

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

**Vorstände: Professor Dr. med. Axel Rethwilm**

**Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig**

# **Etablierung eines proviralen molekularen Klons des Equine Foamy Virus (EFV)**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Markus Nistal**

**aus Oldenburg**

**Würzburg, Dezember 2009**

**Referent:** Prof. Dr. med. Axel Rethwilm

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brehm

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juni 2010**

**Der Promovend ist Arzt.**

**Meinen Eltern**

**Martina Nistal und Dr. Matthias Nistal**

**gewidmet.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Foamyviren</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Forschungsgeschichte und Bedeutung der Foamyviren	1
1.1.2.	Genomische Organisation und Struktur der Foamyviren	4
1.1.3.	Replikation der Foamyviren im Überblick	7
<b>1.2.</b>	<b>Partikelreifung und Ausknospung bei Orthoretroviren und Spumaretroviren</b>	<b>8</b>
1.2.1.	Partikelreifung	9
1.2.2.	Freisetzung der Viruspartikel	12
<b>1.3.</b>	<b>Das Equine Foamy Virus (EFV)</b>	<b>15</b>
<b>1.4.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1.</b>	<b>Material</b>	<b>18</b>
2.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.2.	Chemikalien	19
2.1.3.	Enzyme	21
2.1.4.	Kits	21
2.1.5.	Oligonukleotide (Primer)	21
2.1.5.1.	Oligonukleotide zum Sequenzieren	21
2.1.5.2.	Oligonukleotide zur PCR-Mutagenese	22
2.1.5.3.	Oligonukleotide zur präparativen PCR	23
2.1.5.4.	Oligonukleotide zur diagnostischen PCR	23
2.1.6.	Plasmide	23
2.1.7	Bakterienstämme (transformationskompetent)	24
2.1.8.	Zelllinien	24
2.1.9.	Lösungen, Puffer und Medien	24
2.1.9.1.	Bakterienkultur	24
2.1.9.2.	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Mini-Präp)	25
2.1.9.3.	Agarosegel-Elektrophorese	26

2.1.9.4.	Zellkultur	26
2.1.9.5.	Sequenzierung	27
<b>2.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1.	Vermehrung, Klonierung und Nachweis von DNA	28
2.2.1.1.	Transformation kompetenter Bakterien	28
2.2.1.2.	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab	28
2.2.1.3.	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab	29
2.2.1.4.	Präparation von DNA aus Zellkulturen	30
2.2.1.5.	Photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA	31
2.2.1.6.	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
2.2.1.7.	Klenow-Reaktion	32
2.2.1.8.	Dephosphorylierung von 5´-Enden	33
2.2.1.9.	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.1.10.	Aufreinigung von DNA aus Reaktionsgemischen	34
2.2.1.11.	Agarosegel-Elektrophorese	34
2.2.1.12.	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	35
2.2.1.13.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.1.14.	Klonierung von PCR-Produkten	37
2.2.1.15.	Mutagenese von Plasmiden per PCR	38
2.2.1.16.	Sequenzierung und Sequenzanalyse	39
2.2.2.	Zellkultur und Virusanzucht	40
2.2.2.1.	Zellkultur	40
2.2.2.2.	Transfektion von 293T-Zellen	40
2.2.2.3.	Infektion von Zielzellen und Viruskultur	41
2.2.2.4.	Färbung und Mikroskopie von Zellkulturen	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>3.1.</b>	<b>Analyse vorliegender Konstrukte mit vollständigem EFV-Genom (pEFV)</b>	<b>44</b>
3.1.1.	Sequenz- und Restriktionsanalyse von pEFV-Konstrukten	45
3.1.2.	Detaillierte Charakterisierung von expressionskritischen Positionen im klonierten EFV-Genom	55

<b>3.2.</b>	<b>Eliminierung expressionskritischer Insertionen und Mutationen</b>	<b>58</b>
3.2.1.	Subklonierung von pEFV-Fragmenten	58
3.2.2.	PCR-Mutagenese von Stopp-Mutationen, Eliminierung der Insertion	64
3.2.3.	Zusammenfügen von korrigierten EFV-Fragmenten	72
<b>3.3.</b>	<b>Expression von infektiösem Virus in Zellkultur</b>	<b>78</b>
3.3.1.	Transfektion von 293T-Zellen, Gewinnung von Virusüberstand	78
3.3.2.	Infektion von BHK-Zellen mit Überständen transfizierter Zellen, Viruskultur	79
3.3.3.	Infektion von ED-Zellen mit Überständen transfizierter Zellen, Viruskultur	80
3.3.4.	Infektion von BHK- und ED-Zellen mit Virusüberstand	80
3.3.5.	Versuch der Virusexpression in immunglobulinarmen und serumfreien Zellkulturen	81
3.3.6.	Versuch der Virusexpression mit größeren DNA-Mengen	81
<b>3.4.</b>	<b>Lichtmikroskopische Beobachtung potentiell infizierter Zellen</b>	<b>82</b>
<b>3.5.</b>	<b>Nachweisversuch von viraler DNA</b>	<b>84</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>97</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Foamyviren

### 1.1.1. Forschungsgeschichte und Bedeutung der Foamyviren

Foamyviren (FV) sind komplexe Retroviren, die aufgrund einiger deutlicher Unterschiede zu Orthoretroviren taxonomisch in der Familie der *Retroviridae* eine eigene Subfamilie, die *Spumaretrovirinae* bilden. Die Bezeichnung Foamyvirus oder Spumavirus ist auf den typischen zytopathogenen Effekt (CPE) von Foamyviren zurückzuführen. Infizierte adhärenente Zellkulturen zeigen eine prominente Vakuolisierung und Synzytienbildung, die mikroskopisch als „schaumig“ beschrieben wird (*foam* (engl.); *spuma* (lat.) „Schaum“).

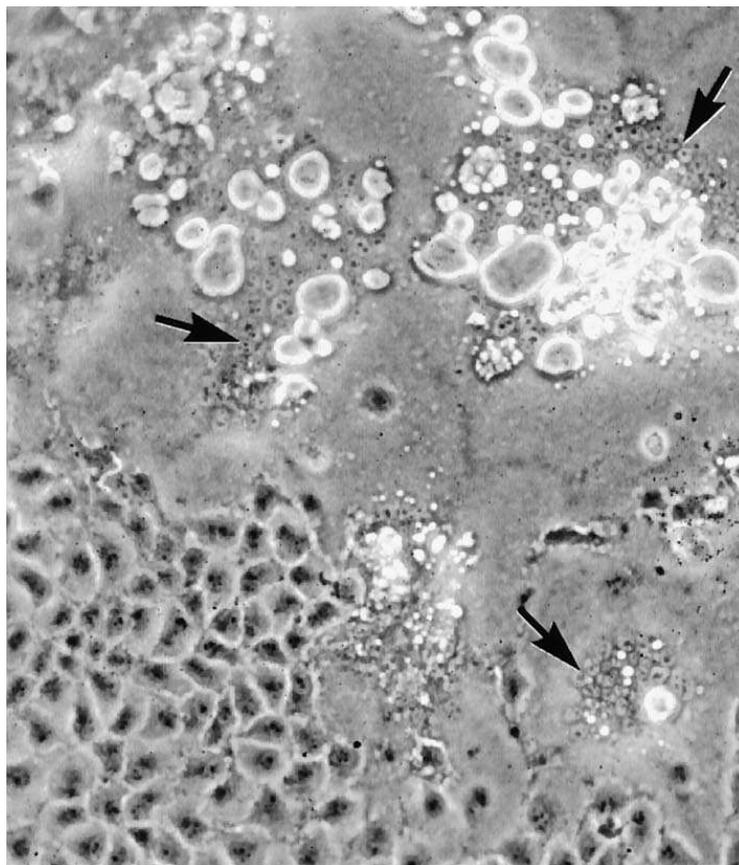


Abb. 1.1.: Foamyvirus-typischer CPE, hier von Equine Foamy Virus in adhärenente Zellkultur von menschlichen U373-MG-Zellen (aus Tobaly-Tapiero et al. 2000).

Foamyviren sind seit den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts bekannt, als der typische zytopathogene Effekt in Affennierenzellkulturen beobachtet wurde (Enders und Peebles 1954), der sich zellfrei auf andere Kulturen übertragen ließ, was zu der Postulierung und Beschreibung eines viralen Verursachers führte (Plummer 1962). Die bahnbrechende Entdeckung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Baltimore 1970) beschrieb eine entscheidende Eigenschaft der Retroviren, zu denen nach der Entdeckung einer Reverse-Transkriptase-Aktivität in Virusisolaten (Parks et. al. 1971) auch die Foamyviren gezählt werden.

In den folgenden Jahrzehnten wurden von verschiedenen Säugetierarten Foamyviren isoliert, die als eigene Arten in der Subfamilie der *Spumaretrovirinae* geführt werden. Als SFV (*simian foamy virus*) wurden Virusisolate von diversen Primaten bezeichnet, beschrieben sind beispielsweise Isolate von Altweltaffen und Menschenaffen wie Gorillas (SFVgor; Bieniasz et. al. 1995) und Schimpansen (SFVcpz; Hooks et. al. 1972), aber auch von Neuweltaffen wie dem Klammeraffen (SFVspm; Hooks et al. 1973, Thümer et al. 2007). Außerdem wurden von nicht-Primatenspezies Foamyviren isoliert, so das FFV (*feline foamy virus*) von Katzen (Riggs et al. 1969; Helps and Harbour 1997), das BFV (*bovine foamy virus*) von Rindern (Malmquist et al. 1969, Renshaw et al. 1991) und das EFV (*equine foamy virus*) von Pferden (Tobaly-Tapiero et. al. 2000).

Ein von einem Patienten mit Nasopharynxkarzinom isoliertes Virus (Achong et al. 1971) wurde zunächst als HFV (*human foamy virus*) oder HSRV (*human spumaretrovirus*) bezeichnet. In den 1990er Jahren führten mehrere seroepidemiologische Untersuchungen zum möglichen Zusammenhang von retroviraler Infektion und verschiedenen Erkrankungen zu dem Resultat, dass Menschen kein natürliches Reservoir für Foamyviren sind (Heneine et al. 1994, Schweizer et al. 1995, Ali et al. 1996, Rösener et al. 1996) Außerdem wurde festgestellt, dass die Sequenz des HFV, des am besten untersuchten Isolates, fast identisch zu der eines Isolates vom Schimpansen (SFVcpz) war (Herchenröder et al. 1994), was zur mehrfachen Umbenennung des Isolates bis

hin zur aktuellen Bezeichnung PFV (*prototypic foamy virus*) führte (Rethwilm 2003a).

Eine Infektion mit Foamyviren führt in den Wirtsorganismen zu einer lebenslangen Persistenz in vielen Gewebetypen (Falcone et al. 2003), entgegen dem Eindruck des prominenten zytopathogenen Effekts aber zu keiner Krankheit (Linial 2000). Obwohl diverse Zelltypen befallen werden können, scheint sich die virale Replikation auf einzelne Organe, wie z .B. die Speicheldrüsen zu beschränken. Die Übertragung erfolgt bei SFVs durch Beißen im Rahmen sozialer Kontakte der Wirtstiere (Falcone et al. 2003, Murray und Linial 2006).

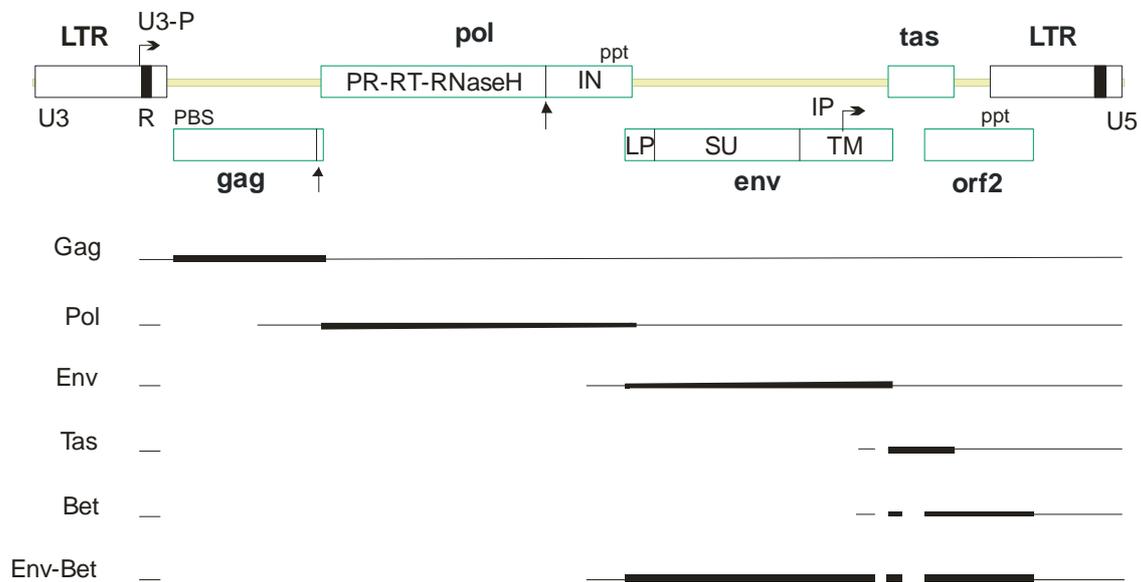
Wie erwähnt scheint der Mensch für Foamyviren ein Fehlwirt zu sein. Mit Foamyviren infizierte Menschen waren fast ausnahmslos Personen mit beruflichem Kontakt zu Primaten wie Tierpfleger oder afrikanische Affenjäger. Alle Isolate vom Menschen konnten bisher zu Primatenviren zurückverfolgt werden (Heneine et al. 2003; Wolfe et al. 2004). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch (z. B. durch Sexualkontakt), eine Infektion des Menschen durch nicht-Primatenfoamyviren oder eine Humanpathogenität konnten nicht nachgewiesen werden (Heneine et al. 2003; Switzer et al. 2004). An historischen Versuchen, Foamyviren mit malignen oder autoimmunologischen Krankheitsbildern in Verbindung zu bringen, hat es nicht gemangelt, heutiger Konsens ist aber, dass Foamyviren apathogen sind. Seitdem bekannt ist, dass das HIV (*human immunodeficiency virus*) von Affen auf den Menschen übertragen wurde, gilt es zu beobachten, ob Foamyviren sich möglicherweise zu einem neuen, humanpathogenen Retrovirus entwickeln (Khan 2009)

Trotz bisheriger klinischer Bedeutungslosigkeit in Medizin und Veterinärmedizin sind Foamyviren zuletzt durch Entdeckung ihrer funktionellen Mittelstellung sowohl zwischen *Orthoretrovirinae* und *Hepadnaviridae* (Rethwilm 1996; Linial 1999) als auch zwischen Retroviren und Retrotransposons (Heinkelein et al. 2000) ins biologische Interesse gerückt. Eine mögliche zukünftige Bedeutung liegt in der Entwicklung von Vektoren zur Gentherapie auf der Basis foamyviraler Genome. Foamyvirus-basierte Vektorsysteme bieten gegenüber sonstigen retroviralen Systemen eine Reihe von Vorteilen (Rethwilm 2007),

gegenwärtig befinden sich gentherapeutische Therapiekonzepte allgemein jedoch noch weit entfernt von klinischer Verwendbarkeit.

