob TS12 Tas in Langzeitkulturen deletiert, wurde eine PCR-Analyse des Tas/Bel-1-Gens in Zielzellen (2. Gen.) durchgeführt. Damit wurde gleichzeitig das Vorhandensein der Tas-Deletion in TS13 bestätigt.

In zwei unabhängigen Experimenten wurde 20 bzw. 40 Tage nach Infektion von Zielzellen (2. Gen.) DNA aus den Zellkulturen präpariert und eine PCR (55°C Annealing) mit den Primern #139 (sense) und #10 (antisense) durchgeführt. Für das vollständige Tas/Bel-1-Gen wurde ein Fragment von 1079bp, für die BamHI-Deletion ein Amplifikat von 871bp erwartet.

In den Proben aus TS12-infizierten Zellen konnte das 1079bp Fragment, das dem vollständigen Bel-1-Gen entspricht, nachgewiesen werden. Ebenso konnte die BamHI-Deletion in den TS13-Proben bestätigt werden (Fig. 18).

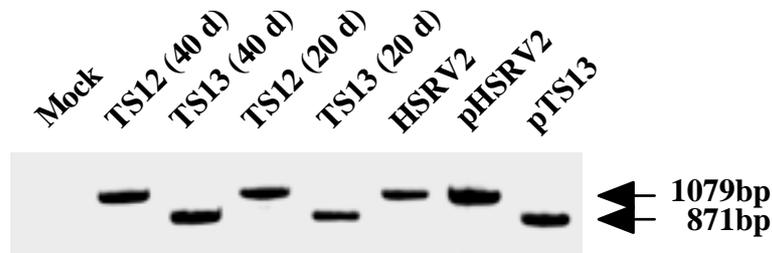


Fig. 18:

PCR zur Analyse des Tas-Gens. Die Tas/Bel-1-Region war über den untersuchten Zeitraum bei beiden Konstrukten stabil.

Nach der genetischen Stabilität des Tas/Bel-1-Gens sollte auch die Funktionsfähigkeit des Tas-Proteins bei TS12 untersucht bzw. das Fehlen eines funktionsfähigen Tas-Proteins bei TS13 bestätigt werden. Hierfür wurde die BHK/LTRlacZ-Indikatorzelllinie verwendet.

KMST-6-Zielzellen (2. Gen.) zweier unabhängiger Experimente 20 bzw. 40 Tage nach Infektion bzw. KMST-6 Mockzellen wurden mit BHK/LTRlacZ-Zellen kokultiviert. Nach zwei Tagen erfolgte die Fixierung und Färbung. Bei den Kokultivierungen mit TS12- bzw. HSRV2-infizierten Zellen zeigte sich eine deutliche Blaufärbung der aus BHK/LTRlacZ- und KMST-6-Zellen bestehenden Synzytien. Die bei der Kokultivierung mit TS13-infizierten Zellen aufgetretenen Synzytien blieben ebenso ungefärbt wie die Einzelzellen in der Mock-Kokultivierung (Fig. 19).

Die genetische Stabilität und Funktionsfähigkeit des Tas/Bel-1-Gens bzw. des Tas-Proteins bei TS12 konnte so für den untersuchten Zeitraum bestätigt werden, ebenso die Abwesenheit eines funktionsfähigen Tas-Proteins bei TS13.

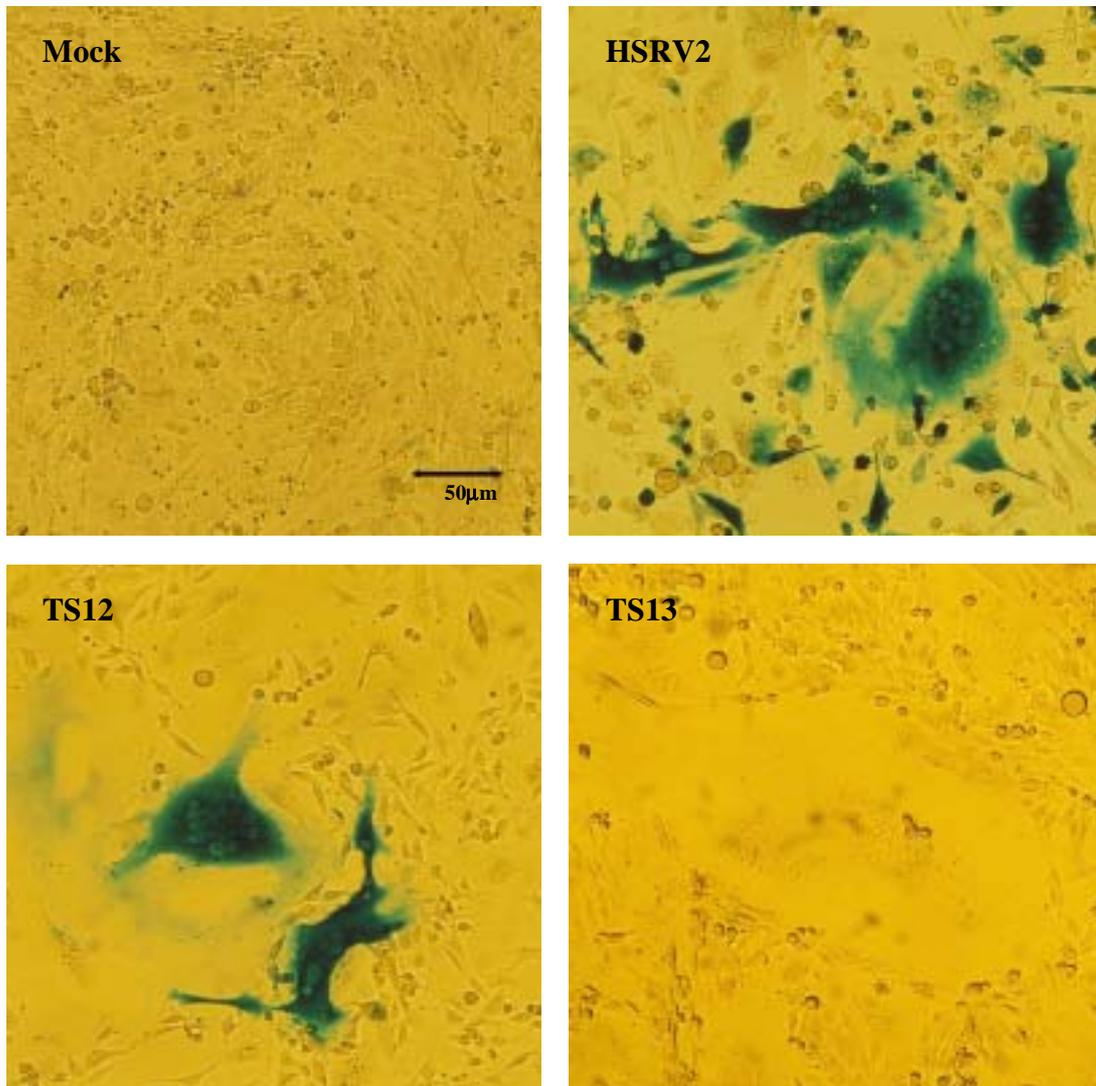


Fig. 19:

Kokultivierungsassay mit BHK/LTRlacZ-Zellen zum Nachweis des funktionsfähigen Tas-Proteins.
In TS12- und HSRV2-infizierten Kulturen waren CPEs mit deutlicher Blaufärbung sichtbar. Die in TS13-infizierten Kulturen aufgetretenen CPEs waren wie die Mockzellen farblos, weil ohne Anwesenheit von Tas keine β -Galactosidase-Expression erfolgt.

4.5 Versuche zur Steigerung des Virustiters

4.5.1 Induktion mit 5-Azacytidin

5-Azacytidin (AZC) wird als Basenanalogen anstelle von Cytidin in die DNA eingebaut. Aufgrund der Azagruppe an Position 5 kann AZC nicht methyliert werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die verlangsamte Replikationskinetik der TS12- und TS13-Viren auf einer Inaktivierung des integrierten Provirus durch Methylierung beruhte.

KMST-6-Zellen, zwischens 20 und 30 Tagen nach Infektion mit TS12, TS13 oder HSRV2, bzw. KMST-6-Mock-Zellen wurden für 72 Std. in Zellkulturmedium jeweils mit bzw. ohne 4µM AZC gehalten, bis die Virustiter in den Kulturüberständen ermittelt wurden. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt.

Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Virustitern im Überstand von Kulturen mit bzw. ohne AZC feststellen (Tab. 2).

	Mock	TS12	TS13	HSRV2
- AZC	0 (+/-0)	2,0x10 ³ (+/-0,0x10 ³)	1,7x10 ³ (+/- 1,2x10 ³)	8,7x10 ⁴ (+/- 2,3x10 ⁴)
+ AZC (4µM)	0 (+/-0)	1,7x10 ³ (+/-5,8x10 ²)	1,6x10 ³ (+/-5,8x10 ²)	5,7x10 ⁴ (+/-3,8x10 ⁴)

Tab. 2:

Virustiter in PFU/ml Überstand von infizierten Zellen, die in Medium jeweils mit bzw. ohne AZC kultiviert wurden

4.5.2 Stimulation der rekombinanten LTR mit Natriumbutyrat

Die durch den CMV-Promotor kontrollierte Expression nachgeschalteter Gene lässt sich durch Stimulation mit Natriumbutyrat deutlich steigern (Palermo et al., 1991). Es sollte untersucht werden, ob dies ebenfalls möglich ist, wenn der CMV-Promotor sich im Kontext einer retroviralen LTR befindet.

Gleiche Mengen KMST-6-Zellen, die 25 Tage zuvor mit TS12-, TS13-, oder HSRV2-Überständen infiziert worden waren, bzw. KMST-6-Mockzellen wurden jeweils für 8 Std. in Zellkulturmedium mit bzw. ohne 10mM Natriumbutyrat gehalten. Von den präparierten Zelllysaten wurden jeweils identische Volumina im Western Blot mit dem Serum α Gag 011 (1:400) untersucht. Dabei wurden vier unabhängige Stimulationsexperimente durchgeführt.

Im Vergleich der Kulturen mit bzw. ohne Natriumbutyrat war keine unterschiedliche Gag-Expression erkennbar (Fig. 20).