### 1.1.2. Genomische Organisation und Struktur der Foamyviren

Die DNA-Genome der Foamyviren sind mit 11,7 kB (FFV) bis 13,2 kB (PFV) relativ groß. Sie zeigen einen für Retroviren typischen Aufbau mit flankierenden *long terminal repeats* (LTR), den allen Retroviren gemeinsamen Genen gag, pol und env und zwei zusätzlichen Leserastern (tas, bet2) für regulatorische Proteine, die FV als komplexe Retroviren ausweisen (vgl. Abb.1.2.).



**Abb. 1.2.:** Schematische Darstellung eines typischen FV-Genoms (oben) mit den wichtigsten Transkripten. Erkennbar die kanonischen Leseraster gag, pol und env und die regulatorische Region mit tas und orf2. Die flankierenden LTRs sind unterteilt in U3-, R- und U5-Region. U3-Promotor und Interner Promotor (IP) sind markiert. Eingetragen sind auch die Primerbindungsstelle (PBS) und die Polypurintrakte (ppt). Die Schnittstellen der viralen Protease in Gag und Pol sind mit Pfeil markiert, Env wird von zellulären Proteasen prozessiert. Bei den Transkripten ist der codierende Teil fett hervorgehoben. Die Transkripte für Tas und Bet können sowohl vom U3-P als auch vom IP abgelesen werden.

Ein FV-Genom beinhaltet eine *primer binding site* (PBS) abwärts der 5'-LTR, die die spezifische Bindung von Lysin-t-RNA aus der Wirtszelle als Ausgangspunkt der Erststrangsynthese bei der Reversen Transkription ermöglicht (Maurer et al. 1988). Aufwärts der 3'-LTR sowie im pol-Leseraster

finden sich Polypurintrakte (PPT), die für die Zweitstrangsynthese der Reversen Transkription benötigt werden (Kupiec et al. 1988, Peters et al. 2008)

Im FV-Genom befinden sich zwei Promotoren, ein U3-Promotor in der LTR und ein interner Promotor (IP) aufwärts der zusätzlichen Leseraster. Der IP besitzt eine schwache Basalaktivität, die nach Integration des Provirus die Transkription der regulatorischen Leseraster und die Synthese der Proteine Tas und Bet ermöglicht (Löchelt et al. 1994). Tas (Akronym für *transactivator of spumavirus*) aktiviert die Transkription der kanonischen Leseraster vom U3-Promotor, der ohne Tas keinerlei Aktivität zeigt (Keller et al. 1991).

Das gag-Leseraster kodiert die Strukturproteine des Viruskapsides. Das Gag-Protein wird von einer RNA genomischer Länge translatiert. Anders als bei Orthoretroviren erfolgt kein mehrfaches Schneiden des Gag-Vorläuferproteins durch die virale Protease, lediglich ein kleines Peptid (p3) vom C-Terminus wird bei einem Teil der Proteine abgeschnitten, was essentiell für die Replikation ist (Zemba et al. 1998). In die Kapsidstruktur der Primaten-FVs wird sehr viel mehr prozessiertes Protein (p68) als Vorläuferprotein (p71) eingebaut (Cartellieri et al. 2005).

Im pol-Leseraster findet sich die genetische Information der für die Replikation des Virus benötigten Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT), RNaseH (RN) und Integrase (IN). Im Gegensatz zu Orthoretroviren erfolgt keine Expression eines Gag-Pol-Fusionsproteins, sondern die Translation von Pol erfolgt von einer eigenen gespleißten mRNA (Bodem et al. 1996, Enssle et al. 1996, Yu et al. 1996a). Das Pol-Vorläuferprotein wird posttranslational prozessiert, wobei die Integrase von den übrigen Enzymen abgetrennt wird, aber keine Spaltung zwischen Protease und RT/RN erfolgt (Pfrepper et al. 1998).

Das env-Leseraster kodiert die Proteine der Virushülle (*envelope*). Die Expression des Env-Vorläuferproteins (130kDa) erfolgt auf Grundlage einer eigenen gespleißten mRNA, für die der SD abwärts des U3-Promotors und ein SA am 3'-Ende von pol verwendet wird (Muranyi und Flügel 1991). Alternatives Spleißen bewirkt die Expression eines Env-Bet-Fusionsproteins (170kDa) unklarer in vivo Funktion, welches für die in vitro Replikation nicht benötigt wird

(Lindemann und Rethwilm 1998). Ein Signalpeptid (SP) am N-Terminus des Env-Vorläuferproteins bewirkt die Synthese am Endoplasmatischen Retikulum (ER). Im Gegensatz zu anderen Retroviren erfolgt die Abspaltung des SP posttranslational, außerdem findet sich das SP im Virion und ist für die Partikelreifung essentiell (Lindemann et al. 2001). Das Env-Vorläuferprotein wird auf dem Weg zur Zelloberfläche von zellulären Proteasen in eine Oberflächen-Untereinheit (SU) und eine Transmembran-Untereinheit (TM) gespalten (Goepfert et al. 1997).

Im tas-Leseraster ist der virale Transaktivator, das Tas-Protein codiert. Die Expression von Tas erfolgt zu Beginn der viralen Genexpression durch Transkription einer mRNA unter Verwendung des Internen Promotors (s. o.). Am Tas-Protein lassen sich eine N-terminale Region, welche die Zielerkennung und die Bindung an den Promotor vermittelt, und eine C-terminale Aktivierungsdomäne abgrenzen (Löchelt 2003). Dazwischen befindet sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS), das aus einer Anzahl basischer Aminosäurereste besteht (Keller et al. 1991).

Aus dem Beginn des tas-Leseraster und dem bel2-Leseraster wird eine mRNA gespleißt, von der das Protein Bet translatiert wird. Bet befindet sich in großen Mengen in mit FV infizierten Zellen (Cullen 1992). Es wurde gezeigt, dass Bet die Aktivität vom IP herunterreguliert, die Produktion von entweder Tas oder Bet wäre dann der molekulare Schalter, der die Infektion kontrolliert, entweder in Richtung einer massiven Lyse oder in Richtung Latenz (Meiering und Linial 2002). Eine zusätzliche Funktion von Bet ist die Inhibierung von APOBEC3-Faktoren der Wirtszelle. Antiretrovirale Faktoren der APOBEC3-Familie sind ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems, das retrovirale Genome durch G-zu-A-Hypermuation beeinträchtigt (Cullen 2006). Auch die Replikation von FV kann durch solche Proteine gehemmt werden. FV Bet rettet die Infektiosität von PFV und HIV Virionen, die mit APOBEC3-Proteinen gehemmt wurden (Russell et al. 2005), Bet übernimmt damit eine ähnliche Funktion wie HIV-1-Vif. Im Gegensatz zu Vif bewirkt Bet jedoch keinen proteasomalen Abbau von APOBEC3, sondern bindet das Protein und verhindert so durch seine

massenhafte Präsenz dessen Interaktion mit viralen Nukleinsäuren (Cullen 2006).

### 1.1.3. Replikation der Foamyviren im Überblick

Foamyviren infizieren als behüllte Viren ihre Wirtszellen durch rezeptorvermittelte Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle. Der zelluläre Rezeptor, mit dem die viralen Glykoproteine (Oberflächendomäne von Env) interagieren, ist nach wie vor unbekannt, aufgrund des großen Spektrums an verschiedenen, infizierbaren Wirtszelltypen wird ein ubiquitärer Rezeptor angenommen (Hill et al. 1999). Entscheidend für die Fusion von Viruspartikel und Zellmembran ist die korrekte Prozessierung von Env und das Vorhandensein der vollständigen MSD der TM-Untereinheit (Pietschmann et al. 2000). Der intrazelluläre Transport der Viruspartikel zum Nukleus zwecks Integration läuft über Mikrotubuli ab (Saib et al. 1997). Die Freisetzung des viralen Genoms (*uncoating*) ist von einer von der viralen Protease vermittelten Prozessierung von Kapsidproteinen abhängig, ein bisher bei Retroviren unbekanntes Phänomen (Lehmann-Che et al. 2005). Bei Orthoretroviren folgt auf Fusion und Genomfreisetzung die Reverse Transkription des RNA Genoms (Vogt 1997). Experimente mit Hemmung der RT durch Azidothymidin (AZT) zeigten jedoch, dass die Reverse Transkription der FV erst spät im Replikationszyklus, wenn bereits virale Proteine exprimiert werden, stattfindet (Moebes et al. 1997). Diese Beobachtung und das Vorkommen großer Mengen an unintegrierter viraler cDNA (Moebes et al. 1997) führten zu der Einschätzung, dass Foamyviren DNA-Viren sind, die sich über ein RNA-Intermediat vermehren, im Gegensatz zu Orthoretroviren, für die das Gegenteil gilt (Yu et al. 1999, Rethwilm 2003b). Die Replikation von Foamyviren ist wie die von Orthoretroviren abhängig von der Integration viraler DNA in das Genom der Wirtszelle durch eine aktive virale Integrase (Enssle et al. 1999). Ausgehend von integrierter Provirus-DNA erfolgt die Expression der viralen Proteine (s.o.) und prägenomischer mRNA, die wie bereits beschrieben in diesem späten Stadium revers transkribiert wird. Interessant ist, dass diese in

der Zelle vorliegende cDNA, anstatt für die Partikelfreisetzung verpackt zu werden, erneut in das Wirtsgenom integriert werden kann (Heinkelein et al. 2000). Diesen Vorgang bezeichnet man als Retrotransposition, eine Strategie, die von Orthoretroviren nicht sinnvoll eingesetzt werden kann, da für die Aktivierung der Reversen Transkriptase eine extrazelluläre Phase benötigt wird (Swanstrom und Wills 1997), die aber bei den Retrotransposons, endogenen Retroviren, vorkommt. Vermutlich dient diese Rezirkulation der viralen cDNA in vivo der Akkumulation von Provirus in der Wirts-DNA, ohne dass das Abwehrsystem des Wirts durch exprimierte Proteine oder freigesetzte Viruspartikel aktiviert wird, die Freisetzung der Viren erfolgte dann später in großen Massen (Rethwilm 2003b). Aus der späten RT ergibt sich wie beschrieben die Hypothese, dass in den viralen Partikeln, deren Formation und Freisetzung im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird, ein DNA-Genom vorhanden ist. Durch Southern-Blot und Northern-Blot konnten in den Viruspartikeln DNA, aber keine RNA nachgewiesen werden (Yu et al. 1996a). In Viruspartikeln konnte hingegen durch RT-PCR auch RNA nachgewiesen werden, das quantitative Verhältnis von RNA und DNA in den Partikeln schwankte in den Experimenten stark (Yu et al. 1999). Möglicherweise werden sowohl Partikel freigesetzt, die RNA enthalten als auch solche, die DNA enthalten, wobei nicht vollständige RNA-Genome, die sich zwar in der RT-PCR, nicht aber im Northern-Blot nachweisen lassen, keine neuen Zellen infizieren können (Rethwilm 2003b).

## **1.2. Partikelreifung und Ausknospung bei Orthoretroviren und Spumaretroviren**

Die Unterschiede im Replikationszyklus zwischen Orthoretroviren und Foamyviren werden auch bei einem genaueren Blick auf die Partikelreifung und die Ausknospung deutlich. Bevor die Besonderheiten von EFV beim Ausknospen als Zielsetzung dieser Arbeit thematisiert werden, ist es sinnvoll, diese Aspekte zunächst für die Virussubfamilien zu betrachten.

### 1.2.1. Partikelreifung

Bei Orthoretroviren sind zwei typische Wege von Partikelreifung beschrieben worden, der so genannte C-Typ und der B/D-Typ (Linial und Eastman 2003). Beim ersten Typ erfolgt die Partikelreifung an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, dies ist typisch für Gammaretroviren und Lentiviren wie HIV. Partikel von Betaretroviren wie dem *Mason-Pfizer monkey virus* (MPMV) reifen intrazellulär entfernt von der Plasmamembran, die Partikel werden intrazellulär an die Plasmamembran transportiert, wo das Ausknospen erfolgt. Foamyviren zeigen ein Verhalten, das eher dem B/D-Typ entspricht, sich aber auf der Ebene der beteiligten Proteine deutlich von den Orthoretroviren abhebt.

Bei konventionellen Retroviren ist die Formierung des Viruspartikels abhängig von inzwischen weitgehend bekannten Domänen des noch unprozessierten Gag-Proteins (Swanstrom und Wills 1997). Die Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins durch die virale Protease in Matrix (M)-, Kapsid (C)- und Nukleokapsid (NC)-Protein erfolgt erst nach Ausschleusung der fertigen Partikel. Am Gag-Vorläuferprotein werden eine Membrandomäne (M), eine spätere Domäne (L) und eine Interaktionsdomäne (I) unterschieden.

Die M-Domäne ist bei den meisten Orthoretroviren mit einem Myristylierungssignal versehen und vermittelt die Interaktion von zytoplasmatischem Gag-Protein mit der Plasmamembran (Linial und Eastman 2003). Bei C-Typ-Viren ist das Sammeln von Gag-Protein an der Zellmembran Ausgangspunkt der Partikelreifung, B/D-Typ Viren enthalten N-terminal ein zytoplasmatisches Retentionssignal (CTRS) (Choi et al. 1999), welches die Partikelreifung an eine perizentrioläre Region im Zytoplasma verlegt (Sfakianos und Hunter 2003). Der Transport der fertigen Partikel an die Membran ist aber ebenfalls von der myristylierten M-Domäne abhängig.

Die Interaktionsdomäne des Gag-Vorläuferproteins vermittelt die Aneinanderlagerung und damit Multimerisierung von Gag im Rahmen der Partikelreifung. Die I-Domäne von Gag entspricht nach Prozessierung das NC-Protein, an das die genomische RNA gebunden ist. Mittlerweile geht man davon

aus, dass RNA entscheidend für Gag-Gag-Interaktion ist. Die I-Domäne vermittelt dabei möglicherweise nur die Bindung von RNA, was dann die Gag-Gag-Interaktion über andere Gag-Bestandteile ermöglicht (Sandefur et al. 2000).

Die L-Domäne des Gag-Vorläuferproteins ist für die erfolgreiche Ablösung des viralen Partikels nach dem Ausknospen verantwortlich. Hierbei handelt es sich um ein prolinreiches Motiv an verschiedenen C-terminalen Lokalisationen der verschiedenen Viren. (Linial and Eastman 2003).

Neben den Gag-Proteinen des Viruspartikels muss auch die Erbinformation in Gestalt einer genomischen RNA bei Orthoretroviren in das reifende Viruspartikel integriert werden. Wie bereits erwähnt, spielt RNA sogar eine wesentliche Rolle bei der Gag-Gag-Interaktion innerhalb der Partikelreifung. Da retrovirale RNA-Genome sich nicht von zellulären mRNAs unterscheiden, sind für spezifisches Verpacken der RNA bei der Partikelreifung so genannte *cis-acting*-Verpackungssequenzen erforderlich, diese werden auch als  $\psi$ -Elemente bezeichnet (Banks et al. 1997). Bindungspartner der  $\psi$ -Regionen der viralen RNAs ist die I-Domäne des Gag-Vorläuferproteins, das spätere NC-Protein.

Als letzter Bestandteil des Viruspartikels, abgesehen von der Hülle mit den Glykoproteinen, muss eine gewisse Menge Pol-Vorläuferprotein in das Viruspartikel integriert werden. Pol wird von Orthoretroviren als Gag-Pol-Fusionsprotein exprimiert. Dazu verwenden sie entweder einen Leserasterwechsel der Ribosomen oder unterdrücken das Stoppcodon von Gag (Jacks 1990). Beide Mechanismen sind wenig effizient, so dass die Menge an Gag die Menge an Gag-Pol-Fusionsprotein weit übertrifft. Gag-Pol-Fusionsprotein wird ebenso wie Gag-Vorläuferprotein über Gag-Interaktionen im Rahmen der Partikelreifung in das Viruspartikel integriert (Linial und Eastman 2003).

Die Partikelreifung von Foamyviren ist schlechter erforscht als die der klassischen Retroviren, fast alle Ergebnisse beziehen sich zunächst nur auf das vom Menschen isolierte PFV.

Wie bereits erwähnt wird das Gag-Protein von Foamyviren nicht wie das der Orthoretroviren prozessiert, bis auf die Abspaltung eines 3-kDa-Fragmentes vom C-Terminus. Das Gag-Protein von FV ist nur wenig konserviert, C-terminal konnten jedoch drei Regionen mit einem hohen Anteil an Glycin- und Argininresten identifiziert werden, ähnliche Regionen konnten im Core-Protein des Hepatitis-B-Virus (HBV) beschrieben werden (Schliephake und Rethwilm 1994). Diese Regionen werden bei FV als GR-Boxen bezeichnet. GR-Box I stellt eine RNA und DNA bindende Domäne dar, ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in GR-Box II bewirkt den Transport von Gag in den Nukleus, letzteres ist für die *in vitro* Replikation aber nicht entscheidend (Yu et al. 1996b). Die Funktion von GR-Box III ist unklar, sie kommt auch nicht bei allen FV vor. Alle bisher sequenzierten FV enthalten im N-Terminus von Gag das für Betaretroviren beschriebene CTRS (Wang and Mulligan 1999, Tobaly-Tapiero et. al. 2000). Das CTRS ist für Partikelreifung und Virusproduktion essentiell (Eastman and Linial 2001), eine Myristilierung des N-Terminus wie bei vielen konventionellen Retroviren konnte nicht nachgewiesen werden. Nahe dem N-Terminus befindet sich wahrscheinlich eine Domäne, die an der Zusammenlagerung der Kapsidproteine über Gag-Gag-Interaktionen beteiligt ist. Diese Region, die ein coiled-coil-Motiv enthält, ist essentiell für die Virusproduktion (Tobaly-Tapiero et al. 2001). In FV Gag wurde außerdem ein für die virale Infektiosität essentielles konserviertes YXXLGL-Motiv gefunden (Stange et al. 2005), zusammen mit GR-Box I liegt es in einer Region für die eine Interaktionsdomäne postuliert wird (Bowzard et al.1999), eine direkte Wirkung dieses Motivs als I-Domäne scheint jedoch nicht vorzuliegen (Mannigel et. al. 2007). Für PFV wurde eine der L-Domäne von klassischen Retroviren funktionell äquivalente PSAP-Domäne im Gag-Protein identifiziert (Stange et al. 2005).

Die Verpackung der genomischen RNA oder bereits revers transkribierten cDNA bei FV ist noch nicht geklärt. Die Suche nach den  $\psi$ -Regionen der Orthoretroviren vergleichbaren Sequenzen bei FV hat überraschend ergeben, dass wohl nicht ausschließlich Regionen am 5'-Ende des Genoms entscheidend sind, sondern auch ein noch nicht genau eingegrenzter Abschnitt

in der pol-Sequenz (Erlwein et. al. 1998, Heinkelein et. al. 1998, Mergia et al. 1998). Als Interaktionspartner möglicher  $\psi$ -Regionen der FV kommen die GR-Boxen in Frage. GR-Box I ermöglicht die Bindung von RNA und DNA und ist essentiell für virale Infektiosität, spielt also zu mindestens eine indirekte Rolle, während die anderen Boxen wohl keinen substantiellen Beitrag leisten (Yu et al. 1996b).

Die Verpackung von Pol in das Viruspartikel erfolgt anders als bei klassischen Retroviren, da FV kein Gag-Pol-Fusionsprotein synthetisieren. Es ist unklar, ob und wenn ja welche Sequenzen von Gag für die Inkorporation von Pol benötigt werden. Wahrscheinlich ist aber, dass für die Verpackung von Pol virale RNA mit den potentiellen  $\psi$ -Regionen benötigt wird (Heinkelein et al. 2002). Eine genauere Aufarbeitung der für die Verpackung von Pol benötigten Nukleotidsequenzen verstärkte die Einschätzung, dass virale RNA oder DNA als Bindeglied zwischen Pol und Gag bei der Partikelreifung fungiert (Peters et al. 2005). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Gag-Pol-Interaktion über die GR-Box I (Lee et al. 2008).

Als Ort der Partikelreifung von PFV konnte eine perizentrioläre zytoplasmatische Region identifiziert werden, die Akkumulation von Gag in der Nähe der Zentriolen ist abhängig von einem intakten mikrotubulären System der Zelle (Yu et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich also zur Partikelreifung bei FV sagen, dass ein essentielles CTRS die Gag-Proteine zu einer perizentriolären Region leitet, wo über Gag-Gag-Interaktionen das virale Kapsid geformt wird. Das virale Genom bindet über spezifische Sequenzmotive im pol-Leseraster an die Kapsidproteine und ermöglicht möglicherweise im komplexen Zusammenspiel mit Gag die Inkorporation von Pol.

### **1.2.2. Freisetzung der Viruspartikel**

Behüllte Viren werden nach der Partikelreifung durch Ausknospen („Budding“) aus der Wirtszelle freigesetzt. Bei Orthoretroviren ist dieser Prozess unabhängig von den viralen Glykoproteinen, Gag allein beinhaltet die zur

Freisetzung von infektiösen Viren oder virusartigen Partikeln von der Plasmamembran nötige Information (Swanstrom und Wills 1997). Klassische Retroviren lassen sich folglich pseudotypisieren, d. h. es lassen sich Partikel mit Retrovirus-Kapsiden, aber mit Glykoproteinen anderer Viren gewinnen (exemplarisch Yee et al. 1994). Foamyviren unterscheiden sich auch bei der Partikelfreisetzung von anderen Retroviren und weisen in mancher Hinsicht Ähnlichkeiten mit Hepadnaviren auf.

Foamyviren lassen sich nicht pseudotypisieren und benötigen das eigene Env-Protein (130kDa) zur Partikelfreisetzung, ohne Env-Expression erfolgt zwar die Partikelreifung, aber kein Ausknospen (Pietschmann et al. 1999). Der Prozess des Ausknospens an sich ist zunächst unabhängig von Gag, da FV (wenn auch in geringerem Umfang) ebenso wie Hepadnaviren subvirale Partikel, die nur aus Hüllmembran mit Glykoproteinen ohne Kapsid bestehen, aus ihren Wirtszellen freisetzen (Shaw et al. 2003). Grundsätzliches zur Expression von Env wurde bereits unter 1.1.2. angeführt. Die Balance zwischen der Freisetzung viraler und der subviraler Partikel ist reguliert durch Ubiquitinierung des Signalpeptides (LP). Bisher konnten zwei Regionen von Env bzw. der Untereinheiten (LP, SU, TM) als entscheidend für die virale Partikelfreisetzung identifiziert werden (Lindemann und Goepfert 2003). Eine ist der N-terminale Teil der vermuteten Membrandomäne (MSD) der TM-Untereinheit (Pietschmann 1999). Die andere ist der zytoplasmatische Teil des relativ langen Signalpeptides (Lindemann et al. 2001). Signalpeptide befinden sich N-terminal im Allgemeinen an jedem Protein, das exozytiert werden soll oder als Membranprotein exprimiert wird, und bewirken die Translation des Proteins am Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Signalpeptide werden meist noch während der Translation von einer Signalpeptidase abgespalten. Das LP der Foamyviren ist vergleichsweise lang, wird erst posttranslational abgespalten und ist anders als bei Orthoretroviren auch Bestandteil des Virions (Lindemann et al. 2001). Die so genannte Budding-Domäne des LP enthält ein konserviertes WXXW-Motiv in der Proteinsequenz (Lindemann et al. 2001, Wilk et al. 2001). Für die Ausschleusung vollständiger Viruspartikel ist eine direkte und spezifische Interaktion des zytoplasmatischen Teils von LP mit einer N-

terminalen Domäne von Gag verantwortlich (Wilk et al. 2001, Geiselhart et al. 2003). Die genaue Gag-Domäne, die als Interaktionspartner dient, konnte noch nicht identifiziert werden (Yu et al. 2006).

Die Partikelfreisetzung der Foamyviren findet schwerpunktmäßig an intrazytoplasmatischen Membranen statt, aber auch an der Plasmamembran (Hooks and Gibbs 1975). Das für das Ausknospen essentielle Env ist hochkonzentriert an den intrazellulären Membranen des Endoplasmatischen Retikulums vorhanden (Goepfert et al. 1997, Yu et al. 2006). Das Budding an intrazytoplasmatischen Kompartimenten ist für Retroviren ungewöhnlich, auch hier unterscheiden sich Foamyviren von Orthoretroviren. Als molekulare Basis der Lokalisation von Env und des Buddings sind bisher drei Motive der Env-Sequenz beschrieben. Eins davon ist ein Lysinrest der erwähnten MSD der TM-Untereinheit, Deletion dieses Motives führt zu einer Erhöhung der Partikelfreisetzung an der Plasmamembran (Pietschmann et al. 2000). Eine Mitwirkung des N-terminalen zytoplasmatischen Teils des LP ist ebenfalls beschrieben, eine Deletion dieser Region führt ebenfalls zu vermehrtem Budding an der Zelloberfläche (Lindemann et al. 2001). Das dritte Motiv ist ein am C-terminalen Ende der TM-Untereinheit von Env beschriebenes ER-Rückführungssignal, welches aber im Gegensatz zu den eben genannten nicht essentiell zur Freisetzung intakter Viruspartikel ist (Goepfert et al. 1999). Dabei handelt es sich um ein Consensus-Motiv, das aus zwei Lysin-Resten besteht, die sich drei und vier bzw. fünf AS vom C-Terminus eines am ER gehaltenen Typ I Membranproteins entfernt befinden (Goepfert et al. 1995). Ein solches Motiv bewirkt die kontinuierliche Rückführung von Membranproteinen durch retrograden vesikulären Transport. In allen bisher beschriebenen Foamyviren von Primaten sowie bei FFV ist ein solches Dilysin-Motiv zu finden, Ausnahmen stellen BFV und EFV dar, die lediglich über einen Lysinrest in der entsprechenden Region verfügen. Für PFV wurde gezeigt, dass dieses von anderen Proteinen bekannte Motiv auch bei FV Env eine Anreicherung am ER bewirkt (Goepfert et al. 1997). Mutanten mit ganz oder teilweise alterierten Motiven zeigten eine deutliche Verlagerung der Partikelausschleusung an die Zelloberfläche, wobei die Gesamtmenge an freigesetztem Virus in vitro sich

nicht wesentlich ändert (Goepfert et al. 1999). Aufgrund der Konservierung des Dilysinmotivs geht man jedoch von einem quantitativen Einfluss dieser Sequenz auf die Virusfreisetzung in vivo aus (Lindemann und Goepfert 2003).

Aufgrund der Akkumulation von Glykoprotein am ER und der Beobachtung des Buddings an intracytoplasmatischen Membranen, ging man davon aus, dass diese mit dem ER identisch seien. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der jüngeren Zeit haben gezeigt, dass Env und Gag im Zuge der Partikelreifung an unterschiedlichen Lokalisationen akkumuliert werden, nämlich am ER und einer perizentriolären Region (Yu et al. 2006). Die zur Partikelfreisetzung nötige Env-Gag-Interaktion findet nicht am ER, sondern am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und zum geringeren Teil am späten Endosom statt (Yu et al. 2006), die Kolo-kalisation von Env und Gag an diesen Kompartimenten legt den Schluss nahe, dass diese und nicht das ER der Ort des intrazellulären Buddings von FV darstellen. Insgesamt sind bei FV die Mechanismen Partikelausschleusung wenig wirksam, mehr als 90% der nachweisbaren Viruspartikel sind zellständig (Neumann-Haefelin et al. 1983).

### **1.3. Das Equine Foamy Virus (EFV)**

Die Erstbeschreibung eines Foamyvirus vom Pferd erfolgte erst im Jahr 2000. Im Serum von Pferden wurden Antikörper nachgewiesen, die vor allem PFV-Env (130kDa) und das Env-Bet-Fusionsprotein (160kDa) erkannten (Tobaly-Tapiero et al. 2000). Die relativ hohe Konservierung von Env in FV legte den Schluss nahe, dass es sich um kreuzreagierende Antikörper handelte, die die Tiere gegen ein pferdeeigenes FV bilden. Ein Pferdefoamyvirus (EFV) wurde durch Kokultivierung von Lymphozyten von seropositiven Pferden mit Zelllinien von Mensch (U373-MG) und Hamster (BHK-21) isoliert, es zeigte sich der typische CPE in der Zellkultur und FV-Partikel konnten im EM sichtbar gemacht werden (Tobaly-Tapiero et al. 2000). Man nimmt an, dass EFV wie andere FV auch keine Krankheit im Wirtstier hervorruft. Das gesamte EFV-Genom wurde kloniert und sequenziert. Die Analyse zeigte für EFV den typischen Aufbau eines Foamyvirus-Genoms mit LTRs, den drei kanonischen Leserastern gag,

pol und env sowie zwei regulatorischen ORFs am 3'-Ende des Genoms (Tobaly-Tapiero et al. 2000, vgl. auch Abb. 1.2.). Die Leseraster zeigen die meisten für FV beschriebenen konservierten Motive, z. B. das CTRS. Allerdings sind keine GR-Box III in Gag und, in diesem Zusammenhang noch wichtiger, kein Dilysinmotiv (*ER retrieval motif*) in Env nachgewiesen worden (Tobaly-Tapiero et al. 2000). Durch Infektion von Kaninchen mit EFV und DNA-Vakzinierung von Mäusen konnten Antikörper gegen EFV sowie spezifische Antiseren gegen EFV Gag und EFV Env hergestellt werden, was die Charakterisierung der Proteine ermöglichte (Lecellier et al. 2002). Die viralen Proteine wurden folgendermaßen beschrieben: Env-Vorläuferprotein (130kDa), die Produkte TM (46kDa) und SU (76-80kDa); ein Env-Bet-Fusionsprotein (160kDa), Bet (56kDa); Gag-Vorläuferprotein und prozessiertes Gag (66 und 62kDa). Als eine Besonderheit von EFV wurde beschrieben, dass EFV Tas im Gegensatz zu anderen FV nicht auf den Kern beschränkt ist (Lecellier et al. 2002).