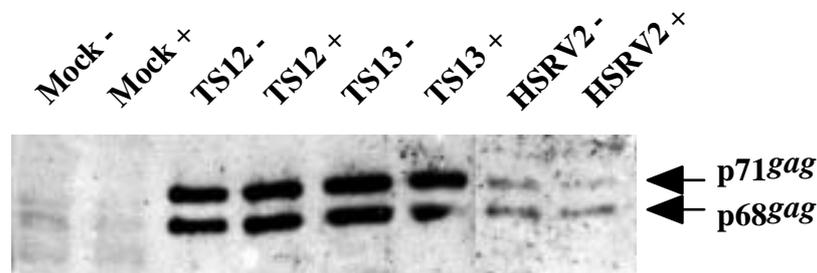


Fig. 20:

Western Blot (Serum α Gag 011) aus Lysaten TS12- und TS13-infizierter Zellen **nach Stimulation der Kulturen mit 10mM Natriumbutyrat (+)** für 8 Std. Es konnte keine Veränderung der Gag-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen, die in Medium ohne Natriumbutyrat (-) gehalten wurden, festgestellt werden.

4.5.3 Freisetzung intrazellulärer Viren durch Einfrieren und Auftauen

Es wurde die Frage untersucht, ob die niedrigen Virustiter im zellfreien Überstand von TS12- und TS13-infizierten Kulturen durch einen Defekt in der Freisetzung viraler Partikel und somit durch Retention der Viren im Zellinneren zustande kommen. Hierfür wurde der Virustiter des Zellkulturüberstandes infizierter Kulturen mit dem von thermischen Lysaten verglichen, die durch dreimaliges Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen hergestellt wurden.

In zwei unabhängigen Experimenten erreichten TS12 und TS13 im zellfreien Kulturüberstand Titer von 3×10^3 PFU/ml bis 6×10^3 PFU/ml, im thermischen Lysat von

2×10^2 PFU/ml bis 3×10^3 PFU/ml. Ein signifikanter Unterschied zwischen TS12 und TS13 konnte nicht festgestellt werden. Bei beiden Konstrukten war die Zahl infektiöser Partikel im thermischen Lysat niedriger als im Zellkulturüberstand. Dies entsprach in dieser Versuchsreihe auch dem Verhältnis der Titer in zellfreien Kulturüberständen und thermischen Lysaten, die durch die HSRV2-Kontrolle erreicht wurden.

Eine vermehrte Freisetzung intrazellulärer Viren in den Überstand durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen konnte somit nicht beobachtet werden.

4.6 Promotor-Aktivität der hybriden LTR

4.6.1 Luciferase-Expressionsplasmide

Um eine mögliche Hemmung des CMV-Promotors im Kontext der foamyviralen LTR als Ursache für die verlangsamte Replikationskinetik und die niedrigen Virustiter von TS12 und TS13 zu untersuchen, wurde die Promotor-Aktivität der hybriden LTR in einem Luciferase-Assay analysiert. Reportergenkonstrukte wurden erstellt, die Luciferase als leicht zu quantifizierendes Genprodukt unter der Kontrolle der hybriden LTR exprimierten.

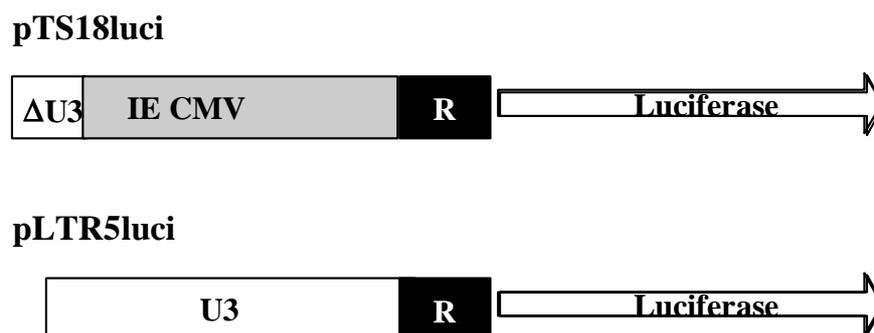


Fig. 21:
Schematische Darstellung der Luciferase-Expressionsplasmide pTS18luci und pLTR5luci.

Ein 1,3kb-Fragment wurde durch Restriktionsenzymverdau mit Bsu15I, Auffüllen des Überhanges mit Klenow-Polymerase und Nachverdau mit BglII aus pTS12 herausgeschnitten und in den Vektor pGL2-Basic eingesetzt. Dieser war zuvor mit HindIII geschnitten und nach dem Glätten der Überhänge durch Klenow-Polymerase mit BglII nachverdaut worden. Das so entstandene Plasmid war pTS18luci (Fig. 21) mit der hybriden LTR, bestehend aus den ersten 212bp der U3-Region, der CMV-Promotor-Kassette und der foamyviralen R-Region, vor der für Luciferase kodierenden Sequenz. Als Kontrolle diente pLTR5luci, ein Plasmid, das die Expression von Luciferase über eine foamyvirale LTR, bestehend aus U3- und R-Region (-777 bis +195 relativ zum Transkriptionsstart), steuert (Fig. 21).

Um den Einfluss des Transaktivators zu untersuchen, wurde das Tas-Expressionsplasmid pCEP4/bel1-SDm verwendet.

4.6.2 Analyse der Promotor-Aktivität

Die Reportergenkonstrukte pLTR5luci und pTS18luci wurden jeweils mit pCEP4/bel1-SDm bzw. mit einem tas-negativen Kontrollplasmid in 293T-Zellen kotransfiziert. Nach 48 Std. wurden Zelllysate präpariert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt.

Im Falle der foamyviralen LTR ohne Tas entsprachen die gemessenen relativen Lichteinheiten dem Messhintergrund der Mockzellen. Die für die rekombinante LTR gemessenen Werte waren unabhängig von der Anwesenheit von Tas vergleichbar mit denen der tas-stimulierten foamyviralen LTR (Fig. 22), nämlich etwa 600fach höher als bei der unstimulierten Foamyvirus-LTR.

Es konnte so gezeigt werden, dass die Aktivität der CMV-Promotor-Kassette in der hybriden LTR nach transienter Transfektion keiner signifikanten Beeinflussung durch Tas unterliegt und mit der Aktivität der transaktivator-stimulierten foamyviralen LTR vergleichbar ist.

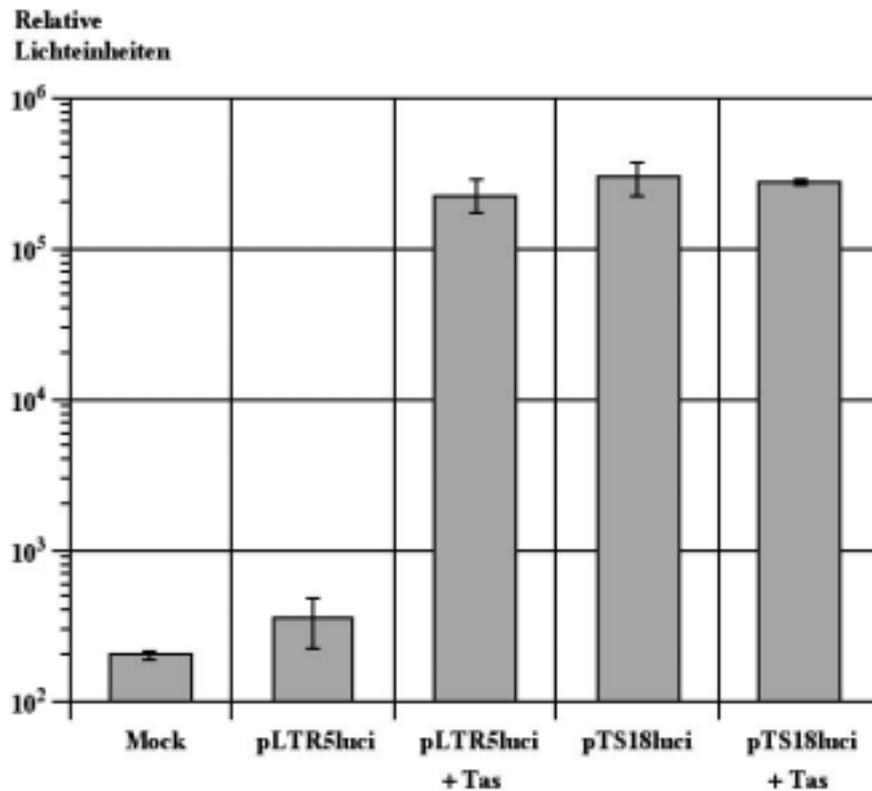


Fig. 22:

Luciferase-Assay zur Analyse der Promotor-Aktivität. Nach Kotransfektion von pLTR5luci bzw. pTS18luci mit einem tas-negativen Kontrollplasmid oder dem Tas-Expressionsplasmid pCEP4/bel-1SDm wurden Zellysate hergestellt und die Aktivität der Luciferase in relativen Lichteinheiten quantifiziert. Die Promotor-Aktivität der rekombinanten LTR war unabhängig von der Anwesenheit des Transaktivators vergleichbar mit der Aktivität der tas-stimulierten foamyviralen LTR.

4.7 Notwendigkeit einer funktionsfähigen Integrase

4.7.1 DNA-Konstrukte mit mutierter Integrase

Foamyviren benötigen für ihre Replikation eine funktionsfähige Integrase (Enssle et al., 1999), Cytomegalieviren dagegen sind nicht integrierende DNA-Viren. Dies warf die Frage auf, ob Foamyviren, deren Replikation abhängig von einem CMV-Promotor ist, weiterhin obligat in das Wirtszellgenom integrieren müssen.

Um diese Frage zu klären, wurden die Konstrukte pTS16 und pTS17 konstruiert (Fig. 23). Ein 0,66kb-Fragment aus pMH3 mit einem Teil des Tas-/Bel-1-Gens und der U3-Region des Spleen Focus Forming Virus (SFFV), die die Transkription eines nachgeschalteten GFP-Reportergens steuert, wurde über die Restriktionsenzym-Schnittstellen MscI und EcoNI in pTS2 eingesetzt. Aus dem resultierenden Plasmid wurde ein 2,56kb ClaI-Fragment herausgeschnitten und in das ebenfalls mit ClaI gespaltene pTS12 inseriert. Das so entstandene pTS16 ist ein infektiöser PFV-Klon mit hybrider LTR, der nach dem Tas-/Bel-1-Gen eine SFFV-U3-GFP-Reportergen-kassette trägt. Das Plasmid pTS17 entstand durch Einfügen eines aus pcHSRV2/M73 stammenden 2,31kb PacI-Kpn2I-Fragmentes in pTS16. In pTS17 wurde so das DD35E-Motiv im aktiven Zentrum der Integrase zu DA35E (Aspartat zu Alanin) mutiert und diese so inaktiviert (Enssle et al., 1999).