Die Lokalisation der Partikelfreisetzung ist laut den Autoren auffälligste Besonderheit von EFV. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde entdeckt, dass die Ausknospung von EFV *ausschließlich* an der Plasmamembran erfolgt, nicht wie bis dato bei FV beschrieben, an zytoplasmatischen Membranen (Tobaly-Tapiero et al. 2000, Lecellier et al. 2002).

Eine Modifikation dieser Beobachtung durch die gleiche Arbeitsgruppe erfolgte in der Diskussion dieser Ergebnisse, wo es heißt, EFV verlasse die Wirtszelle *schwerpunktmäßig* an der Plasmamembran (Saib 2003). Da EFV (wie auch BFV) das ER-Rückführungsmotiv fehlt, wurde vermutet, dass deswegen dieses Virus einen anderen Weg der Partikelaußschleusung als andere FV wählt (Tobaly-Tapiero et al. 2000).

## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Erforschung eines möglicherweise speziellen Ablaufes der Partikelreifung und Partikelausschleusung könnte im Vergleich mit anderen Primaten- und Nicht-Primaten-FV (insbesondere BFV, welches ebenfalls keine Dilysinmotiv besitzt) wertvolle Aufschlüsse über die Bedeutung bekannter Sequenzmotive in der Partikelreifung (wie dem Dilysinmotiv) liefern. Außerdem könnten möglicherweise weitere für Assembly und Budding relevante Domänen postuliert werden. Dazu ist die Reproduktion oder Falsifizierung der bisherigen Beobachtungen zur Ausknospung der EFV-Partikel eine entscheidende Voraussetzung. Zielsetzung der Arbeit war deswegen:

1. Neue Klonierung von EFV und Etablierung eines infektiösen Klons
2. Stabile Kultivierung von EFV in verschiedenen Zelltypen
3. Beurteilung der Lokalisation der Partikelausschleusung bei EFV
4. Sequenzvergleich zwischen infektiösem Klon und bekannten FV-Sequenzen, Identifizierung möglicher entscheidender Motive

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bakterienbrutschrank	Heraeus
Bakterienkulturschüttler	Infors
Bakterienplatten	Hartenstein
Computer	Macintosh
Einmalpipetten (5ml, 10ml)	Greiner
Einwegkanülen	Dispomed
Einwegspritzen	Dispomed
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Erlenmeyerkolben (div. Größen)	Schott
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Gefrierschrank (-20°C)	privileg
Glaspipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Brand
Glasflaschen	Schott
Handschuhe	Asid Bonz
Heizblock	PEQLAB
Kühlschrank (+4°C)	Bosch
Laborwaage	Kern
Magnetrührer	Gerhardt
Messzylinder	Brand
Mikroskop	hund
Mikrowelle	LG
Neubauerzählkammer	GLW
Parafilm	Roth

pH-Meter	Sartorius
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen (autoklaviert)	Hartenstein, Roth
Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences
Küvetten für DNA-Photometrie	Brand
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Skalpell	Hartenstein
Sterilarbeitsbank	Nuaire
Sterilfilter (0,2µm, 0,45µm)	Schleicher&Schuell
Thermocycler	Biometra
Thermoschüttler	Eppendorf
Transilluminator	Intas
UV-Handlampe	Bachofer
Vortex	Bender&Hobin
Wägeschalen	Hartenstein
Wasserbad	mgw Lauda
Zellkulturbrutschrank	Nuaire
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturplatten (6-well, 12-well)	Greiner
Zentrifugen	Heraeus, Sorvall
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner
Zentrifugenrotoren	Sorvall GS3

### 2.1.2. Chemikalien

Agarose (elektrophoresetauglich)	Invitrogen
Agar-Agar	AppliChem
Ampicillin	AppliChem
Bacto Trypton	Bicton, Dickinson and Sparks
Bacto Hefeextrakt	Bicton, Dickinson and Sparks
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas

Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
EDTA	AppliChem
Essigsäure	AppliChem
Ethanol (technisch)	
Ethanol (unvergällt)	AppliChem
Ethidiumbromid	AppliChem
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Giemsas Lösung	AppliChem
Glukose	AppliChem
Glutamin	AppliChem
Glycerin	AppliChem
HEPES	AppliChem
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	AppliChem
LB Broth-Base	Invitrogen
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	AppliChem
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Na <sub>2</sub> -EDTA	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
OPPTI-PRO-SFM	Invitrogen
OPTI-MEM	Invitrogen
Penicillin	AppliChem
Streptomycin	AppliChem
Tris	Roth

Trypsin

Roche-Boehringer

### 2.1.3. Enzyme

Verwendet wurden die mit den jeweiligen Enzymen gelieferten Puffersysteme.

BigDye Terminatorv3.1	Applied Biosystems
Klenow Fragment	Fermentas
Pfu-Polymerase	Fermentas, Promega
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, NEB
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase	Fermentas

### 2.1.4. Kits

DNeasy Tissue Extraction Kit	Qiagen
FuGENE6 (Transfektionsreagenz)	Roche
NucleoBond AX Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel
PCR Cloning Kit	Qiagen
Polyfect (Transfektionsreagenz)	Qiagen
Pure Link Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen
Pure Link PCR Purification Kit	Invitrogen

### 2.1.5. Oligonukleotide (Primer)

#### 2.1.5.1. Oligonukleotide zum Sequenzieren

m13	5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'
m13 reverse	5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'
EFV Seq 1	5'-TGTCATGGAATGAGGATCC AGAGACTAAGAATATAGC-3'

EFV Seq 500	5'-GCTCGCTAATGCATAATAGCATTCAACTGACAGC-3'
EFV Seq 1000	5'-AATTAGGAAGTGAAACCAAGCGTGACGC-3'
EFV Seq 1493a	5'-ATGTATACAAAAACCGGCTTTATCGAGCCCCACG-3'
EFV Seq 1500	5'-AGGGTATAACTTCATTGAAGTTATAAATGGC-3'
EFV Seq 2000	5'-ATGGGAATGGGAATGCCAGGAGCAATACAGCC-3'
EFV Seq 2508	5'-GACTGGGACTTGACTTGGAGTGTAATCCGGCG-3'
EFV Seq 3000	5'-CTTATCGAGGACGAGACTCAACCAATCAGAGTGG-3'
EFV Seq 3505	5'-CATCTGAAGGGAAGAAATATTTAAAGGACC-3'
EFV Seq 4000	5'-CTCAAGGATTCCTTAATTCACCTGCC-3'
EFV Seq 4513	5'-GTCGAATTAATAGTAAAAGTACATGTTTCTCCC-3'
EFV Seq 4995	5'-GGGAATAATTGCAGTAAGATATCAACC-3'
EFV Seq 5504	5'-GGGATGGACAGGTCTATGTAAAAAGAACAGATGG-3'
EFV Seq 6000	5'-GTCGCCTGGGCCAAAGACAAGGG-3'
EFV Seq 6500	5'-TGTGTCTATAGATAATCTGAAGAAGACACC-3'
EFV Seq 6991	5'-CCTATTATTGACAAGGAGAGGGTTTTGGG-3'
EFV Seq 8019	5'-CTTTATATCAAGAATGTATTCAAAGGGG-3'
EFV Seq 8500	5'-CAACAACAATTACAGGCTGACGAAGC-3'
EFV Seq 9008	5'-GTCAGATGTTTTGGAACCACATTGAAGAAGCC-3'
EFV Seq 9508	5'-CTCTGGGAAGTGGACTTATCCCGAGGGG-3'
EFV Seq 10014	5'-GTCAACAGATTCTACACTTCTACAGGACCC-3'
EFV Seq 10493	5'-GGTACTCCCAGAATTGGACAAGCTGGG-3'
EFV Seq 11005	5'-CCCTGGCGAAGATTCCTCTGATGACGATCC-3'
EFV Seq 11493	5'-CGGTACATATATAAGTTCATCCAGCC-3'

#### 2.1.5.2. Oligonukleotide zur PCR-Mutagenese

mut1s	5'-AAAAGAACTCTGGAAAGTGGACTTATCCCGAGGG-3'
mut1a	5'-ATAAGTCCACTTCCCAGAGTTCTTTTTTGGTTATTC-3'
mut2s	5'-TGTAATAGGTGGCACTATAATCATAATTTTAAGC-3'
mut2a	5'-ATTATAGTGCCACCTATTACAGTCTATCTGTCTTTTAGC-3'
mut3s	5'-TTCCAATCAACAGCCGGAGCCCCAGAGCAGC-3'
mut3a	5'-TCCGGCTGTTGATTGGGAATAGGCTGATGACC-3'

mut4s 5'-TAACATGGACTGGACAGTTGAATGGGATGGGG-3'  
mut4a 5'-AACTGTCCAGTCCATGTTAGGCAACCCAGTCCC-3'  
mut5s 5'-TGTCATGGAATGAGGATCCAGAGACTAAGAATATAGC-3'  
mut5a 5'-ATCCTCATTCCATGACACCCTCTCCTTTTTTCC-3'

#### 2.1.5.3. Oligonukleotide zur präparativen PCR

10219(s): 5'-TTGTGGACCTGCTTCATGCTATACTATTGTGTGGG-3'  
hindnon(a): 5'-ATAAGCTTCCGCGGATTTAAATATTGTC  
GCGGTATCTCCTTAAAATAGGG-3'  
sac1(a): 5'-AAGAGCTCTGAAAAGATAAGGAGTTCCTGTTGC-3'  
xbarepair(s): 5'-TCTAGAACTCAAGGGATGTCAAGAATTGGATTATC-3'

#### 2.1.5.4. Oligonukleotide zur diagnostischen PCR

7667s 5'-AACCTGAAGCCGTTATGCTTCTAAACCAAAG-3'  
7680s 5'-TATGCTTCTAAACCAAAGTTATTATACTTGG-3'  
8143a 5'-AAATGCTCGTGAGGCTGGTACTTTACCC-3'  
8120a 5'-TACCCAAATCTATTCCATTGTTCTGTAAGACCC-3'

#### 2.1.6. Plasmide

pEFV4	L. Thümer
pEFV8	L. Thümer
pEFV13	L. Thümer
pcHSRV2	A. Moebes et al. 1997
pUC19	Invitrogen
GFP-Plasmid	clontech

### **2.1.7. Bakterienstämme (transformationskompetent)**

E. coli DH5 $\alpha$

E. coli TOP 10

### **2.1.8. Zelllinien**

293T                      Humane Embryonale Nierenzellen

BHK-21                  Hamsternieren-Fibroblasten

ED                        Pferde-Fibroblasten

### **2.1.9. Lösungen, Puffer und Medien**

#### 2.1.9.1. Bakterienkultur

##### LB-Agarplatten (mit Antibiotikum)

20g    LB Broth Base

5g     NaCl

20g    Agar

Ad 1l   A. bidest

Autoklavieren, abkühlen lassen

+0,5ml Ampicillin-Stocklösung/Kanamycin-Stocklösung

in Bakterienplatten gießen

##### 5x LB-Medium (Vorratsansatz)

100g   LB Broth-Base

25g    NaCl

5g     Glukose

Ad 1l   A. bidest.

Sterilisierung durch Autoklavieren

Verdünnung mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 1xLB-Medium

### 1x TB (terrific broth)-Medium

12g Bacto Trypton

24g Bacto Hefeextrakt

4ml Glycerin

Ad 0,9l A. bidest

Autoklavieren

+100ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (sterilfiltriert)

### $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer

0,17M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,72M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$

### Ampicillin-Stocklösung

100mg/ml

### Kanamycin-Stocklösung

50mg/ml

## 2.1.9.2. Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Mini-Präp)

### Lösung S1

50mM Glukose

10mM EDTA pH 8

25mM Tris pH 8

(Lösung sterilfiltriert)

### Lösung S2

0,2M NaOH

1% SDS

### Lösung S3

3M Natriumacetat pH 5,4

Technisches Ethanol absolut

Technisches Ethanol (70%)

TE-Puffer

10mM Tris pH 7,5

1mM EDTA

2.1.9.3. Agarosegel-Elektrophorese

50x TAE-Puffer (Vorratslösung)

242g Tris

57,1ml Essigsäure

18,6g EDTA

Ad 1l A. bidest

Verdünnung auf 1x TAE mit A. bidest

Ethidiumbromid-Stocklösung

10mg/ml

6x Loading Dye Solution Fermentas

GeneRuler 1kb DNA Ladder Fermentas

GeneRuler 50bp DNA Ladder Fermentas

2.1.9.4. Zellkultur

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

500ml DMEM mit Glutamax

50ml FCS (komplementinaktiviert)

0,5ml Antibiotikamix (Streptomycin/Penicillin)

6ml Glutamin

### ATV

8,0g	NaCl
0,27g	KCl
1,15g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
1,125g	Na <sub>2</sub> -EDTA
1,25g	Trypsin
Ad 1l	A. bidest

### 2x HEPES Buffered Saline

1,6 g	NaCl
0,074g	KCl
0,027g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
0,2g	Glukose
1g	HEPES

ad 90ml A. bidest.

pH-Wert mit 0,5M NaOH auf 7,05 einstellen, ad 100ml mit A. bidest. Auffüllen  
sterilfiltrieren (0,2mm Porengröße)

### 2.1.9.5. Sequenzierung

#### MgCl<sub>2</sub>-Tris-Puffer

200mM Tris-HCl pH 9.0

5mM MgCl<sub>2</sub>

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Vermehrung, Klonierung und Nachweis von DNA**

#### 2.2.1.1. Transformation kompetenter Bakterien

Transformation bezeichnet das Einbringen freier DNA in prokaryotische Zellen. Die DNA liegt dazu meist als Plasmid vor, welches die Sequenz von Interesse in einen Vektor mit Antibiotika-Resistenzgenen enthält. Bei den Zielzellen handelt es sich um kompetent gemachte Bakterien, die nach spezieller Behandlung in der Lage sind, DNA aufzunehmen. Die Aufnahme der DNA in die Zelle kann durch Hitzeschock oder Elektroporation induziert werden.

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten kompetenten Bakterien wurden auf Eis über etwa 10 min aufgetaut. Zu  $100\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension wurde Plasmid-DNA pipettiert. Die Menge an eingesetzter DNA betrug  $1\text{mg}$  bei bekannter Konzentration,  $10\mu\text{l}$  einer Mini-Präparation unbekannter Konzentration oder  $4\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Gemisch  $90\text{s}$  einem Hitzeschock von  $42^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt und anschließend sofort wieder auf Eis abgekühlt. Nach 5min wurden  $900\mu\text{l}$  LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und der Ansatz für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Suspension wurde schließlich auf LB-Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin, abhängig vom eingesetzten Plasmid ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Transformierte Bakterien mit Plasmid sind in der Lage auf der Antibiotikaplatte zu wachsen, die übrigen sterben ab. Die transformierten Bakterien und damit die Plasmid-DNA können in einer Bakterienkultur beliebigen Umfangs vermehrt werden.