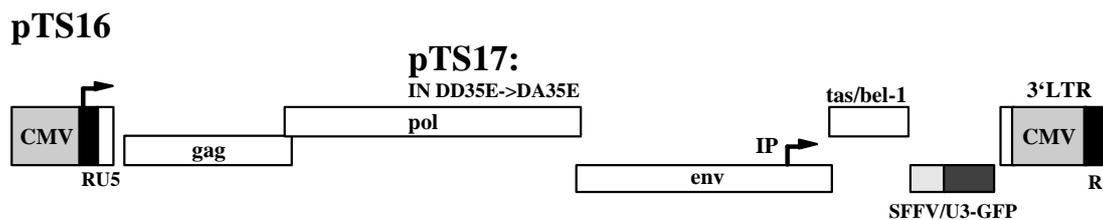


Fig. 23:
Schematische Darstellung der Konstrukte pTS16 und pTS17. Es handelt sich um infektiöse PFV-Klone mit hybrider LTR, GFP-Reportergen-Kassette und einer Mutation im aktiven Zentrum der Integrase bei pTS17.

4.7.2 FACS-Analyse der Viren mit mutierter Integrase

Die Expression des Reportergens GFP konnte in mit pTS16 und pTS17 transfizierten bzw. mit entsprechenden Kulturüberständen infizierten Zellen automatisiert durch FACS-Analyse in zwei unabhängigen Experimenten untersucht werden.

293T-Zellen wurden mit pTS16, pTS17, den Kontrollplasmiden pMH3 und pMH9, sowie einer Mockkontrolle transfiziert. Die Plasmide pMH3 und pMH9 beinhalten ebenfalls eine SFFV-U3-GFP-Kassette. Während pMH3 nach Transfektion zur Produktion von infektiösen replikationskompetenten Viruspartikeln führt, können die nach Transfektion von pMH9 freigesetzten Viren aufgrund einer Deletion in der 3'LTR

noch einmal Zielzellen infizieren und dort als Proviren integrieren, eine weitere Replikation findet aber nicht statt.

Am Tag 2 p.t. konnte eine in allen Proben vergleichbare Anzahl GFP-positiver Zellen und damit eine vergleichbare Transfektionseffizienz festgestellt werden. Während die Anzahl GFP-positiver Zellen 13 Tage nach Transfektion mit pTS16 auf über 90% anstieg, waren zur gleichen Zeit nur noch etwa 2% der pTS17-transfizierten Zellen fluoreszenz-positiv (Fig. 24).

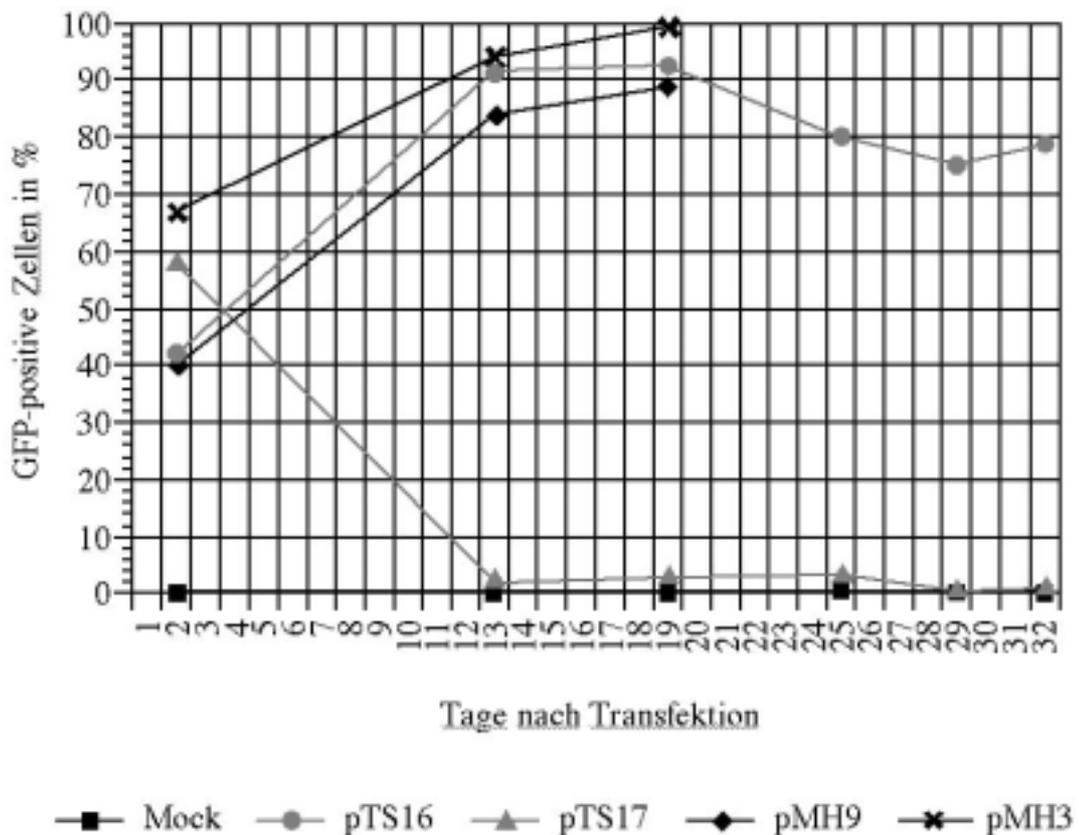


Fig. 24:

FACS-Analyse der GFP-Expression nach Transfektion von pTS16 und pTS17 in 293T-Zellen. Zwei Tage nach Transfektion war eine vergleichbare Anzahl von Zellen fluoreszenz-positiv.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden durch Sterilfiltration zellfreie Kulturüberstände gewonnen und KMST-6-Zielzellen infiziert. Diese wurden regelmäßig

im FACScan auf GFP-Expression untersucht. Dargestellt sind die Daten eines für beide Experimente repräsentativen Versuchs.

Von den TS16-infizierten Zellen waren nach 23 Tagen über 50% GFP-positiv, während die TS17-infizierten Zellen bis zum Abbruch des Versuchs 30 Tage nach Infektion GFP-negativ blieben (Fig. 25).

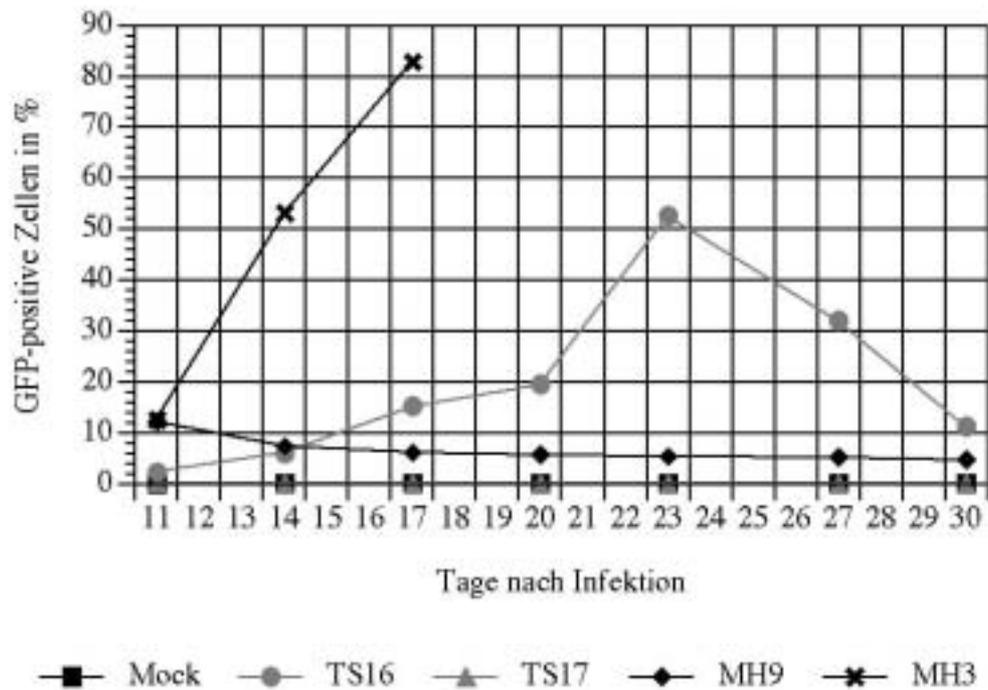


Fig. 25:

FACS-Analyse TS16- und TS17-infizierter KMST-6-Zellen. Während von den mit TS16 infizierten Zellen nach 23 Tagen über 50% GFP-positiv waren, blieben die TS17-infizierten Zellen bis zum Abbruch des Experimentes 30 Tage nach Infektion fluoreszenz-negativ.

Somit konnte gezeigt werden, dass auch für Foamyviren mit der konstruierten hybriden LTR, die den Promotor eines nichtintegrierenden Virus beinhaltet, die Integration des Provirus in das Genom der infizierten Zelle eine Voraussetzung für die Replikation darstellt.

5 Diskussion

5.1 Konstruktion der rekombinanten Viren

5.1.1 Modifikation der LTR

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Konstruktion einer unabhängig von Tas replikationskompetenten Variante des PFV-1. Die einzige bekannte Funktion des Tas-Proteins ist seine Wirkung als transkriptionaler Transaktivator auf den LTR-Promotor in der U3-Region und den internen Promotor im Env-Gen (Rethwilm, 1995). Um eine Replikation auch ohne Tas zu ermöglichen, musste der tas-abhängige LTR-Promotor durch einen konstitutiv aktiven Promotor ersetzt werden. Zumindest für die Replikation *in vitro* ist Tas das einzige essentielle Protein, das unter der Kontrolle des internen Promotors synthetisiert wird. Daher war es nicht nötig, diesen ebenfalls durch ein tas-unabhängiges Element zu ersetzen.

Die U3-Region des PFV-1 hat im infektiösen Klon pHSRV2 eine Länge von 777bp und enthält mehrere für die Replikation wichtige Elemente (Fig. 26). Das 5'-terminale Ende der U3-Region ist gleichzeitig der 5'-Terminus der linearen viralen DNA. Für andere Retroviren wurde beschrieben, dass spezifische Sequenzen von ca. 8 bis 12bp Länge am 5'-Ende benötigt werden, um eine Integration zu ermöglichen (Panganiban & Temin, 1983). Für PFV-1 konnte durch *in vitro* Studien mit bakteriell exprimierter Integrase gezeigt werden, dass eine solche spezifische Sequenz von mindestens 5bp (ACAAT) nötig ist, um ein Substrat, das dem 3'-Terminus der U5-Region entspricht, effizient zu schneiden (Pahl & Flügel, 1993).

Durch Deletionsanalysen mit Reportergenkonstrukten (Erlwein & Rethwilm, 1993) konnten drei Bereiche in der U3-Region identifiziert werden, die für die Transaktivierung des LTR-Promotors durch Tas verantwortlich sind (TREs). In dieser Studie konnte das Vorhandensein zweier weiter stromaufwärts gelegener TREs, die zuvor beschrieben worden waren (Lee et al., 1993), nicht bestätigt werden.

Die U3-Region enthält außerdem noch mehrere Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und Ets-1 (Maurer et al., 1991; Schmidt et al., 1997), von denen zumindest die drei AP-1-Bindungsstellen für eine volle Funktionsfähigkeit des LTR-Promotors vorhanden sein müssen (Schmidt et al., 1997).

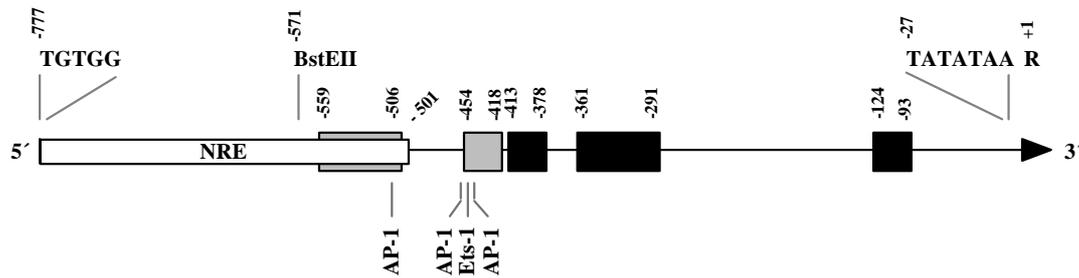


Fig. 26:

Aufbau der U3-Region von PFV-1. Geschwärzte Blöcke stellen TREs nach Erlwein & Rethwilm, 1993 dar, grau hinterlegte zusätzliche TREs nach Lee et al., 1993. AP-1 und Ets-1 sind Bindungsstellen für gleichnamige zelluläre Transkriptionsfaktoren. Die Zahlen sind Positionsangaben relativ zum Transkriptionsstart. NRE = negativ regulierendes Element.

Bei der Konstruktion der hybriden LTR sollten einerseits die für die Integration wichtigen Sequenzen am 5'-Terminus der U3-Region erhalten bleiben, andererseits aber der tas-abhängige LTR-Promotor mit allen TREs entfernt werden. Daher wurde der Bereich zwischen der BstEII-Schnittstelle (Position -571 relativ zum Transkriptionsstart) bis zum Beginn der R-Region, der gleichzeitig den Transkriptionsstart darstellt, deletiert.

Ersetzt wurde dieses Segment durch ein immediate early gene (IE) Promotor/Enhancer-Element des Cytomegalievirus (CMV). Die mit immediate early bezeichneten Gene, oder Alpha-Gene, sind die ersten, die nach der Neuinfektion einer Zelle mit CMV durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert werden (Stinski, 1990). Der verwendete CMV-Promotor ist dabei einer der stärksten bekannten Promotoren überhaupt (Boshart et al., 1985). Seine Anwendung für transiente oder stabile Genexpression ist daher in der Molekularbiologie weit verbreitet. Der Transkriptionsstart des CMV-Promotors in den konstruierten infektiösen PFV-Klonen ist in Anlehnung an das Plasmid pCHSRV2 identisch mit dem Transkriptionsstart des wildtypischen Foamyvirus-LTR-Promotors (Moebes et al., 1997).

Die so aufgebaute hybride LTR (Fig. 8) sollte zur Integration fähig sein und eine starke, von Tas unabhängige Promotoraktivität besitzen.

5.1.2 Rekombination zwischen unterschiedlichen LTRs

Retrovirale RNA-Transkripte, ausgehend von einem integrierten Provirus oder einem infektiösen DNA-Plasmid-Klon, beginnen mit der R-Region. Erst im Laufe der reversen Transkription werden zwei vollständige LTRs generiert, wobei die zunächst nur am 3'-Ende der RNA vorhandene U3-Region auch als Vorlage für die Synthese der proviralen U3-Region der 5'LTR dient. Daher muss die 3'LTR eines infektiösen DNA-Klons modifiziert werden, falls nach Transfektion in Zellkulturen rekombinante Viren entstehen sollen.

Das auf pHSRV2 basierende Plasmid pTS2 (Fig.8) enthält deshalb eine foamyvirale 5'LTR und eine hybride 3'LTR. In beiden LTRs sind die Bereiche, die den Promotor flankieren, identisch. 5' gelegen sind jeweils die foamyviralen Sequenzen der U3-Region stromaufwärts der BstEII-Schnittstelle, in 3'-Richtung folgt auf den Transkriptionsstart die R-Region.

In einer früheren Studie führte eine vergleichbare Situation regelmäßig zur Rekombination zwischen den U3-Regionen unterschiedlicher 5'- und 3'LTRs nach Transfektion entsprechender infektiöser DNA-Klone. Anders als es der Mechanismus der reversen Transkription erwarten ließe, waren nur Viren nachweisbar, deren beide LTRs der 5'LTR des Ausgangsklons entsprachen (Schmidt et al., 1997).

Um ein solches Rekombinationsereignis nach Transfektion sicher auszuschließen, wurde pTS3 konstruiert. Die Transkription dieses Plasmides wird nicht von einer foamyviralen LTR gesteuert, sondern von einem IE CMV Enh./Prom.-Element, das dem der hybriden LTR entspricht, jedoch ohne die stromaufwärts gelegenen 5'-terminalen Sequenzen der U3-Region von PFV-1.

5.2 Virustiter und Replikationskinetik

5.2.1 Reduziertes Replikationsverhalten der vereinfachten PFV

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine genetische Vereinfachung des PFV-1 durch Einführung einer hybriden LTR mit konstitutiv aktivem IE CMV Enh./Prom.-Element möglich ist. Die rekombinanten Viren waren auch nach Deletion des sonst essentiellen Tas/Bel-1-Gens zur Replikation fähig. Im Vergleich zu Wildtyp-

PFV-1 zeigten sie jedoch eine deutlich verlangsamte Replikationskinetik und um etwa drei lg-Stufen erniedrigte Titer im zellfreien Kulturüberstand.

Ein ähnlich reduziertes Replikationsverhalten ist auch bei vereinfachten HIV-1- und SIVmac239-Varianten beschrieben (Chang & Zhang, 1995; Guan et al., 2001). So waren HIV-1-Varianten mit hybriden LTRs, bei denen Teile der U3-Region durch ein immediate early gene Enhancer-Element des CMV ersetzt wurden, in Zellkulturen zur Replikation fähig. Eine durch Einführung von Stopcodons tat-deletierte Mutante zeigte dabei ähnlich den vereinfachten PFV eine reduzierte Replikationskinetik. Anders als bei dem tas-positiven PFV mit hybrider LTR, war eine tat-positive HIV-1-Variante mit hybrider LTR in ihrem Replikationsverhalten im Vergleich zum Wildtyp kaum eingeschränkt. Dieser Unterschied im Replikationsverhalten der transaktivator-positiven PFV- und HIV-Varianten mit rekombinanten LTRs ist vermutlich in unterschiedlichen Wirkmechanismen von Tat und Tas sowie dem jeweiligen Aufbau der hybriden LTR begründet. Bei der Konstruktion der vereinfachten PFV wurde der gesamte Promotorbereich der U3-Region inklusive der TREs deletiert und durch einen IE CMV Prom./Enh. ersetzt. Dagegen wurde bei den vereinfachten HIV nach Deletion einiger Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren lediglich ein IE CMV-Enhancer im Bereich von -134 bzw. -79 bis -39 relativ zum Transkriptionsstart eingesetzt. Die TATA-Box und TAR von HIV blieben erhalten (Chang & Zhang, 1995).

Auch für stark vereinfachte SIVmac239-Varianten konnte eine erhaltene Replikationsfähigkeit mit verlangsamter Kinetik nachgewiesen werden. Die hybriden LTRs dieser Konstrukte beinhalteten einen CMV-Promotor inkl. dessen TATA-Box. Die akzessorischen Gene Nef, Vpr, Vpi, Vpx und Tat waren deletiert, nur Rev wurde erhalten (Guan et al., 2001).

Mögliche Ursachen für die funktionale Beeinträchtigung der vereinfachten PFV-1-Varianten, die im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden, werden im Folgenden erörtert.

5.2.2 Negativ regulierende Elemente in der LTR

In verschiedenen Studien wurde die Expression von Reportergenen unter der Kontrolle von foamyviralen LTRs mit sukzessiven Deletionen untersucht. Dabei konnten Bereiche in der LTR lokalisiert werden, die einen inhibitorischen Effekt auf die LTR-gesteuerte Expression nachgeschalteter Gene haben.

Analysen von Reportergenkonstrukten mit unterschiedlichen Deletionen der U3-Region von PFV-1 konnten so zeigen, dass die ersten 280bp am 5'-Terminus die tas-stimulierte Genexpression geringfügig negativ beeinflussen können und wurden daher als negativ regulierendes Element (NRE, Fig. 26) bezeichnet. Im Vergleich zu einem Konstrukt mit der vollen LTR konnte in dieser Studie die Expression des Markergens Chloramphenicol-Acetyltransferase durch Deletion der stromaufwärts der Position -501 (relativ zum Transkriptionsstart) gelegenen Sequenzen gesteigert werden (Erlwein & Rethwilm, 1993).

Für die LTR des SFV-1 konnte gezeigt werden, dass der R-U5-Bereich einen starken negativen Einfluss sowohl auf die transaktivator-induzierte Genexpression als auch auf die Aktivität eines heterologen Promotors hat. Ein Zusammenhang mit einer stabilen RNA-Sekundärstruktur dieser Region mit einer freien Energie von -74kcal/mol wurde vermutet (Mergia et al., 1992).

Auch für PFV-1 konnte ein hemmender Einfluss der R-U5-Region nachgewiesen werden. Ein bis zu 30facher Anstieg der tas-stimulierten Expression des Reportergens resultierte nach Deletion der U5-Region. Wie schon bei SFV-1 konnte auch hier eine stabile Sekundärstruktur der RNA des R-U5-Bereiches mit einer freien Energie von -73kcal/mol gefunden werden (Erlwein & Rethwilm, 1993).