#### 2.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Eine Minipräparation ist eine schnelle und billige Aufreinigung von Plasmiden aus kleinen Volumina von Bakterienkulturen. Entscheidender Bestandteil der Präparation ist die Alkalische Lyse der Zellen mit NaOH und SDS.

Zellmembranen werden dadurch zerstört, chromosomale DNA gespalten und Proteine denaturiert, die Integrität der Plasmid-DNA bleibt aber im Wesentlichen erhalten. Die gewonnene Plasmid-DNA kann durch Spaltung mit Restriktionsenzymen analysiert werden. Klone, die das gewünschte Plasmid enthalten, können so aus einer größeren Anzahl selektioniert werden und nach einem weiteren Transformationsschritt im größeren Maßstab vermehrt und präpariert werden.

Von einer mit Bakterienkolonien bewachsenen LB-Agarplatte mit Antibiotikum wurde mit einer sterilen Pipettenspitze je eine einzelne Bakterienkolonie in ein Kulturröhrchen mit 2-4ml LB-Medium mit Antibiotikum überimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Bakterienerschüttler (200rpm) inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 2ml der Übernachtskultur in eine 2ml-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Pellet in 200µl Lösung S1 aufgenommen. Nach Zugabe von 200µl Lösung S2 folgte eine 2-minütige Inkubation bei RT. Durch Zugabe von 250µl der Lösung S3 und vorsichtiges Invertieren erfolgte die Neutralisation des Gemischs und Ausfällung der Proteine und chromosomaler DNA. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden die ausgefällten Bestandteile zentrifugiert und der Überstand in neue Gefäße mit jeweils 1ml absolutem Ethanol (-20°C) überführt. Die so ausgefällte DNA wurde zentrifugiert (13000rpm), mit 70% Ethanol gewaschen und bei 55°C 15min getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50µl TE/RNase resuspendiert und nach nochmaliger Inkubation bei 55°C 30min bei -20°C gelagert. Der Erfolg der Präparation wurde per Restriktionsverdau und Gelelektrophorese überprüft.

### 2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxipräparation)

Ziel einer Maxipräparation ist die Gewinnung größerer Mengen eines bestimmten Plasmids. Die isolierte Plasmid-DNA ist sehr viel reiner als die aus einer Minipräparation und kann zum Klonieren oder zur Transfektion verwendet werden. Die Präparation erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Minipräparation, jedoch wurden vorgefertigte Lösungen und

Aufreinigungssysteme aus dem NucleoBond Plasmid Purification Kit von Macherey-Nagel verwendet.

Mit 100µl eines Transformationsansatzes oder mit einer von einer Bakterienplatte gepickten Einzelkolonie wurde eine Bakterienkultur von 250-300ml 1x LB-Medium mit Antibiotikum (Kanamycin 50µg/ml, Ampicillin 100µg/ml) angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde am Folgetag bei 5000rpm und 4°C 20min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 12ml Puffer S1 mit RNase A resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurde das Gemisch mit 12ml Puffer S2 versetzt und nach mehrfachem Invertieren 3 Minuten bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 12ml Puffer gekühltem S3. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Gemisch mit den ausgefällten Zelltrümmern über die mitgelieferten Filter filtriert und das gereinigte Lysat auf eine mit Puffer N2 äquilibrierte NucleoBond-Säule geladen. Die an der Säule gebundene DNA wurde mit Puffer N3 gewaschen und mit 15ml Puffer N5 in ein 50ml Falcon-Röhrchen eluiert. Nach Ausfällung mit 11ml Isopropanol wurde die DNA durch Zentrifugieren bei 4500rpm bei 4°C 20min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei RT 20min getrocknet. Die DNA wurde in 100µl TE resuspendiert und spektrophotometrisch analysiert. Anhand der im Photometer bestimmten Konzentration wurde die DNA mit TE weiter auf 1µg/µl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C oder RT.

#### 2.2.1.4. Präparation von DNA aus Zellkulturen

Zur Gewinnung der Gesamt-DNA aus Zellen einer Zellkultur wurde das DNeasy Tissue Kit von Quiagen verwendet.

Die adhärennten Zellen aus einer Schale einer 6er-Platte wurden mit ATV abgelöst und bei 2000rpm über 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl PBS resuspendiert. Der Suspension wurden 20µl Proteinase K und 200µl Puffer AL zugesetzt, der Ansatz nach Vortexen 10min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Ethanol und erneutem Vortexen wurde der Ansatz auf eine

DNeasy Mini Spin-Säule geladen und 1min bei 8000rpm zentrifugiert. Nach diesem und den folgenden zwei Schritten wurden jeweils Durchfluss und Sammelgefäß verworfen und die Säule auf ein frisches Gefäß gesetzt. Auf die Säule wurden 500µl Puffer AW1 gegeben und bei 8000rpm 1min zentrifugiert. Danach wurden 500µl Puffer AW2 auf die Säule gegeben, es folgte die Zentrifugation bei 13000rpm zur Trocknung der Säulenmembran. Die Elution der Säule erfolgte durch Zugabe von 100µl Puffer AE und anschließende Zentrifugation bei 8000rpm 1min. Die isolierte DNA wurde im Photometer vermessen und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.1.5. Photometrische Bestimmung der Konzentration von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration präparierter DNA wird das Photometer verwendet. Das Gerät misst die Auslöschung (Extinktion) spezifischer Wellenlängen im UV-Bereich beim Durchtritt eines Lichtstrahles durch die zu vermessende Lösung im Vergleich zu einer Referenzprobe (Leerwert). Die Extinktion ist konzentrationsabhängig, die Berechnung der Konzentration erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Das verwendete Photometer führt diese Berechnung automatisch durch.

Zur Messung wurde die DNA 1:100 auf 250µl Endvolumen mit A. dest. verdünnt und in eine UV-Plastikküvette pipettiert. Als Referenzprobe wurde eine Küvette mit 250µl A. dest. eingesetzt.

Auf Grundlage der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden Maxipräparationen durch Verdünnen mit TE auf 1µg/µl eingestellt.

#### 2.2.1.6. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind ursprünglich in Bakterien entdeckte Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen (zumeist Palindrome) erkennen und an oder nahe der Erkennungssequenz den DNA-Doppelstrang spalten.

Der Verdau mit Restriktionsenzymen diente zum einen analytischen Zwecken. Anhand des Bandenmusters nach Gelelektrophorese der verdauten DNA ließen

sich Rückschlüsse auf Größe und Integrität eines Plasmids, Orientierung eines klonierten DNA-Fragmentes oder Erfolg einer PCR-Klonierung schließen. Für einen solchen diagnostischen Verdau wurden 0,5µg DNA oder 5µl einer Minipräparation in 25µl Endvolumen eingesetzt.

Des Weiteren wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, um gezielt DNA-Fragmente aus Plasmiden herauszuschneiden und in andere, ebenfalls mit Enzymen aufgeschnittene Plasmide zu klonieren. Diese präparativen Spaltungen wurden in einem Endvolumen von 100µl vorgenommen, eingesetzt wurden 10µg DNA aus einer Maxipräparation.

Als Puffer wurden für alle Reaktionen die vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Puffersysteme verwendet. Das jeweilige Enzym wurde, um unvollständiges Spalten zu verhindern im Überschuss zugegeben, die Inkubation erfolgte über zwei Stunden im Heizblock bei der empfohlenen Reaktionstemperatur. Für diagnostische Spaltungen wurden zum Teil FastDigest-Enzyme verwendet, die nur 10min Inkubationszeit benötigten.

#### 2.2.1.7. Klenow-Reaktion

Klenow Fragment wurde im Einzelfall verwendet, um nach Restriktionsverdau entstandene überhängende 5'-DNA-Enden durch Auffüllen des Komplementärstranges mit Nukleotiden zu glätten. Die entstandenen glatten Enden (*blunt ends*) können mit beliebigen anderen geglätteten Enden ligiert werden.

Eingesetzt wurden 15µl der verdauten und aufgereinigten DNA mit 5U Klenow Fragment in einem Gesamtansatz von 20µl. Verwendet wurden außerdem der mit dem Enzym gelieferte Puffer und dNTPs (Endkonzentration 0,05mM). Die Inkubation erfolgte für 10min bei 37°C, Stopp der Reaktion und Inaktivierung der Klenow-Polymerase erfolgte durch Erhitzen des Gemischs auf 75°C für 20min.

#### 2.2.1.8. Dephosphorylierung von 5'-Enden

Bei einer Ligationreaktion kann es zu einer Selbstligation kommen, falls die Enden der linearisierten Vektor-DNA zueinander passen, was generell bei glatten Enden oder bei von dem gleichen Restriktionsenzym produzierten Überhängen vorkommen kann. Um das zu verhindern können isolierte und aufgereinigte DNA-Fragmente dephosphoryliert werden. Die von der DNA-Ligase benötigten phosphorylierten 5'-Enden werden dann ausschließlich vom zu inserierenden DNA-Fragment bereitgestellt.

48µl einer aufgereinigten Vektor-DNA in TE wurden mit 4U SAP und dem mitgelieferten SAP-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 60µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 20min lang bei 37°C. Die SAP wurde durch weitere 15min bei 65° C inaktiviert. Die DNA wurde aus dem Reaktionsgemisch aufgereinigt und für eine Ligation bereitgestellt.

#### 2.2.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Restriktionsenzymen produzierte linearisierte DNA-Fragmente können über passende Nukleotidüberhänge (*sticky ends*) bzw. unspezifisch über glatte Enden (*blunt ends*) miteinander verbunden (ligiert) werden. Die Bindung von phosphorylierten 5'-DNA Enden zu 3'-DNA-Enden wird von der T4-DNA-Ligase katalysiert. Von den zwei zu ligierenden DNA-Fragmenten enthält eines eine Antibiotikaresistenz so wie alle weiteren essentiellen Bestandteile eines Plasmids. In diese Vektor-DNA wird das andere Fragment (Insert-DNA) eingefügt, um ein vollständiges, vermehrungsfähiges Plasmid zu bilden. Die Insert-DNA sollte im 5-10fachen molaren Überschuss vorliegen.

Für einen 20µl-Ligationsansatz wurden 1µl eines aus einem Agarosegel aufgereinigten Vektorfragmentes mit 5µl eines Insertfragmentes eingesetzt. Pro Ligation wurden 2U T4-DNA-Ligase und der mitgelieferte Puffer eingesetzt, die Inkubation des Ligationansatzes erfolgte über Nacht bei 16°C. Am Folgetag wurden kompetente Bakterien mit der Ligation transformiert.

#### 2.2.1.10. Aufreinigung von DNA aus Reaktionsgemischen

Die verschiedenen Anforderungen der verwendeten Enzyme an das chemische Milieu für optimale Funktion machten es nötig, zwischen den meisten aufeinander folgenden Reaktionen die verarbeitete DNA aufzureinigen. Verwendet wurden dazu vorgefertigte Lösungen und Anionentauscher-Säulen aus dem Pure Link PCR Purification Kit von Invitrogen.

Nach Protokoll wurde die verdaute DNA oder das PCR-Produkt mit einem Bindepuffer auf die mitgelieferte Säule geladen und mit einem Waschpuffer gewaschen. Die Säule wurde zentrifugiert, um den Waschpuffer zu entfernen, die DNA anschließend mit einem Elutionspuffer oder auch mit A. dest. eluiert und weiterverarbeitet.

#### 2.2.1.11. Agarosegel-Elektrophorese

Lineare DNA-Fragmente können der Molekülgröße nach über ein Agarosegel aufgetrennt werden. Die Auftrennung wird durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit größerer und kleinerer DNA-Moleküle im elektrischen Feld bedingt. Auf dem Weg zur Anode wandern kleine Moleküle sehr viel schneller durch das molekulare Sieb des Agarosegels als größere. Über die Konzentration der Agarose im Gel lässt sich der optimale Trennbereich verschieben, je nach Größe der gesuchten DNA-Fragmente. Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden mit Ethidiumbromid, einer interkalierenden Substanz, angefärbt und können bei Anregung durch UV-Licht als leuchtende Banden sichtbar gemacht werden.

Für alle Anwendungen der Gelelektrophorese wurden 0,8%ige Gele verwendet. Je nach Gelgröße wurden 0,4g oder 1,2g Agarose in 50 oder 150ml TAE-Puffer gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach einigen Minuten Abkühlung wurden 2 bzw. 4µl Ethidiumbromid (1mg/ml) zugegeben. Die Lösung konnte nach weiterem Abkühlen in eine vorbereitete Gelkammer gegossen werden. Ein Kamm mit je nach Menge des aufzubringenden Ansatzes unterschiedlich großen Zinken wurde in das flüssige Gel gehängt, um beim

Erstarren für das Auftragen der Proben Taschen im Gel auszusparen. Das erstarrte Gel wurde auf dem Gelschlitten in eine mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und komplett mit TAE überschichtet, der Kamm wurde gezogen. Die DNA und der vorgefertigte Marker wurden mit der adäquaten Menge Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80-130V.

Agarosegel-Elektrophorese wurde sowohl zu analytischen wie auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Im ersteren Fall wurden kleine Mengen (5-10 $\mu$ l) eines Restriktionsverdau oder eines PCR-Produkts aufgetragen und die DNA-Banden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht. Eine an einen PC angeschlossene UV-Kamera ermöglichte die Aufnahme und Weiterverarbeitung von Gelbildern. Zu präparativen Zwecken wurden präparative Restriktionsverdau (100 $\mu$ l) auf große Taschen aufgetragen und die DNA mit einer UV-Handlampe mit geringer Intensität sichtbar gemacht, um UV-induzierte Strangbrüche zu vermeiden.

#### 2.2.1.12. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um durch Restriktionsverdau entstandene, über ein Agarosegel aufgetrennte und zur Ligation bestimmte DNA-Fragmente aus einem Gel zu isolieren, wurde das Pure Link Quick Gel Extraction Kit von Invitrogen verwendet.

Unter schwachem UV-Licht wurde die gewünschte DNA Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gebracht. Im ersten Schritt der Aufreinigung wurde das Gelstück unter Zufuhr von Wärme in einem vorgefertigten Puffer aufgelöst. Das Gemisch wurde auf eine mitgelieferte Anionenaustauscher-Säule geladen und die gebundene DNA mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution aus der Säule erfolgte mit warmem (65-70°C) TE-Puffer. Der Erfolg von Auftrennung und Aufreinigung wurde per Gelelektrophorese überprüft, die DNA bei -20°C gelagert und für eine Ligation verwendet.