Um die reduzierte Replikationskinetik der genetisch vereinfachten Viren auf die negativ regulierenden Elemente in der Rest-LTR zurückzuführen, müsste man postulieren, dass der Einfluss der NREs auf die Promotoraktivität des CMV IE Enh./Prom.-Elementes stärker ist, als auf die des wildtypischen U3-Promotors.

Die Resultate der Versuche mit Reportergenkonstrukten, die Luciferase unter der Kontrolle der hybriden oder der foamyviralen LTR exprimieren, machen diese Möglichkeit zumindest für das NRE der U3-Region unwahrscheinlich. Nach transienter Transfektion beider Reporterplasmide war die Luciferaseaktivität mit der hybriden LTR mindestens ebenso ausgeprägt wie mit der wildtypisch foamyviralen LTR.

Möglicherweise wird die normalerweise hohe Aktivität des CMV-Promotors auch durch bisher nicht identifizierte mehr oder weniger spezifische hemmende Einflüsse im Kontext des foamyviralen Genoms beeinträchtigt.

5.2.3 Methylierung der LTR

Die Methylierung von Cytosin ist ein in eukaryonten Zellen weit verbreiteter Mechanismus zur Stilllegung von Genen (Chomet, 1991). Mit der Integration des retroviralen Provirus wird dieser durch zelluläre Methylierungsmechanismen angreifbar. 5-Azacytidin (AZC) ist in der Lage, diese Methylierung zu verhindern. AZC wird als Basenanalogen bei der Replikation der DNA in die wachsende Nukleinsäurekette eingebaut. Aufgrund der chemischen Modifikation durch Anhängen einer Azagruppe an Position 5 kann AZC aber nicht methyliert werden.

Für SFV-3 konnte gezeigt werden, dass es in Zellkulturen, die seit zwei Jahren latent infiziert waren und keine nachweisbare Expression viraler Gene zeigten, durch Inkubation mit AZC innerhalb von zwei Wochen zur Reaktivierung einer lytischen Infektion kommt (Schweizer et al., 1993).

Versuche mit transgenen Zebrafischen ergaben, dass in vivo eine Methylierung und damit Stilllegung des CMV-Promotors nach Integration erfolgen kann. Das Reporter-gen Luciferase wurde unter der Kontrolle des CMV-Promotors in den transgenen Fischen nach Inkubation in AZC-haltiger Aufzucht-lösung verstärkt exprimiert (Gibbs et al., 1994).

Die Inkubation von Zellkulturen, die seit maximal 30 Tagen mit den vereinfachten Viren infiziert waren, mit AZC führte trotzdem zu keiner Steigerung der viralen Titer im zellfreien Kulturüberstand. Eine Methylierung als alleinige Ursache der herabgesetzten Virustiter ist daher nicht anzunehmen.

5.2.4 Promotor-Interferenz

In retroviralen Vektoren, die ein Gen unter der Kontrolle eines internen Promotors exprimieren, kann es durch gegenseitige negative Beeinflussung des LTR-Promotors und des internen Promotors zu reduzierter Genexpression kommen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Promotor-Interferenz. Es ist von der Art der verwendeten Vektoren und Promotoren abhängig (Emerman & Temin, 1986).

Für foamyvirale Vektoren konnte gezeigt werden, dass die Einführung eines SV40-Promotors zusätzlich zu den LTR-Promotoren und dem IP verschiedene hemmende Wirkungen zeigt. Zum einen wurde ein Reporter gen unter der Kontrolle des heterologen Promotors weniger stark exprimiert, als unter der Kontrolle des foamyviralen IP. Zum anderen zeigten diese Viren auch ein reduziertes Replikationsverhalten, so dass von einer negativen Beeinflussung der foamyviralen Promotoren durch den Fremdpromotor auszugehen ist (Schmidt & Rethwilm, 1997).

Im Falle der vereinfachten PFV ist eine sich negativ auswirkende Interferenz zwischen dem IP und der hybriden LTR oder zwischen den Promotoren beider hybrider LTRs in einem Provirus nicht auszuschließen. Die für den IE CMV-Promotor ungewöhnliche räumliche Nähe zweier identischer Kopien in einem hybriden retroviralen Integrat könnte sich hemmend auf die Aktivität des für die Replikation wichtigen 5'-gelegenen Elementes auswirken. Relativiert wird diese Annahme jedoch durch die Tatsache, dass sowohl pTS12 als auch pTS13, in denen die Anordnung der zwei CMV-Promotoren und des IP der im integrierten Provirus entspricht, nach transienter Transfektion eine mit dem infektiösen Klon pHSRV2 vergleichbare Proteinexpression zeigen.

5.2.5 Deletionen im CMV-Promotor

In Langzeitkulturen TS13-infizierter KMST-6-Zielzellen konnten in einem Fall 20 Tage nach Infektion mittels PCR-Analyse Deletionen im LTR-Bereich festgestellt werden. Durch Restriktionsanalyse der PCR-Produkte konnten die Deletionen in den Bereich des IE CMV Enh./Prom.-Elementes der hybriden LTR lokalisiert werden.

Dabei könnte es sich um defekte Proviren, ähnlich defective interfering virus (DI) handeln, die sich mit undeletierten Viren als Helferviren weiter verbreiten.

Möglicherweise ist dies aber auch als Hinweis auf Veränderungen im CMV-Promotorbereich zu werten, die in Richtung besser replizierender Mutanten weisen. Der CMV-Promotor könnte im Kontext eines viralen Genoms, das aufgrund seines phylogenetischen Hintergrundes ein Replikationspotential hat, das weit über dem der simplifizierten Viren liegt, ein limitierender Faktor sein. Als derartige Bremse der viralen Vermehrung würde er einem starken Selektionsdruck unterliegen, der eine evolutionäre Optimierung herausfordert.

5.2.6 Integration des CMV-Promotors

Die Transkription der integrierten Provirus-DNA wird bei den vereinfachten Foamyviren mit hybrider LTR durch das IE CMV Prom./Enh.-Element gesteuert. Das Cytomegalievirus als Herpesvirus integriert aber normalerweise nicht in das Genom der Wirtszelle. Eine Reduzierung der CMV-Promotor-gesteuerten Transkription von Reportergenen nach Integration in das zelluläre Genom wurde beschrieben. In der gleichen Arbeit zeigte jedoch auch der integrierte CMV-Promotor noch eine höhere Transkriptionsrate als die retrovirale, und damit integrationsabhängige, Rous-Sarcoma-Virus-LTR (Foecking & Hofstetter, 1986). Trotzdem könnte eine Verringerung der Aktivität des CMV-Promotors nach Integration in das Wirtszellgenom für das reduzierte Replikationsverhalten der vereinfachten Foamyviren mit hybriden LTRs mitverantwortlich sein.

5.2.7 Einfluss von Natriumbutyrat

Natriumbutyrat ist ein oft verwendeter Modulator der Genexpression, der vermutlich über eine postrationale Beeinflussung einer Komponente der zellulären Transkriptionsmaschinerie wirkt (Cuisset et al., 1997). Die Reaktivierung latenter Virusinfektionen durch Behandlung von Zellkulturen mit Natriumbutyrat ist für verschiedene virale Erreger, u.a. HIV-1 und das wie CMV zur Herpesvirusgruppe gehörende Epstein-Barr-Virus, beschrieben (Sadaie & Hager, 1994; Saemundsen et al., 1980). Die Stimulierung der durch den CMV-Promotor kontrollierten Transkription mit Natriumbutyrat ist eine etablierte Methode zur Steigerung der Proteinexpression nach transienter Transfektion (Palermo et al., 1991).

Die Inkubation von Zellkulturen, die mit den vereinfachten Viren infiziert waren, mit Natriumbutyrat führte nicht zu einer Steigerung der viralen Proteinexpression. Dies lässt vermuten, dass eine in den rekombinanten Viren möglicherweise auftretende Aktivitätsminderung des CMV-Promotors auf einem Mechanismus beruht, der entweder außerhalb der durch Natriumbutyrat beeinflussten Signalkaskade liegt, oder aber weiter stromabwärts im Informationsfluss eingreift.

5.2.8 Rolle des Bet-Proteins

Die Funktion des Bet-Proteins ist noch nicht endgültig geklärt. Für die Replikation zumindest in vitro ist es nicht essentiell.

Bet-deletierte Mutanten, die durch Einführung eines Stopcodons in den Bel-2-Leserahmen konstruiert worden waren, zeigten gegenüber Wildtypviren ein verändertes Replikationsverhalten. Während die Titer zellgebundener Viren bei bet-deletierten Mutanten und Wildtyp-PFV in einer Arbeit nahezu identisch waren (Baunach et al., 1993), konnte eine etwa 10fache Reduktion der extrazellulären Virustiter in Abwesenheit von Bet festgestellt werden (Yu & Linial, 1993). Bet scheint also für die effiziente Freisetzung viraler Partikel nötig zu sein.

Die genetisch vereinfachten Viren zeigten im Vergleich zu wildtypischen PFV-1 um etwa drei lg-Stufen niedrigere extrazelluläre Virustiter. Diese deutliche Reduzierung kann deshalb zumindest nicht einzig auf die Verkürzung des Bel-2-Leserahmens und damit die nachgewiesene Trunkierung des Bet-Proteins zurückgeführt werden.

Auch ergaben die Versuche zur Steigerung der extrazellulären Virustiter durch thermisches Aufbrechen der Zellen mittels mehrerer Einfrier-/Auftauschritte keine Hinweise auf eine verstärkte Retention der rekombinanten Viren im Zellinneren.

Die Verkürzung des Bel-2-Leserahmens bietet somit ebenfalls keine suffiziente Erklärung für das veränderte Replikationsverhalten der TS12- und TS13-Viren.

5.2.9 Hypothese

Foamyviren sind komplexe Retroviren und unterscheiden sich daher von einfachen Retroviren durch ein fein reguliertes Muster der Genexpression. Zunächst wird unter der Kontrolle des internen Promotors der Transaktivator Tas synthetisiert. Dieser steigert über Aktivierung des IP seine eigene Expression bis genügend Tas vorhanden ist, um auch über Interaktion mit einer niedriger affinen Bindungsstelle den LTR-Promotor der U3-Region zu aktivieren und damit für eine Expression der übrigen viralen Gene zu sorgen (Rethwilm, 1995; Linial, 1999).