### 2.2.1.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die selektive Vervielfältigung (Amplifikation) eines beliebigen DNA-Abschnittes. Der zu amplifizierende Abschnitt wird durch Auswahl spezifischer Oligonukleotide (Primer) definiert, die an die flankierenden Regionen binden. Ein Primer bindet an den Hauptstrang, der andere an den Komplementärstrang. Je nach den Erfordernissen der Anwendung sind die Primer unterschiedlich lang, als Richtgröße gelten 30 Nukleotide. Die PCR besteht im Wesentlichen aus der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte: Denaturierung, Binden der Primer, Synthese. Die Denaturierung der eingesetzten DNA (*template*), also die Trennung des Doppelstranges in zwei Einzelstränge, erfolgt bei 95°C. Die Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge erfolgt abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide bei Temperaturen zwischen 45 und 65°C. Die gebundenen Primer dienen einer thermostabilen DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die Synthese eines Komplementärstranges bei einer Temperatur von 72°C. Mit jedem der bis zu 40 Zyklen wird die Menge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes verdoppelt. Die PCR erfolgt in einer programmierbaren Maschine (Thermocycler).

Die PCR wurde fast ausschließlich zu präparativen Zwecken eingesetzt, zum einen im Rahmen der PCR-Mutagenese (s.u.), zum anderen zum selektiven Amplifizieren von Genomabschnitten samt Einfügung von Restriktionsschnittstellen zwecks späterer Klonierung des PCR-Produktes. Außerdem wurde die PCR diagnostisch zum Nachweis von Virus-DNA in aus Zellkultur isolierter DNA verwendet. Für präparative Anwendungen wurde eine Pfu-Polymerase eingesetzt, die dank einer Korrekturaktivität weniger fehlerhafte Nukleotide einbaut als die zu diagnostischen Zwecken eingesetzte Taq-Polymerase.

Für die PCR-Reaktionen wurde folgender 50µl-Ansatz verwendet.

template	20ng
Primer (sense)	30pmol

Primer (antisense)	30pmol
dNTPs (10mM)	1µl
Pfu-Puffer mit 20mM MgSO <sub>4</sub> (10x)	5µl
Pfu-Polymerase (2,5u/µl)	1µl
A. dest.	ad 50µl

Für diagnostische PCRs wurde statt Pfu-Polymerase Taq-Polymerase mit Taq-Puffer eingesetzt. MgCl<sub>2</sub> lag im Reaktionsmix mit 2,5mM vor.

Für alle PCR-Reaktionen wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

Initiale Denaturierung	95°C	2min
Denaturierung	95°C	30s
Annealing	60°C	30s
Synthese	72°C	30s-8min
(Wiederholung 35x)		
Synthese	72°C	5min
Kühlung	4°C	unendlich

Die Synthesezeit wurde von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes und der verwendeten Polymerase abhängig gemacht (Pfu: 2min pro kB, Taq: 1min pro kB).

#### 2.2.1.14. Klonierung von PCR-Produkten

Durch Polymerase-Kettenreaktion amplifizierte DNA-Fragmente können in Vektoren kloniert und als Plasmid über Bakterien vermehrt werden. So stehen die klonierten Sequenzen für weitere Anwendungen theoretisch in unendlicher Menge zur Verfügung. Technisch bedient man sich häufig der Methode der TA-Klonierung. Von der Taq-Polymerase produzierte dATP-Überhänge an den Enden des PCR-Produkts lagern sich an dTTP-Überhänge, die an den

linearisierten Vektor gehängt wurden. Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das PCR Cloning Kit von Qiagen verwendet.

2µl des PCR-Produktes wurden mit 50ng des mitgelieferten Vektors (pDrive Cloning Vector) und vorgefertigtem Mastermix in einem Ligationsansatz von 10µl Gesamtvolumen verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30min im Kühlschrank. 2µl der Ligation wurden anschließend nach Protokoll in die mit dem Kit gelieferten kompetenten Zellen transformiert, 100µl der Suspension wurden am Ende der Prozedur auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C konnten vom Agar Einzelkolonien gepickt werden, von denen Minipräparationen angeimpft wurden. Die präparierte DNA wurde durch Restriktionsverdau auf Vorhandensein und Orientierung des klonierten PCR-Produktes untersucht.

#### 2.2.1.15. Mutagenese von Plasmiden per PCR

Über die Verwendung speziell hergestellter Oligonukleotide in einer PCR lassen sich punktuell Basen in der Sequenz eines Plasmids austauschen.

Für jede der zu verändernden Basen wurden zwei Primer, einer in sense-, einer in antisense-Orientierung, hergestellt, die die gewünschte andere Base enthielten. Die Primersequenzen überschneiden sich auf einer Länge von 15-20 Nukleotiden. Die Mutationsprimer wurden in einer PCR wie oben beschrieben eingesetzt, verwendet wurde eine Pfu-Polymerase. Durch die PCR entstehen als Produkte Plasmide, die die gewünschte Sequenz an der Zielposition aufweisen. Um unerwünschte template-DNA zu eliminieren wurde ein Verdau mit DpnI durchgeführt. DpnI ist ein Restriktionsenzym, das aufgrund seiner Erkennungssequenz von nur 4 Nukleotiden eine DNA sehr häufig schneidet und dadurch ein Plasmid regelrecht fragmentiert. Das Enzym schneidet nur methylierte Plasmid-DNA, keine PCR-Produkte, der durchgeführte Verdau zerstückelt also nur die template-DNA. Der Verdau des aufgereinigten PCR-Ansatzes erfolgte mit 20U Enzym in einem 60µl-Ansatz 2h bei 37°C, das Enzym wurde anschließend eine halbe Stunde bei 80°C denaturiert. Kompetente Zellen wurden mit 10µl des Verdau transformiert, die gewonnenen

Klone durch Restriktionsverdau untersucht und der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung überprüft.

#### 2.2.1.16. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Grundlage der Sequenzierung von DNA ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger von 1977, die inzwischen in der Praxis mit vorgefertigten Reagenzgemischen und Sequenzierautomaten vergleichsweise einfach durchgeführt werden kann. Durchgeführt wird eine PCR mit nur einem Primer, vom dem aus eine DNA-Polymerase aus einem Nukleotidgemisch, das neben dNTPs auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthält, unterschiedlich lange DNA-Stränge synthetisiert. Wird zufällig ein ddNTP eingefügt, führt das zum Kettenabbruch. Im Laufe der PCR entsteht also ein Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge (bis zu etwa 600Bp). An die ddNTPs ist ein fluorochromer Farbstoff gekoppelt. Im Sequenzierautomaten wird das Gemisch aufgetrennt und die Sequenz kann über die markierten Strangenden abgelesen werden. Die Sequenzanalyse erfolgt computergestützt mit spezieller Software, die die Darstellung, Bearbeitung und Gegenüberstellung (Alignment) von Sequenzen ermöglicht. Um möglichst vollständige Gesamtsequenzen zu erhalten, wird bei der Primerauswahl darauf geachtet, dass sich die resultierenden Einzelsequenzen überschneiden.

Für eine Sequenzier-PCR wurden in einem 5ml-Ansatz 0,33µl Primer, 1µl Reaktionsmix (BigDye) und 1µl Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer eingesetzt. 0,5µl der zu sequenzierenden DNA wurden zugegeben. Das PCR-Programm umfasste 24 Wiederholungen von Denaturierung bei 95°C 20s, Annealing bei 50°C 20s und Synthese bei 60°C 4min. Die PCR-Produkte wurden in die Sequenzierabteilung gegeben und dort aufgereinigt und automatisch sequenziert. Zur Aufbereitung und Bearbeitung der Sequenzen wurde die SeqMan-Software von LaserGene verwendet.

## 2.2.2. Zellkultur und Virusanzucht

### 2.2.2.1. Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Steril-Arbeitsbank durchgeführt. Die Haltung der Zellen erfolgte in Kulturflaschen aus Kunststoff bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit im Zellkultur-Brutschrank. Für alle Kulturen wurde DMEM mit 10% FCS als Nährmedium verwendet. Wenn sich die Zellen einer Kultur bis zur Konfluenz vermehrt hatten, wurde die Kultur geteilt (gesplittet), im Regelfall 1:10. Dazu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit ATV gespült und die Zellen mit frischem ATV vom Flaschenboden abgelöst. Nach Verdünnung im Nährmedium wurde 90% der Zellsuspension abgenommen, der Rest wieder mit neuem Nährmedium aufgefüllt. Die abgenommenen Zellen wurden für Versuche ausgesät oder verarbeitet, andernfalls verworfen.

### 2.2.2.2. Transfektion von 293T-Zellen

Der Begriff der Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Labortechnisch gibt es mehrere Möglichkeiten, DNA dahingehend zu präparieren, dass sie die Zellmembran passieren und von der Zelle aufgenommen werden kann. Zur Transfektion wurde das FuGENE6 Transfection Reagent oder Polyfect-Transfektionsreagenz eingesetzt. Des Weiteren wurde auch auf die Methode der Calciumtransfektion zurückgegriffen. Zur Transfektion mit FuGENE6 wurden am Vortag der Transfektion jeweils  $9 \times 10^5$  293T-Zellen auf Schalen einer 6er-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden 3µl FuGENE-Reagenz in 97µl OPTI-MEM gebracht und für 5min bei RT inkubiert. Dem Ansatz wurde 1µl Plasmid-DNA (1µg/µl) zugegeben, außerdem 1µl GFP (*green fluorescent protein*)-Plasmid (1µg/µl) als Indikator. Nach 30minütiger Inkubation bei RT wurde das Nährmedium von den Zellen abgesaugt und die Transfektionslösung mit 2ml frischem Nährmedium auf die Zellen gegeben.

ED-Zellen wurden mit Hilfe von Polyfect-Reagenz transfiziert. Dazu wurden ED-Zellen in SFM auf ein Schalen einer 12er-Platte ausgesät. Das Transfektionsreagenz wurde aus 33 $\mu$ l OPTI-MEM mit 0,5 $\mu$ g des Plasmids und 0,5 $\mu$ g GFP-Plasmid und 4 $\mu$ l Polyfect-Reagenz zusammengestellt. Nach 10minütiger Inkubation wurden 0,5 $\mu$ l frisches Medium und das Transfektionsreagenz auf die Zellen gegeben.

Für die Calciumtransfektion von ED-Zellen wurden die Zellen auf Schalen einer 12er-Platte ausgesät. Für das Transfektionsreagenz wurden 6 $\mu$ l einer 2,5M-Calciumchloridlösung und 3,5 $\mu$ g Plasmid-DNA (3 $\mu$ g Zielplasmid, 0,5 $\mu$ g Indikatorplasmid) in 50,5 $\mu$ l Wasser gegeben. Dieser Ansatz wurde unter Vortexen zu 60 $\mu$ l 2xHBS (HEPES Buffered Saline) getropft. Nach 30minütiger Inkubation wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben, am Folgetag das Medium gewechselt.

Die Zellen wurden nach jeder Transfektion über zwei Tage inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das mittransfizierte Indikatorplasmid bewirkt ein grünes Aufleuchten der transfizierten Zellen, so dass der Transfektionserfolg überprüft werden kann.

#### 2.2.2.3. Infektion von Zielzellen und Viruskultur

Erfolgreich mit einem infektiösen Klon eines Virus transfizierte Zellen produzieren vollständige, infektiöse Viruspartikel. Zum Teil liegen diese im Überstand, zum Teil in den Zellen der Zellkultur vor. Mit den entstandenen Viren lassen sich Zielzellen einer anderen Zellkultur infizieren. Viele Viren, darunter die Foamyviren lassen sich in einer Zellkultur halten und aus dieser für molekularbiologische, proteomische oder mikroskopische Untersuchungen gewinnen.

Von einer erfolgreich transfizierten 293T-Zellkultur wurden 500 $\mu$ l des Überstands abgenommen, in eine Einwegspritze aufgezogen und durch einen Sterilfilter der Porengröße 0,45 $\mu$ m gepresst. Der jetzt zellfreie Überstand wurde umgehend auf eine BHK-21-Zellkultur gegeben. Die infizierte Kultur wurde über

mehrere Tage bebrütet und täglich mikroskopisch auf sichtbare zytopathogene Effekte untersucht.

Die Fortführung der Viruskultur kann je nach Erfordernissen unterschiedlich gestaltet werden. Um möglichst hohe Virustiter in einer Kultur zu erzeugen, kann die Kultur gespalten und sowohl ein Teil der Zellen mit dem überwiegend zellständigen Virus als auch ein Teil des Überstandes mit Viruspartikeln in eine neue Kulturschale gegeben werden. Je nach Ausmaß der Zellyse werden frische, nicht infizierte Zellen hinzugegeben. Durch Fortführung der Viruskultur mittels zellfreier Passagen lässt sich das Vorhandensein freier, infektiöser Viruspartikel über die Zeit verfolgen und mit jeder Passage neu nachweisen.

Beide Spielarten der Viruskultur wurden verwendet. Die Spaltung von Viruskulturen erfolgte vergleichbar dem Vorgehen, dass allgemein in der Zellkultur verwendet wurde (s. o.). Zusätzlich zu dem frischen Nährmedium wurden 500µl des Überstandes der Kultur in die neue Schale transferiert. Für zellfreie Passagen des Virus wurden lediglich 500µl der infizierten Zellkultur abgenommen, sterilfiltriert (Porengröße 0,45µm) und damit eine frische Zellkultur infiziert.

#### 2.2.2.4. Färbung und Mikroskopie von Zellkulturen

Die Mikroskopie von Zellkulturen kann durch Anfärbung der Zellkerne erleichtert werden. So lassen sich Besonderheiten wie z. B. Synzytienbildung leichter erkennen und darstellen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde Giemsa's Lösung verwendet, welche eine vorherige Fixierung der Zellen mit Methanol erfordert. Der Effekt der Anfärbung beruht auf einer Komplexbildung zwischen der DNA im Nukleus und den in Giemsa's Lösung enthaltenen Farbstoffen (Eosinaten).

Zur Färbung wurde das Medium aus den Kulturschalen abgegossen und die Zellen mit Methanol überschichtet. Das Methanol wurde abgewaschen und die fixierten Zellen mit verdünnter Giemsa-Lösung (1 Tropfen auf 10ml Wasser) bedeckt und für 30min bei RT inkubiert. Die Schalen wurden anschließend mit Wasser gespült. Die Kulturen wurden im Lichtmikroskop betrachtet, von

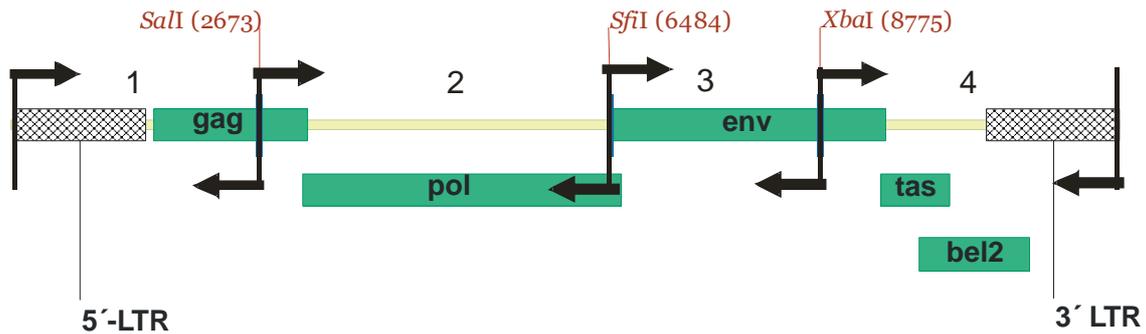
aussagekräftigen Einstellungen wurden Bilder mit der Mikroskopkamera gemacht.