Dieses koordinierte Zusammenspiel eines transkriptionalen Transaktivators und zweier Promotoren hat sich im Laufe der Evolution des Virus entwickelt und sorgt unter den in vivo wirkenden Selektionsdrücken für ein optimales Replikationsverhalten. In der Tat erfüllen Foamyviren den (viralen) Sinn des Daseins in nahezu perfekter Art und Weise.

Ihre Persistenz und Apathogenität erlauben es ihnen, ihre genetische Information hoch effizient fortzupflanzen, was durch ihre weite Verbreitung in einer Vielzahl tierischer Wirte anschaulich bewiesen wird.

Der artifizielle Eingriff einer genetischen Vereinfachung durch Einführung einer hybriden LTR mit konstitutiv aktivem Promotor ist möglicherweise in der Lage, das langsam gewachsene Gleichgewicht im System der RNA-Transkription derart zu stören, dass eine Replikation zwar noch möglich ist, jedoch nur in suboptimaler Weise.

5.3 Integration in das zelluläre Genom

Für Foamyviren als Retroviren ist die Integration in das Wirtszellgenom essentieller Bestandteil des Replikationszyklus (Brown, 1997; Enssle et al., 1999). Cytomegalieviren, als Herpesviren, integrieren normalerweise nicht in das chromosomale Genom infizierter Zellen. Tatsächlich scheint die Integration in die zelluläre DNA die durch den CMV-Promotor gesteuerte Expression nachgeschalteter Reportergene eher zu verringern (Foecking & Hofstetter, 1986).

Die Einführung einer inaktivierenden Punktmutation in das aktive Zentrum der Integrase der vereinfachten PFV zerstörte jedoch deren Fähigkeit zur Replikation. Obwohl die Transkription viraler RNAs hier unter der Kontrolle eines Promotors steht, der normalerweise nicht in das zelluläre Genom integriert, ist die Integration auch für die vereinfachten Viren obligat.

Möglicherweise ist der sonst nicht integrierende CMV-Promotor im Kontext einer retroviralen LTR, bzw. eines kompletten Provirus, nun doch integrationsabhängig aktiv, oder die Notwendigkeit zur Integration wird hauptsächlich durch andere Faktoren als die promotorabhängige Transkriptionskontrolle determiniert.

5.4 Bedeutung und Ausblick

5.4.1 Attenuierung retroviraler Erreger durch genetische Vereinfachung

Die genetische Vereinfachung von HIV-1 wurde als Möglichkeit zur Herstellung einer effizienten Vakzine gegen AIDS vorgeschlagen (Temin, 1993). Das menschliche Genom enthält eine Vielzahl integrierter einfacher retroviraler Proviren als humane endogene Retroviren. Einfache exogene Retroviren konnten aber nicht aus menschlichem Material isoliert werden. Offenbar besitzt der menschliche Organismus effiziente Abwehrmechanismen gegen einfache Retroviren, die zur Entwicklung der komplexeren Retroviren führten. Ein vereinfachtes, auf die retroviralen Grundgene Gag, Pro, Pol und Env reduziertes HI-Virus könnte aufgrund einer beeinträchtigten Replikationsfähigkeit möglicherweise als AIDS-Vakzine genutzt werden (Temin, 1993).

Tatsächlich war eine teilweise vereinfachte HIV-1-Variante mit hybrider LTR zur Replikation in Zellkulturen fähig. Bei diesem Konstrukt war ein Teil der U3-Region mit Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren gegen ein immediate early gene Enhancer-Element des Cytomegalievirus ausgetauscht und das Tat-Gen durch Einführung von Stopcodons funktional deletiert worden. Dieses vereinfachte HIV besaß eine deutlich verlangsamte Replikationskinetik (Chang & Zhang, 1995).

Die vorliegende Arbeit zeigt für ein weiteres humaninfektiöses Retrovirus, das PFV-1, dass eine genetische Vereinfachung und, wahrscheinlich in Abhängigkeit von dem verwendeten Promotorelement, eine Reduzierung der Replikationsfähigkeit möglich ist. Zusammen mit der Deletion der akzessorischen Gene könnte dies zu einer Attenuierung des viralen Erregers führen.

5.4.2 Foamyvirale Vektorsysteme

Neben ihrem ungewöhnlichen Vermehrungszyklus ist die potentielle Verwendung als Vektoren zur Gentherapie ein Hauptgrund für das wissenschaftliche Interesse an Foamyviren.

Foamyviren sind aus verschiedenen Gründen gut als Genfähren geeignet. Sie haben ein äußerst breites Wirtsspektrum. Bis heute ist keine Zelllinie bekannt, die in vitro nicht infiziert werden kann. Als Retroviren integrieren sie nach Infektion in das Genom der

Zielzelle, eine Voraussetzung für stabile Expression des therapeutischen Gens. Aufgrund ihres für Retroviren großen Genoms besitzen foamyvirale Vektoren dabei eine hohe Verpackungskapazität. Wichtig für die medizinische Anwendung ist weiterhin, dass bisher keine foamyvirus-korrelierte Pathogenität bekannt ist und Foamyviren im Menschen anscheinend nicht horizontal weiter gegeben werden. Da sie natürlicherweise nicht in der menschlichen Bevölkerung vorkommen, gibt es keine präexistenten neutralisierenden Antikörper. Wichtig für die Therapie neoplastischer Erkrankungen ist außerdem, dass präferentiell proliferierende Zellen erreicht werden (Lindemann et al., 2000; Lecellier & Saib, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konstruktion von replikationskompetenten Foamyviren mit heterologen Promotoren in hybriden LTRs möglich ist. Damit ist die Voraussetzung für die Erstellung von Foamyvirusvektoren mit dem Therapieziel angepassten Promotoren gegeben. Ein Problem foamyviraler Vektoren war bisher das Phänomen der Promotor-Interferenz zwischen einem zusätzlich eingeführten und vermutlich dem foamyviralen IP (Schmidt & Rethwilm, 1995). Die potentielle Unabhängigkeit von Tas macht den foamyviralen internen Promotor überflüssig. Durch funktionale Deletion des foamyviralen IP unter Erhaltung des Env-Leserasters könnte eine neuer, gewebespezifisch aktiver, interner Promotor 3' des Env-Gens die Expression eines therapeutischen Gens steuern. Auch die Konstruktion einer gewebespezifisch aktiven LTR ist denkbar.

Eine mögliche Anwendung von Vektoren mit gewebespezifischen Promotoren ist dabei der Transport und die Expression von Suizidgenen im Rahmen der Krebstherapie.

5.4.3 Konstruktion einer effizienteren hybriden LTR

Genetisch vereinfachte BLV-Varianten zeigten gegenüber Wildtyp-BLV nur ein geringfügig reduziertes Replikationsverhalten (Boris-Lawrie et al., 1997). Die Konstrukte dieser Studie beinhalteten ebenfalls eine hybride LTR, jedoch unter Verwendung des Promotorelementes des SNV, eines einfachen Retrovirus.

In der vorliegenden Arbeit wurde wegen der normalerweise starken Expression der CMV-Promotor als Bestandteil der hybriden LTR gewählt. Dieser entstammt einem Herpesvirus und ist daher entwicklungsgeschichtlich weit von den Retroviren entfernt. Das Promotorelement eines einfachen Retrovirus könnte, aufgrund seiner

phylogenetischen Nähe, der genetischen Umgebung eines vereinfachten PFV besser angepasst sein. Die Konstruktion einer hybriden LTR mit dem Promotorbereich der U3-Region eines einfachen Retrovirus wäre daher ein interessante Weiterführung dieser Arbeit.

6 Zusammenfassung

Foamyviren (Spumaviridae) werden neuerdings von den übrigen Retroviren (Orthoretroviridae) abgegrenzt. Durch verschiedene Besonderheiten in ihrem Replikationszyklus, wie der Möglichkeit zur intrazellulären Retrotransposition oder der reversen Transkription spät im Vermehrungszyklus, nehmen sie eine funktionale Sonderstellung zwischen Retro-, Hepadnaviren und Retrotransposons ein.

Aufgrund des Aufbaus ihres Genoms, das neben dem minimalen Gensatz der einfachen Retroviren Gag, Pro, Pol und Env noch zwei weitere akzessorische Leserahmen aufweist, werden sie zu den komplexen Retroviren gerechnet. Einer dieser zusätzlichen Leserahmen kodiert für den transkriptionalen Transaktivator Tas, der für die Replikation essentiell ist.

Ein infektiöser Klon einer genetisch vereinfachten Variante des Primaten Foamy Virus Typ 1 (PFV-1) wurde konstruiert, der den konstitutiv aktiven immediate early gene (IE) Promotor und Enhancer des Cytomegalievirus (CMV) im Kontext einer hybriden LTR trägt. Dieses Konstrukt, sowie ein weiteres mit funktionaler Deletion des Tas-Gens führten nach Transfektion in Zellkulturen zur Freisetzung genetisch vereinfachter, infektiöser Viren, deren Replikationskompetenz und genetische Stabilität nachgewiesen wurde.

Die rekombinanten Viren zeigten dabei um etwa drei lg-Stufen erniedrigte Virustiter im zellfreien Kulturüberstand und eine reduzierte Replikationskinetik. Versuche zur Steigerung der erreichbaren Virustiter durch thermisches Aufbrechen der Zellen, Inkubation mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin (AZC) und Induktion mit dem Transkriptions-Stimulator Natriumbutyrat wurden unternommen, resultierten aber nicht in einer Steigerung der Freisetzung infektiöser Partikel oder der viralen Genexpression.

Die Promotor-Aktivität der hybriden LTR wurde in einem transienten Reporterassay unter Verwendung des Luciferasegens quantifiziert und war mit der der tas-stimulierten foamyvirealen LTR vergleichbar.

Eine Mutation des DD35E-Motivs im aktiven Zentrum der Integrase zu DA35E führte zur Replikationsunfähigkeit der vereinfachten Viren. Obwohl der Promotor eines nicht

integrierenden Virus in die hybride LTR eingeführt wurde, blieb die Integration ein obligates Ereignis für die Replikation der Viren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine genetische Vereinfachung des PFV-1 und Replikation mit einem heterologen Promotor in einer hybriden LTR möglich ist. Damit ist eine Voraussetzung für die Konstruktion PFV-basierter Vektoren zur Gentherapie unter Verwendung gewebespezifischer Promotoren gegeben.