### **3. Ergebnisse**

Zur Beurteilung der Lokalisation von Partikelreifung (Assembly) und Ausknospung des EFV ist die Expression des Virus in Zellkultur unabdingbar. Um potentielle für diesen Teil des viralen Replikationsszyklus kritische Genomabschnitte identifizieren zu können, ist außerdem eine größtmögliche Sicherheit in Bezug auf die Sequenz des exprimierten Virus wünschenswert. Aus diesen praktischen Überlegungen in Bezug auf dauerhafte Verfügbarkeit und Sequenzsicherheit des Virus entschlossen wir uns, einen infektiösen EFV-Klon, der das vollständige EFV-Genom enthält, zu etablieren. Mit Hilfe dieses Klons sollte in Zellkultur exprimiertes Virus elektronenoptisch bezüglich des Assembly und der Virusfreisetzung untersucht werden. Im Falle einer Bestätigung des Befundes der bisherigen Publikationen zu EFV wäre mit dem infektiösen Plasmid eine Grundlage für weitere notwendige Untersuchungen auf genomischer Ebene geschaffen.

#### **3.1. Analyse vorliegender Konstrukte mit vollständigem EFV-Genom (pEFV)**

Im Rahmen der bisherigen Arbeiten mit EFV wurden bereits Konstrukte geschaffen, die die Sequenz des kompletten EFV-Genoms beinhalteten. Zur Herstellung dieser Plasmide war das EFV-Genom in vier Abschnitten aus einer EFV-infizierten Zellkultur per PCR amplifiziert worden. Die Abgrenzung der vier amplifizierten Genomabschnitte und die Wahl der zugehörigen Primer orientierte sich an drei Einfachschnittstellen im Genom, um ein späteres Aneinanderfügen der Fragmente zu ermöglichen (Darstellung der PCR-Strategie in Abb. 3.1.)



## EFV-Genom 12033 Bp

**Abbildung 3.1.:** Schematische Darstellung der PCR-Amplifikation von EFV-Genomfragmenten. Das Genom ist anhand von Einzelschnittstellen in vier Abschnitte eingeteilt worden, welche maßstabsgerecht abgebildet werden. Die verwendeten Primer sind durch Pfeile angedeutet. Die in Vektoren klonierten Genomteile 1-4 wurden über die verzeichneten Einzelschnittstellen des Genoms zusammengefügt.

Das PCR-Produkt wurde jeweils über eine TA-Klonierung in den Vektor pCR-XL-TOPO kloniert. Die vier klonierten Genomabschnitte wurden über innerhalb der EFV-Sequenz einfach schneidende Restriktionsenzyme Schritt für Schritt zusammengefügt. Mit den resultierenden Plasmiden, die das komplette Genom beinhalten sollten, wurde versucht, in Zellkultur EFV zu exprimieren. Dazu wurden die Plasmide in BHK-Zellen transfiziert und über Tage inkubiert. Es gelang jedoch auf keine Weise, in der Zellkultur EFV nachzuweisen. Um das Ziel eines infektiösen Klons zu erreichen, galt es eine vollständige Analyse des klonierten Genoms durchzuführen und dabei potentielle Hindernisse für die Expression von EFV zu identifizieren.

### 3.1.1. Sequenz- und Restriktionsanalyse von pEFV-Konstrukten

Drei vorliegende Plasmide, benannt pEFV4, pEFV8 und pEFV13, jeweils mit einer Größe von ca. 15600 Basenpaaren, bestehend aus per PCR hergestellten und aneinander gefügten Genomteilen von EFV im Vektor pCR-XL-TOPO, wurden sequenziert. Vorherige Versuche, mit diesen Konstrukten EFV zu exprimieren waren gescheitert. Für die Sequenzierreaktionen wurden Primer verwendet, die auf Grundlage der publizierten EFV-Sequenz (Tobaly-Tapiero et al. 2000) hergestellt worden waren. Um das gesamte Virusgenom abzudecken,

wurde als Abstand zwischen den Primern jeweils etwa 500 Bp gewählt, so dass ein sicheres Überlappen der gewonnenen Einzelsequenzen von etwa 600-700 Bp Länge gewährleistet war. Die Sequenzen der beiden LTRs sollten sich in der Theorie entsprechen, die eingesetzten Primer binden sowohl in der 5'-LTR als auch in der 3'-LTR. Um eine sichere Unterscheidung der LTR-Sequenzen zu ermöglichen, wurde die 3'-LTR der subklonierten hinteren Genomteile sequenziert. Die 5'-LTR wurde von außerhalb der LTR-Sequenz bindende Primern (m13forward, EFV Seq 1493a) ausgehend sequenziert, die zugehörigen Sequenzen waren damit eindeutig zuzuordnen. Die erstellten überlappenden Sequenzen wurden mit Hilfe des Computers in einem Alignmentprogramm dargestellt. Auftretende Lücken und Sequenzunsicherheiten wurden mit Hilfe der vorliegenden oder speziell für die Zielregion erstellte Primer nachsequenziert. Die Aufbereitung der Sequenzen erlaubte die Ableitung einer Consensus-Sequenz gültig für die drei unabhängigen pEFV-Klone. Die Consensus-Sequenz (EFV.de) wurde der publizierten EFV-Sequenz (EFV.fr) gegenübergestellt. Dabei stellte sich heraus, dass die vorliegenden Konstrukte das vollständige EFV-Genom im Vektor pCR-XL-TOPO enthielten. Die kanonischen offenen Leseraster und die LTRs des EFV konnten auch auf dem Plasmid identifiziert und kartiert werden (Plasmidkarte in Abb. 3.2). Das Genom lag an zweien der drei Einfachschnittstellen, über die die vier durch PCR hergestellten Genomabschnitte aneinandergesetzt worden waren, in korrekter Orientierung und ohne Unterbrechung der Sequenz vor.

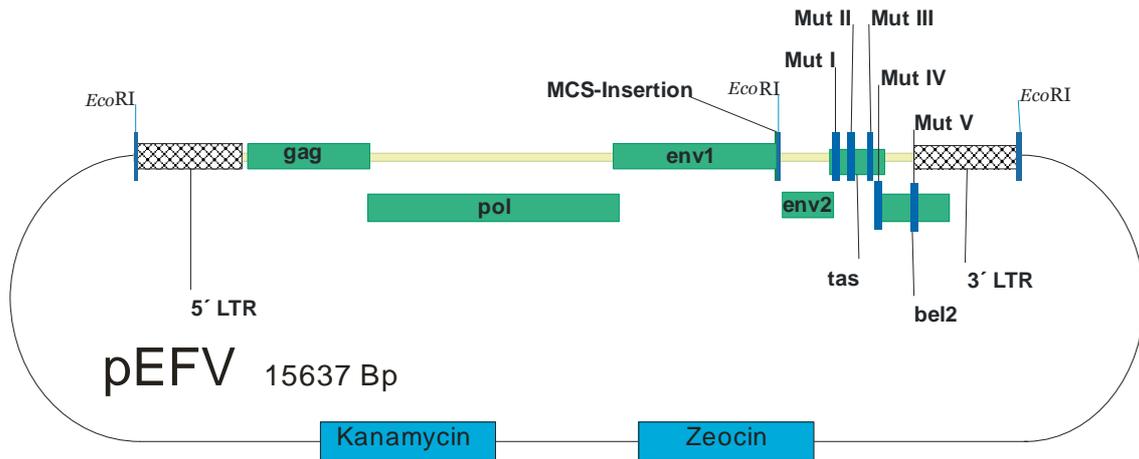


Abbildung 3.2.: Plasmidkarte gültig für pEFV4, pEFV8, pEFV13; maßstabsgetreu dargestellt ist das klonierte EFV-Genom mit den kanonischen Leserastern und den LTRs. Das Genom wird von EcoRI-Schnittstellen des Vektors pCR-XL-TOPO flankiert, eine weitere findet sich innerhalb der gekennzeichneten MCS-Insertion, welche das env1-Leseraster unterbricht. Markiert sind außerdem alle Stopp-Mutationen (I-V).

Eine Reihe von Differenzen zwischen publizierter Sequenz und pEFV-Plasmid wurde aus der Gegenüberstellung beider Sequenzen herausgearbeitet und im Hinblick auf Auswirkungen auf Proteinsequenz und Funktionalität gewichtet.

Der erste Focus lag auf der Basenzahl und der Abklärung möglicher Insertionen und Deletionen, die im Falle eines Vorliegens in einem offenen Leseraster potentiell gravierende Folgen für die Proteinexpression haben. Die publizierte Sequenz EFV.fr umfasst 12035 Basenpaare, die erarbeitete Sequenz EFV.de 12033 Basenpaare. Der Unterschied ist auf zwei zusätzliche Basenpaare in der publizierten Sequenz zurückzuführen, von denen sich eines in der nicht kodierenden 5'-LTR und eines in der 3'-LTR, aber außerhalb von bel2 befindet (vgl. Tabelle 3.1.).

Nr.	Position (flankierende Nukleotide)	Insertion	Region
1	45T 46C	Thymin	5'-LTR (U3)
2	11494G 11495T	Guanin	3'-LTR (U3)

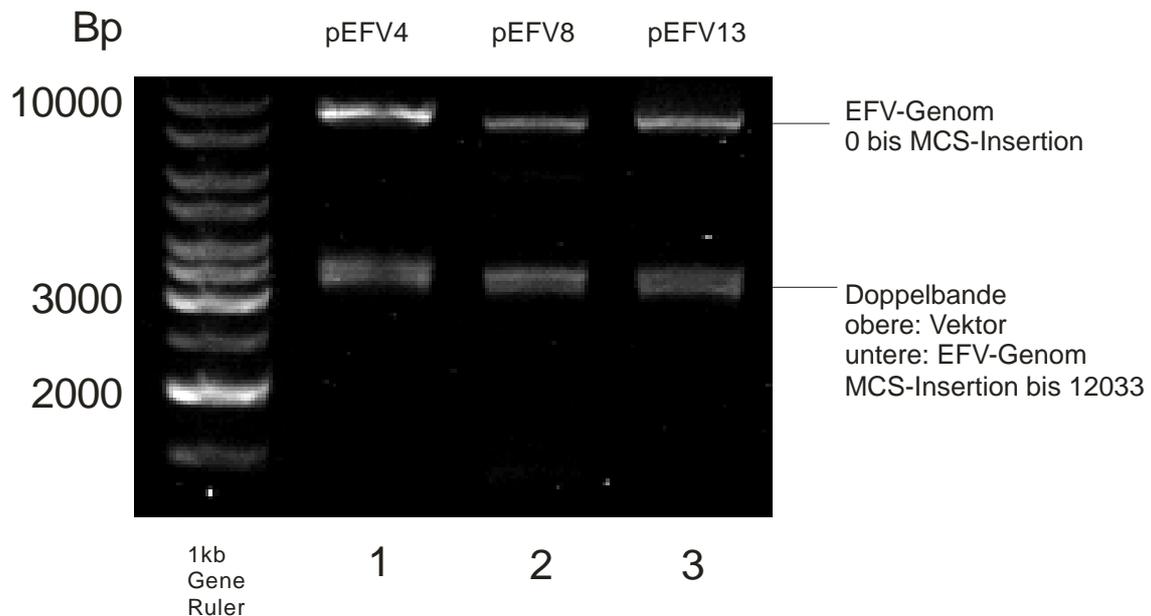
Tabelle 3.1.: gegenüber der EFV.de-Sequenz inserierte Basen der EFV.fr.-Sequenz

Zwischen 45T und 46C der EFV.de-Sequenz befindet sich in der EFV.fr-Sequenz ein inseriertes Thymin. An der äquivalenten Position in der 3'-LTR der EFV.fr-Sequenz zwischen 10631T und 10632C findet sich hingegen keine solche Insertion. In den vorliegenden Plasmiden (EFV.de) ist eine derartige Insertion überhaupt nicht zu finden. Außerdem findet sich zwischen 11494G und 11495T der EFV.de-Sequenz in der EFV.fr-Sequenz ein inseriertes Guanin. In den LTRs der EFV.de-Sequenz sowie an der äquivalenten Position in der EFV.fr-Sequenz zwischen 909G und 910T findet sich dieses Guanin nicht.

Die Unstimmigkeiten zwischen den Sequenzen berühren keine für die Funktionalität des Genoms bekannten Motive oder Leseraster, sind also im Hinblick auf die Etablierung eines infektiösen Klons zu vernachlässigen. Die unterschiedliche Anzahl an Basenpaaren hat jedoch Konsequenzen für alle im Laufe dieser Abhandlung folgenden Positionsgaben von Mutationen, Schnittstellen und vergleichbaren Angaben. Soweit nicht explizit anders vermerkt, beziehen sich alle weiteren Positionsangaben auf die EFV.de-Sequenz. Die entsprechenden Positionen auf der EFV.fr-Sequenz sind jeweils ein bzw. zwei Bp abwärts zu finden.

Bei der Sequenzanalyse von pEFV wurde eine Unterbrechung der Genomsequenz durch eine Einfügung von 85 Bp abwärts von Position 8780A festgestellt. Da diese Insertion von ihrer Beschaffenheit her keinesfalls als eine Variation des Virus eingeschätzt werden konnte und außerdem direkt an eine XbaI-Schnittstelle anschloss, die beim Zusammenfügen der klonierten Genomabschnitte verwendet worden war, ging man hier von einem Fehler bei der Zusammenstellung des Plasmide aus. Entsprechend fand dieser Sequenzteil keinen Eingang in die Consensus-Sequenz EFV.de, die sich nach der Einfügung mit 8781A fortsetzt. Die inserierte Sequenz enthält eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle, die benutzt wurde, um das Vorhandensein dieser großen Insertion auch im Restriktionsverdau nachzuweisen. Die pEFV-Plasmide sollten ohne die Insertion lediglich das EFV-Genom als eingefügte Sequenz flankierende EcoRI-Schnittstellen des Vektors pCR-XL-TOPO enthalten. EcoRI schneidet im EFV-Genom nicht, als Produkte wären also zwei Fragmente, EFV-Genom (12 kBp) und Vektor (3,5 kBp) zu erwarten gewesen.

Da sich im Restriktionsverdau drei Fragmente zeigten (vgl. Abb. 3.3.), war das Vorhandensein einer weiteren Schnittstelle bewiesen, das Bandenmuster entsprach den Erwartungen bei Lokalisation der zusätzlichen Schnittstelle in der Insertion.



**Abbildung 3.3.: Diagnostischer Verdau von Plasmid-DNA mit EcoRI; 1: pEFV4, 2: pEFV8, 3:pEFV13. Das Restriktionsmuster mit den markierten drei Banden beweist die Existenz einer weiteren EcoRI-Schnittstelle. Ohne zusätzliche Schnittstelle in der MCS-Insertion wären lediglich zwei Banden zu erkennen (Vektor 3,5 kBp; Genom 12 kBp).**

Da diese Einfügung das env-Leseraster unterbrach und auf jeden Fall einer Expression des EFV im Weg stand, wurde sie näher analysiert (siehe 3.1.2.).

Neben dieser großen Insertion wurde eine Vielzahl von punktuellen Abweichungen der Sequenz des klonierten Genoms gegenüber der publizierten Sequenz festgestellt. Insgesamt wurden an 87 Positionen des Genoms in der ermittelten Consensus-Sequenz andere Basen gefunden als in der publizierten EFV.fr-Sequenz. Diese Punktmutationen befanden sich fast allesamt im abwärts der XbaI-Schnittstelle an Position 8775 gelegenen Teil des Genoms, entsprechend dem Abschnitt 4 bei der initialen PCR-Amplifikation des Genoms. Betroffen waren damit die Leseraster env, tas und bel2 sowie die 3'-LTR. Lediglich vier Abweichungen lagen außerhalb dieses Abschnitts und allesamt im env-Leseraster. Die Leseraster gag und pol sowie die 5'-LTR waren in

beiden Sequenzen, abgesehen von der oben angeführten zusätzlichen Thyminbase in der publizierten Sequenz, vollständig identisch. Die bei weitem häufigste Abweichungen waren G>A-Mutationen in der EFV.de-Sequenz, diese machten 81,6% der Punktmutationen aus.

Im Bereich der 3'-LTR fanden sich an 39 Positionen Abweichungen zwischen der EFV.de- und der EFV.fr-Sequenz (vgl. Abb. 3.1.). Die meisten Abweichungen zwischen publizierter Sequenz und erarbeiteter Consensus-Sequenz waren dergestalt, dass statt einem Guanin in der EFV.de-Sequenz ein Adenin entdeckt worden war. 31 Abweichungen waren in der U3-Region, 5 in der R-Region und 3 in der U5-Region gelegen. Die Veränderungen beeinträchtigen die Sequenz des Bet-Proteins (s.u.), eine Beeinflussung funktionell wichtiger Motive der LTR wurde als fraglich angesehen.

Basenpaar-Differenzen der 3'-LTRs von EFV.de und EFV.fr					
Nr.	Position (Nukleotid)	3'-LTR.de	3'-LTR.fr	LTR- Region	Konsequenz
1	10593	A	G	U3	Alteration der Bet- Sequenz (siehe Tab. 3.4.)
2	10614	A	G	U3	
3	10627	T	C	U3	
4	10628	T	C	U3	
5	10648	A	G	U3	
6	10658	A	C	U3	
7	10666	A	G	U3	
8	10700	A	G	U3	
9	10726	A	G	U3	
10	10732	A	G	U3	
11	10774	A	G	U3	
12	10781	A	G	U3	
13	10865	A	G	U3	
14	10907	A	G	U3	
15	10937	A	G	U3	

16	10948	A	G	U3	
17	11095	A	G	U3	
18	11103	A	G	U3	
19	11373	A	G	U3	
20	11419	A	G	U3	
21	11425	A	C	U3	
22	11433	A	C	U3	
23	11445	A	G	U3	
24	11530	A	G	U3	
25	11531	A	G	U3	
26	11572	A	G	U3	
27	11578	A	G	U3	
28	11611	A	G	U3	Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA beeinträchtigt?
29	11644	A	G	U3	
30	11649	A	G	U3	
31	11703	A	G	U3	
32	11774	A	G	R	Überlappung der R- Regionen betroffen?
33	11795	A	G	R	
34	11808	A	G	R	
35	11819	A	G	R	
36	11824	A	G	R	
37	11850	A	G	U5	keine Relevanz
38	11866	A	G	U5	
39	11901	A	G	U5	

**Tabelle 3.2.: Punktuelle Abweichungen der 3'-LTRs zwischen EFV.de- und EFV.fr-Sequenz.**

Im env-Leseraster fanden sich 24 Basenpaar-Differenzen zwischen der publizierten Sequenz und dem Consensus-Sequenz der pEFV-Konstrukte, die in Tabelle 3.2. im Überblick dargestellt sind. Drei dieser Abweichungen haben keine Auswirkungen auf die Proteinsequenz, da das veränderte Kodon für die gleiche Aminosäure kodiert. Die Differenzen konzentrieren sich auf den abwärts

gelegenen Teil von env, sie betreffen also auf Proteinebene die TM-Untereinheit. Lediglich drei veränderte Aminosäuren finden sich in der SU-Untereinheit. Der Bereich der Protease-Schnittstelle zwischen SU- und TM-Untereinheit sowie das Signalpeptid sind nicht von Veränderungen betroffen.

Nr.	Nukleotid-Position	AS-Position Env-Protein	Base		Aminosäure	
			EFV.de	EFV.fr	EFV.de	EFV.fr
1	6718	62	A	C	T	P
2	6895	121	G	A	A	T
3	8066	571	G	A	G	D
4	8436	634	A	T	S	S
5	8821	763	A	G	K	E
6	8845	770	A	G	K	G
7	8846	770	A	G	K	G
8	8863	777	A	G	N	D
9	8878	782	A	G	T	A
10	8919	795	A	G	L	L
11	8927	798	A	G	E	G
12	8962	810	A	G	T	A
13	9011	826	C	G	T	R
14	9044	837	A	G	Q	R
15	9090	852	A	G	L	L
16	9148	872	A	G	K	E
17	9158	875	A	G	N	S
18	9241	903	A	G	K	E
19	9259	909	A	G	K	G
20	9260	909	A	G	K	G
21	9286	918	A	G	T	A
22	9326	931	A	G	E	G
23	9337	935	A	G	N	D

24	9488	985	A	G	E	G
----	------	-----	---	---	---	---

**Tabelle 3.3.: Übersicht über punktuelle Abweichungen im env-Leseraster zwischen EFV.de und EFV.fr.**

Da in der EFV.de-Sequenz zwar eine Reihe anderer Aminosäuren als in der publizierten Env-Sequenz vorlagen, aber keine Stoppkodons im Leseraster vorhanden waren, wurden hier keine zwingenden Hindernisse zur Expression von EFV gesehen. Im allgemein sehr variablen Env-Protein wurden die Aminosäuredifferenzen als nicht expressionskritisch betrachtet.

In den Leserastern der regulatorischen Proteine Tas und Bet fanden sich 40 Basenpaare punktuelle Differenzen zwischen den beiden Basensequenzen. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 3.3., wobei die Einträge Nr. 26-40 Positionen betreffen, die bereits für die LTR dokumentiert worden sind (siehe Tab. 3.1.). Hier werden sie nochmals im Hinblick auf ihre Auswirkungen auf das Bet-Protein dokumentiert und untersucht.

Nr.	Nukleotid- Position	AS-Position Protein	Basen		Aminosäuren	
			EFV.de	EFV.fr	EFV.de	EFV.fr
1	9488	Tas/Bet 16	A	G	R	R
2	9511	Tas/Bet 24	A	G	Stopp	W
3	9512	Tas/Bet 24	A	G	Stopp	W
4	9513	Tas/Bet 25	A	G	K	E
5	9518	Tas/Bet 26	A	G	V	V
6	9519	Tas/Bet 27	A	G	N	D
7	9731	Tas 97	A	G	Stopp	W
8	9744	Tas 102	A	G	N	D
9	9759	Tas 107	A	G	K	E
10	9880	Tas 147	G	A	G	D
		Bet 48			A	T
11	9892	Tas 151	A	G	Y	C

		Bet 52			T	A
12	9897	Tas 153 Bet 54	A	G	K K	E K
13	9914	Tas 158 Bet 59	A	G	Q K	Q R
14	9974	Tas 178 Bet 81	A	G	Q N	Q S
15	9987	Tas 183 Bet 85	T	C	Stopp I	Q I
16	10082	Tas 214 Bet 117	A	G	E S	E N
17	10106	Tas 222 Bet 125	A	G	I Stopp	M W
18	10214	Bet 161	G	A	C	Y
19	10261	Bet 177	A	G	T	A
20	10336	Bet 202	T	C	F	P
21	10337	Bet 202	T	C	F	P
22	10360	Bet 209	A	G	R	R
23	10373	Bet 214	A	G	K	R
24	10472	Bet 247	G	A	R	K
25	10549	Bet 273	A	G	T	A
26	10593	Bet 287	A	G	Stopp	W
27	10614	Bet 294	A	G	K	K
28	10627	Bet 299	C	T	T	P
29	10628	Bet 299	C	T	T	P
30	10648	Bet 306	A	G	K	E
31	10666	Bet 312	A	G	N	D
32	10700	Bet 323	A	G	D	S
33	10726	Bet 332	A	G	K	E
34	10732	Bet 334	A	G	T	A
35	10774	Bet 348	A	G	K	E

36	10781	Bet 350	A	G	K	R
37	10865	Bet 378	A	G	N	S
38	10907	Bet 392	A	G	H	R
39	10937	Bet 402	A	G	N	S
40	10948	Bet 406	A	G	N	D

**Tabelle 3.4.: Punktuelle Abweichungen zwischen Efv.de und Efv.fr in den Leserastern von Tas und Bet**

Die punktuellen Differenzen im Genom ziehen im Tas-Protein Abweichungen an acht Positionen der Aminosäuresequenz nach sich. In der auf EFV.de beruhenden Translation finden sich außerdem drei Stopps.

Im Bet-Protein sind zwischen den Aminosäuresequenzen 25 Unterschiede zu verzeichnen, ebenso wie in Tas finden sich in der auf EFV.de beruhenden Translation drei Stopps.

Das Vorhandensein dieser Stopps, die sich auf fünf Positionen der Leseraster tas und bel2 verteilen, wurde neben der großen Insertion in env als Hindernis für eine Expression von EFV gesehen. Im folgenden Kapitel finden sich genauere Beschreibungen der Stopp-Mutationen und ihre genauen Auswirkungen. Die sonstigen Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen wurden zunächst als solche hingenommen und nicht als expressionskritisch eingestuft.

### **3.1.2. Detaillierte Charakterisierung von expressionskritischen Positionen im klonierten EFV-Genom**

Aus der Vielzahl der Differenzen und möglichen Gründe, warum die erstellten Konstrukte nicht replizieren konnten, ließ sich eine überschaubare Anzahl an Positionen herausarbeiten, die einer Expression bestimmter viraler Proteine und damit von EFV auf jeden Fall im Wege standen. Dies sind die Insertion von 85 Basenpaaren im env-Leseraster und insgesamt fünf Positionen, an denen Punktmutationen vorkamen, die Stopps im tas- und bel2-Leseraster setzten (Übersicht in Tabelle 3.3).

Bezeichnung	Veränderung	Konsequenzen
MCS-Insertion	8780:Insertion von 85 Bp	Zerstörung des env-Leserasters ab 748L
Mut I	9511G>A 9512G>A	Tas/Bet 24W>Stopp
Mut II	9731G>A	Tas 97W>Stopp
Mut III	9987C>T	Tas 183Q>Stopp Bet 85I>I
Mut IV	10106G>A	Tas 222M>I Bet 125W>Stopp
Mut V	10593G>A	Bet 287W>Stopp

**Tabelle 3.5.: Synopse der kritischen Mutationen und Insertionen in pEFV. Eine Korrektur dieser Hindernisse war zur Herstellung eines infektiösen Klons unabdingbar.**

Abwärts der XbaI-Restriktionsschnittstelle brach die EFV-Sequenz auf den Plasmiden bei Position 8780A ab. Nach einer 85 Basenpaare umfassenden Insertion setzte sich das Genom mit der Base 8781A fort. Die Sequenz der Insertion war in den oberhalb gelegenen 50 Bp identisch zur komplementären Sequenz der *multiple cloning site* (MCS) von XbaI (389) bis EcoRI (344) von pCR-XL-TOPO. In diesen Vektor waren die per PCR hergestellten Genomabschnitte, aus denen die vorliegenden Plasmide hergestellt worden waren, kloniert worden. Entsprechend der MCS von pCR-XL-TOPO enthielt die Insertion auch die Restriktionsschnittstellen dieses Vektorabschnittes, neben NsiI, XhoI, NotI und EcoRV auch eine EcoRI-Schnittstelle, mit deren Hilfe die Insertion auch im Restriktionsverdau nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.1.1 und Abb. 3.2.). Abwärts der EcoRI-Schnittstelle setzte sich die inserierte Sequenz identisch zur EFV-Sequenz ab 8747T fort. Die inserierte Sequenz endet auf 8780A, die an vergleichbarer Stelle im Genom gelegene XbaI-Schnittstelle ist jedoch durch Austausch von 8779G zu Adenin zerstört.

Die zerstörte XbaI-Schnittstelle lässt die Genese dieser Insertion rekonstruieren. Die XbaI-Schnittstelle an Position 8775 im EFV-Genom wurde

beim Zusammenfügen zweier Genomfragmente benutzt. Bei der Herstellung des abwärts der XbaI-Schnittstelle Genomabschnittes wurde ein fehlerhafter Primer mit Adenin statt Guanin an der Position 8779 verwendet. Die für ein korrektes Zusammenfügen der Genomabschnitte im Sinne der Klonierungsstrategie benötigte Schnittstelle war im abwärts gelegenen Abschnitt somit nicht funktionsfähig, weswegen das Aneinanderfügen über die XbaI-Schnittstelle des PCR-XL-TOPO-Vektors erfolgte. Dieser Vorgang erklärt die Existenz dieser im folgenden MCS-Insertion genannten 85 Basenpaare im klonierten EFV-Genom

Die Unterbrechung des klonierten Genoms betrifft das Env-Protein. Die Insertion macht die Expression von funktionstüchtigem Env unmöglich und ist somit ein zur Etablierung eines infektiösen Klons zu behebendes Hindernis.

An fünf Positionen wurden Punktmutationen beschrieben, die zu einem Stopp in der Translation der codierten Proteine Tas und Bet führen.

Ein Austausch von Guanin zu Adenin an den Stellen 9511 und 9512 bewirkt die Codierung eines Stopps anstelle des Tryptophans an Stelle 24 von Tas und Bet, welche somit auf keine Fall als funktionelle Proteine exprimiert werden können. Diese Veränderung wird im Folgenden als Mutation I geführt.

An Stelle 9731 bewirkt ein Austausch von Guanin zu Adenin die Einführung eines Stoppcodons anstelle des Tryptophancodons an Stelle 97 von Tas, das demzufolge nicht mehr korrekt exprimiert wird. Diese Veränderung wird im Folgenden als Mutation II geführt.

Ein Austausch von Cytosin zu Thymin an Stelle 9987 zieht die Codierung eines Stopps anstelle des beschriebenen Glutamincodons an Stelle 183 von Tas nach sich. Im Leseraster von Bet bleibt die Mutation stumm. Diese Veränderung wird im Folgenden als Mutation III bezeichnet.

An Stelle 10106 bewirkt ein weiterer Austausch von Guanin zu Adenin die Codierung eines Stoppcodons im Leseraster bel2 anstelle eines Tryptophancodons, womit die korrekte Expression von Bet durch Syntheseabbruch an Aminosäure 125 verhindert wird. Im Leseraster von Tas zieht dieser Austausch ein Isoleucincodon anstelle des beschriebenen

Methionins nach sich. Dieser Austausch ist im Folgenden als Mutation IV geführt.