7 Abkürzungen

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

Fc	kristallisierbares Fragment	LB	Lipidbilayer
FCS	Fötale Kälberserum	lg	Logarithmus zur Basis 10
FeLV	Feline Leukemia Virus	LTR	long terminal repeat
FFV	Feline Foamy Virus	M	molar
Fig.	Figur	m	milli
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	μ	mikro
G	Guanin	MA	Matrix
g	Gramm	MEM	minimal essential medium
Gag	gruppenspezifisches Antigen	MES	2-(N-Morpholino)-Ethan-Sulfonsäure
Gen.	Generation	Met	Methionin
GFP	green fluorescent protein	Mg	Magnesium
gp	Glykopeptid	Min.	Minuten
GR	Glycin-Arginin-reiche Boxen	mind.	mindestens
HBV	Hepatitis-B Virus	MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
His	Histidin	Mn	Mangan
HIV	Human Immunodeficiency Virus	mol	Mol
HSRV	Humanes Spumaretrovirus	MPMV	Mason-Pfizer Monkey Virus
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus	MuLV	Murine Leukemia Virus
hu	human	N	normal
ICA	infectious centre assay	n	nano
IE	immediate early gene	NC	Nukleokapsid
IN	Integrase	Nef	negative factor
inkl.	inklusive	neo	Neomycin
IP	interner Promotor	NLS	nukleäres Lokalisations-signal
IRES	internal ribosome entry site	NRE	negativ regulierendes Element
k	kilo	nt	Nukleotide
kb	Kilobasen	ORF	open reading frame
l	Liter	OD	optische Dichte

p	Peptid	RRE	rev response element
p	pico	RSV	Rous Sarcoma Virus
p	Plasmid	RT	reverse Transkriptase
ψ	Psi (Verpackungssignal)	RxRE	rex response element
PAGE	Polyacrylamidgel- Elektrophorese	S	Schwefel
PBS	phosphate buffered saline	SA	Spleißakzeptor
PBS	primer binding site	SD	Spleißdonator
PCR	polymerase chain reaction	SDS	Sodiumdodecylsulfat
PFU	plaque forming units	Sek.	Sekunden
PFV	Primate Foamy Virus	SFV	Simian Foamy Virus
pH	potentia hydrogenii	SFFV	Spleen Focus Forming Virus
p.i.	post infectionem	SIV	Simian Immunodeficiency Virus
PMSF	Phenylmethylsulfonyl- fluorid	SNV	Spleen Necrosis Virus
PNK	Polynukleotidkinase	Std.	Stunden
POD	Peroxidase	SU	surface
Pol	Polymerase	s.u.	siehe unten
PPP	Protein-Proben-Puffer	SV40	Simian Virus 40
PPT	Polypurintrakt	T	Thymin
PR	Protease	TAR	transactivator response region
Pro	Protease	Tas	Transaktivator der Spumaviren
Prom.	Promotor	Tat	transactivator of transcription
p.t.	post transfectionem	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl- ethylendiamin
R	redundante Region	TM	transmembran
Rev	regulator of expression of virion proteins	TRE	tas / tax response element
RH	RNase H	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan
RIPA	Radio-Immuno- Präzipitations-Assay		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Rotationen pro Minute		

U	unique	Vif	viral infectivity factor
U	Uracil	Vpr	viral protein rapid
u	units	Vpu	viral protein u
u.a.	unter anderem	z.B.	zum Beispiel
UV	ultraviolett	&	und
V	Volt	%	Prozent

8 Literatur

Achong, B.G., Mansell, P.W.A., Epstein, M.A. & Clifford, P. (1971). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 46: 299-307

Achong, B.G. & Epstein, M.A. (1978). Preliminary seroepidemiological studies on the human syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 40: 175-181.

Achong, B.G. & Epstein, M.A. (1983). Naturally occurring antibodies to the human syncytial virus in West Africa. *J. Med. Virol.* 11: 53-57.

Aguzzi, A. (1993). The foamy virus family: molecular biology, epidemiology and neuropathology. *Biochim. Biophys. Acta* 1155: 1-24.

Ali, M., Taylor, G.P., Pitman, R.J., Parker, D., Rethwilm, A., Cheingsong-Popov, R., Weber, J.N., Bieniasz, P.D., Bradley, J. & McClure, M.O. (1996). No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12: 1473-1483.

Baldwin, D.N. & Linial, M.L. (1998). The roles of pol and env in the assembly pathway of human foamy virus. *J. Virol.* 72: 3658-3665.

Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209-1211.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.

Baunach, G., Maurer, B., Hahn, H., Kranz, M. & Rethwilm, A. (1993). Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames. *J. Virol.* 67: 5411-5418.

Bender, M.A., Palmer, T.D., Gelinas, R.E. & Miller, A.D. (1987). Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the gag region. *J. Virol.* 61: 1639-1646.

Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D. & Rethwilm, A. (1998). Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* 250: 194-204.

Boris-Lawrie, K. & Temin, H.M. (1995). Genetically simpler bovine leukemia virus derivatives can replicate independently of Tax and Rex. *J. Virol.* 69: 1920-1924.

Boris-Lawrie, K., Altanerova, V., Altaner, C., Kucerova, L. & Temin, H.M. (1997). In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex. *J. Virol.* 71: 1514-1520.

Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B. & Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41: 521-530.

Bowerman, B., Brown, P.O., Bishop, J.M. & Varmus, H.E. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev.* 3: 469-478.

Brown P.O. (1997). Integration. In *Retroviruses*, pp. 161-203. Edited by J.M. Coffin, S.H. Hughes & H.E. Varmus. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Bukrinsky, M.I., Sharova, N., Dempsey, M.P., Stanwick, T.L., Bukrinskaya, A.G., Haggerty, S. & Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6580-6584.

Callahan, M.E., Switzer, W.M., Matthews, A.L., Roberts, B.D., Heneine, W., Folks, T.M. & Sandstrom, P.A. (1999). Persistent Zoonotic Infection of a Human with Simian Foamy Virus in the Absence of an Intact orf-2 Accessory Gene. *J. Virol.* 73: 9619-9624.

Chang, L.J. & Zhang, C. (1995). Infection and replication of Tat- human immunodeficiency viruses: genetic analyses of LTR and tat mutations in primary and long-term human lymphoid cells. *Virology* 211: 157-169.

Chomet, P.S. (1991). Cytosine methylation in gene-silencing mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3: 438-443.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. & et al. (1986). Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697.

Coffin, J.M. (1990). Retroviridae and their replication. In *Fundamental Virology*, 2nd edn, pp. 645-708. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press

Cuisset, L., Tichonicky, L., Jaffray, P. & Delpech, M. (1997). The effects of sodium butyrate on transcription are mediated through activation of a protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272: 24148-24153.

Cullen, B.R. (1991). Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *J. Virol.* 65: 1053-1056.

Dalglish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. & Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767.

DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. & Calos, M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7: 379-387.

Emerman, M. & Temin, H.M. (1986). Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors. *Nucleic Acids Res.* 14: 9381-9396

Enders, J. & Peebles, T. (1954). Propagation in tissue culture of cutopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86: 277-287

Enssle, J., Jordan, I., Mauer, B. & Rethwilm, A. (1996). Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the gag protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4137-4141.

Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U. & Rethwilm, A. (1997). Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J. Virol.* 71: 7312-7317.

Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D. & Rethwilm, A. (1999). An active human foamy virus integrase is required for viral replication. *J. Gen. Virol.* 80: 1445-1452.

Erlwein, O. & Rethwilm, A. (1993). BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology* 196: 256-268.

Erlwein, O., Bieniasz, P.D. & McClure, M.O. (1998). Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J. Virol.* 72: 5510-5516.

Ewart, G.D., Sutherland, T., Gage, P.W. & Cox, G.B. (1996). The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J. Virol.* 70: 7108-7115.

Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Müller, J.G. & Rethwilm, A. (1998). Foamy virus particle formation. *J. Virol.* 72: 1610-1615.

Foecking, M.K. & Hofstetter, H. (1986). Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* 45: 101-105.

Freed, E.O. & Martin, M.A. (2001). HIVs and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1971-2041. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Gibbs, P.D., Peek, A. & Thorgaard, G. (1994). An in vivo screen for the luciferase transgene in zebrafish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 307-316.

Goepfert, P.A., Shaw, K.L., Ritter, G.D. & Mulligan, M.J. (1997). A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 71: 778-784.

Goff, S.P. (2001). Retroviridae: The retroviruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 1871-1939. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Gould, S.J. & Subramani, S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* 175: 5-13.

Guan, Y., Whitney, J.B., Detorio, M. & Wainberg, M.A. (2001). Construction and in vitro properties of a series of attenuated simian immunodeficiency viruses with all accessory genes deleted. *J. Virol.* 75: 4056-4067.

Hahn, H., Baunach, G., Bräutigam, S., Mergia, A., Neumann-Haefelin, D., Daniel, M.D., McClure, M.O. & Rethwilm, A. (1994). Reactivity of primate sera to foamy virus gag and bet proteins. *J. Gen. Virol.* 75: 2635-2644.

He, F., Blair, W.S., Fukushima, J. & Cullen, B.R. (1996). The human foamy virus bel-1 transcriptional factor is a sequence-specific DNA binding protein. *J. Virol.* 70: 3902-3908.

Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J. & Rethwilm, A. (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the pol region required to transfer human foamy virus vectors. *72*: 6307-6314.

Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jármy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenröder, O. & Rethwilm, A. (2000). Efficient intra-cellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *EMBO J.* 19: 3436-3445.

Heneine, W., Switzer, W.M., Sandstrom, P., Brown, J., Vedapuri, S., Schable, C.A., Khan, A.S., Lerche, N.W., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., Chapman, L.E. & Folks, T.M. (1998). Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nat. Med.* 4: 403-407.

Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E.K., Murthy, K.K., Schneider, J., Mergia, A. & Luciw, P.A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* 201: 187-199.

Imrich, H., Müller, H. & Rethwilm, A. (1999). Pathogenicity of primate foamy virus infection in nude mice. Abstract in *Third International Conference on Foamy Viruses*. Gif-sur-Yvette, Frankreich

Jordan, I., Enssle, J., Güttler, E., Mauer, B. & Rethwilm, A. (1996). Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA. *Virology* 224: 314-319.

Kang, Y., Blair, W.S. & Cullen, B.R. (1998). Identification and functional characterization of a high-affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. *J. Virol.* 72: 504-511.

Keller, A., Partin, K.M., Lochelt, M., Bannert, H., Flugel, R.M. & Cullen, B.R. (1991). Characterization of the transcriptional trans activator of human foamy retrovirus. *J. Virol.* 65: 2589-2594.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C. & Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768.

Kögel, D., Aboud, M. & Flügel, R.M. (1995). Molecular biological characterization of the human foamy virus reverse transcriptase and ribonuclease H domains. *Virology* 213: 97-108.

Kulkosky, J., Jones, K.S., Katz, R.A., Mack, J.P. & Skalka, A.M. (1992). Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2331-2338.

Kupiec, J.J., Tobaly-Tapiero, J., Canivet, M., Santillana-Hayat, M., Flügel, R.M., Peries, J. & Emanoil-Ravier, R. (1988). Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res.* 16: 9557-9565.

Lecellier, C.H. & Saib, A. (2000). Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology* 271: 1-8.

Lee, K.J., Lee, A.H. & Sung, Y.C. (1993). Multiple positive and negative cis-acting elements that mediate transactivation by bell1 in the long terminal repeat of human foamy virus. *J. Virol.* 67: 2317-2326.

Lindemann, D. & Rethwilm, A. (1998). Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J. Virol.* 72: 4088-4094.

Lindemann, D., Heinkelein, M. & Rethwilm, A. (2000). Aspects of foamy virus vectors: Host range and replication-competent vectors. In *Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy*, pp. 515-522. Edited by A. Cid-Arregui & A. García-Carrancá. Natick, MA: Eaton Publishing

Linial, M.L. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J. Virol.* 73: 1747-1755.

Linial, M. (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol.* 8: 284-289.

Loh, P.C., Matsuura, F. & Mizumoto, C. (1980). Seroepidemiology of human syncytial virus: antibody prevalence in the Pacific. *Intervirology* 13: 87-90.

Löchelt, M., Zentgraf, H. & Flügel, R.M. (1991). Construction of an infectious DNA clone of the full-length human spumaretrovirus genome and mutagenesis of the bel 1 gene. *Virology* 184: 43-54.

Löchelt, M., Muranyi, W. & Flügel, R.M. (1993). Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7317-7321.

Malmquist, W.A., Van der Maaten, M.J. & Boothe, A.D. (1969). Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* 29: 188-200.

Maurer, B., Serfling, E., Meulen, V.t. & Rethwilm, A. (1991). Transcription factor AP-1 modulates the activity of the human foamy virus long terminal repeat. *J. Virol.* 65: 6353-6357.

Mergia, A., Pratt-Lowe, E., Shaw, K.E., Renshaw-Gegg, L.W. & Luciw, P.A. (1992). cis-acting regulatory regions in the long terminal repeat of simian foamy virus type 1. *J. Virol.* 66: 251-257.

Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P.D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M.O. & Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J. Virol.* 71: 7305-7311.

Modrow, S. & Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*, 1. Aufl., Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag

Müller, H.K., Ball, G., Epstein, M.A., Achong, B.G., Lenoir, G. & Levin, A. (1980). The prevalence of naturally occurring antibodies to human syncytial virus in East African populations. *J. Gen. Virol.* 47: 399-406.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.

Namba, M., Nishitani, K., Hyodoh, F., Fukushima, F. & Kimoto, T. (1985). Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with ⁶⁰Co gamma rays. *Int. J. Cancer* 35: 275-280.

Nassal, M. & Schaller, H. (1993). Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol.* 1: 221-228.

Pahl, A. & Flugel, R.M. (1993). Endonucleolytic cleavages and DNA-joining activities of the integration protein of human foamy virus. *J. Virol.* 67: 5426-5434.

Palermo, D.P., DeGraaf, M.E., Marotti, K.R., Rehberg, E. & Post, L.E. (1991). Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J. Biotechnol.* 19: 35-47.

Panganiban, A.T. & Temin, H.M. (1983). The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production. *Nature* 306: 155-160.

Pfrepper, K.-I., Löchelt, M., Rackwitz, H.-R., Schnölzer, M., Heid, H. & Flügel, R.M. (1999). Molecular characterization of proteolytic processing of the gag proteins of human spumavirus. *J. Virol.* 73: 7907-9711.

Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J. Virol.* 73: 2613-2621

Purcell, D.F. & Martin, M.A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* 67: 6365-6378.

Rethwilm, A., Darai, G., Rösen, A. & Flügel, R.M. (1987). Molecular cloning of the genome of human spumaretrovirus. *Gene* 59: 19-28.

Rethwilm, A., Baunach, G., Netzer, K.O., Maurer, B., Borisch, B. & Meulen, V.t. (1990). Infectious DNA of the human spumaretrovirus. *Nucleic Acids Res.* 18: 733-738.

Rethwilm, A., Erlwein, O., Baunach, G., Maurer, B. & ter Meulen, V. (1991). The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 941-945.

Rethwilm, A. (1995). Regulation of foamy virus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 193: 1-24.

Rethwilm, A. (1996). Unexpected replication pathways of foamy viruses. *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13(Suppl.1): S248-S253.

Riggs, J.L., Oshiro, L.S., Taylor, D.O.N. & Lennette, E.H. (1969). Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* 222: 1190-1191.

Sadaie, M.R. & Hager, G.L. (1994). Induction of developmentally programmed cell death and activation of HIV by sodium butyrate. *Virology* 202: 513-518.

Saemundsen, A.K., Kallin, B. & Klein, G. (1980). Effect of n-butyrate on cellular and viral DNA synthesis in cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Virology* 107: 557-561.

Saib, A., Peries, J. & The, H.d. (1993). A defective human foamy provirus generated by pregenome splicing. *EMBO J.* 12: 4439-4444.

Saib, A., Peries, J. & de The, H. (1995). Recent insights into the biology of the human foamy virus. *Trends Microbiol.* 3: 173-178.

Saib, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J. & de The, H. (1997). Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J. Virol.* 71: 1155-1161.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Sarngadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schupbach, J. & Gallo, R.C. (1984). Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 224: 506-508.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kD. *Anal. Biochem.* 166: 368-379

Schliephake, A.W. & Rethwilm, A. (1994). Nuclear localization of foamy virus gag precursor protein. *J. Virol.* 68: 4946-4954.

Schmidt, M. & Rethwilm, A. (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* 210: 167-178.

Schmidt, M., Herchenröder, O., Heeney, J. & Rethwilm, A. (1997). Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology* 230: 167-178.

Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyo, E.M. & Pavlakis, G.N. (1990). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64: 2519-2529.

Schweizer, M., Renne, R. & Neumann-Haefelin, D. (1989). Structural analysis of proviral DNA in simian foamy virus (LK-3) - infected cells. *Arch. Virol.* 10: 103-114.

Schweizer, M., Fleps, U., Jackle, A., Renne, R., Turek, R. & Neumann-Haefelin, D. (1993). Simian foamy virus type 3 (SFV-3) in latently infected Vero cells: reactivation by demethylation of proviral DNA. *Virology* 192: 663-666.

Schweizer, M., Turek, R., Hahn, H., Schliephake, A., Netzer, K.-O., Eder, G., Reinhardt, M., Rethwilm, A. & Neumann-Haefelin, D. (1995). Markers of foamy virus (FV) infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected FV prevalence in man. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 11: 161-170.

Schweizer, M., Falcone, V., Gange, J., Turek, R. & Neumann-Haefelin, D. (1997). Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J. Virol.* 71: 4821-4824.

Stinski, M.F. (1990). Cytomegalovirus and its replication. In *Fundamental Virology*, 2nd edn, pp. 930-950. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press

Summers, J. & Mason, W.S. (1982). Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29: 403-415.

Temin, H.M. & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211-1213.

Temin, H.M. (1993). A proposal for a new approach to a preventive vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4419-4420.

Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M.-C., Lecellier, C.-H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M.-L., The, H.d. & Saib, A. (2000). Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J. Virol.* 74: 4064-4073.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354

Westarp, M.E., Kornhuber, H.H. & Flügel, R.M. (1992). Human spuma retrovirus antibodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Psych. Brain Res.* 1: 1-4.

Wick, G., Trieb, K., Aguzzi, A., Recheis, H., Anderl, H. & Grubeck-Loebenstein, B. (1993). Possible role of human foamy virus in Graves' disease. *Intervirology* 35: 101-107.

Yang, P., Zemba, M., Aboud, M., Flügel, R.M. & Löchelt, M. (1997). Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus. *Virus Genes* 15: 17-23.

Young, D., Samuels, J. & Clarke, J.K. (1973). A foamy virus of possible human origin isolated in BHK-21 cells. *Arch. ges. Virusforsch.* 42: 228-234.

Yu, S.F. & Linial, M.L. (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: 6618-6624.

Yu, S.F., Baldwin, D.N., Gwynn, S.R., Yendapalli, S. & Linial, M.L. (1996). Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271: 1579-1582.

Yu, S.F., Sullivan, M.D. & Linial, M.L. (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J. Virol.* 73: 1565-1572.

Zakian, V.A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270: 1601-1607.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Axel Rethwilm, in dessen Labor und Arbeitsgruppe diese Dissertation angefertigt wurde, für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Unterstützung, die ich während der ganzen Zeit erfahren durfte.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Jörg Enssle bedanken, der diese Arbeit betreute, mich die verwendeten Arbeitstechniken lehrte und stets ein offenes Ohr für alle meine Fragen hatte.

Auch die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe bzw. des Institutes, Dr. Dirk Lindemann, Dr. Martin Heinkelein, Dr. Horst Imrich, Dr. Ingolf Berberich, Thomas Pietschmann, Astrid Moebes, Michael Bock, Nicole Fischer und Bettina Mauer, trugen mit unzähligen Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Veröffentlichungen

Schenk, T., Enssle, J., Fischer, N. & Rethwilm, A. (1999). Replication of a foamy virus mutant with a constitutively active U3 promoter and deleted accessory genes. *J. Gen. Virol.* 80, 1591-1598

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Thomas Schenk
Geboren: 07.02.1974
Geburtsort: Würzburg

Schulbildung

1980 - 1984 Grundschule Leverkusen
1984 - 1987 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Leverkusen
1987 - 1993 Friedrich-Koenig-Gymnasium Würzburg
05/1993 Abitur

Hochschulstudium

ab 11/1993 Stipendium nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz
11/1993 – 04/1994 Studium der Chemie an der Universität Würzburg
ab 05/1994 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
03/1996 Physikum
03/1997 1. Staatsexamen
04/1997 – 11/1998 Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Virologie
08/1999 2. Staatsexamen
10/1999 - 08/2000 Praktisches Jahr
10/1999 – 02/2000 Abteilung für Medizinische Genetik der Univ. Würzburg
02/2000 – 04/2000 Chirurgie an der Universitätsklinik Würzburg
04/2000 – 06/2000 Chirurgie am Concord Hospital, Univ. of Sydney, Australien
06/2000 – 08/2000 Innere Medizin am Inselspital Bern, Schweiz
11/2000 3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit 01/2001 Arzt im Praktikum am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg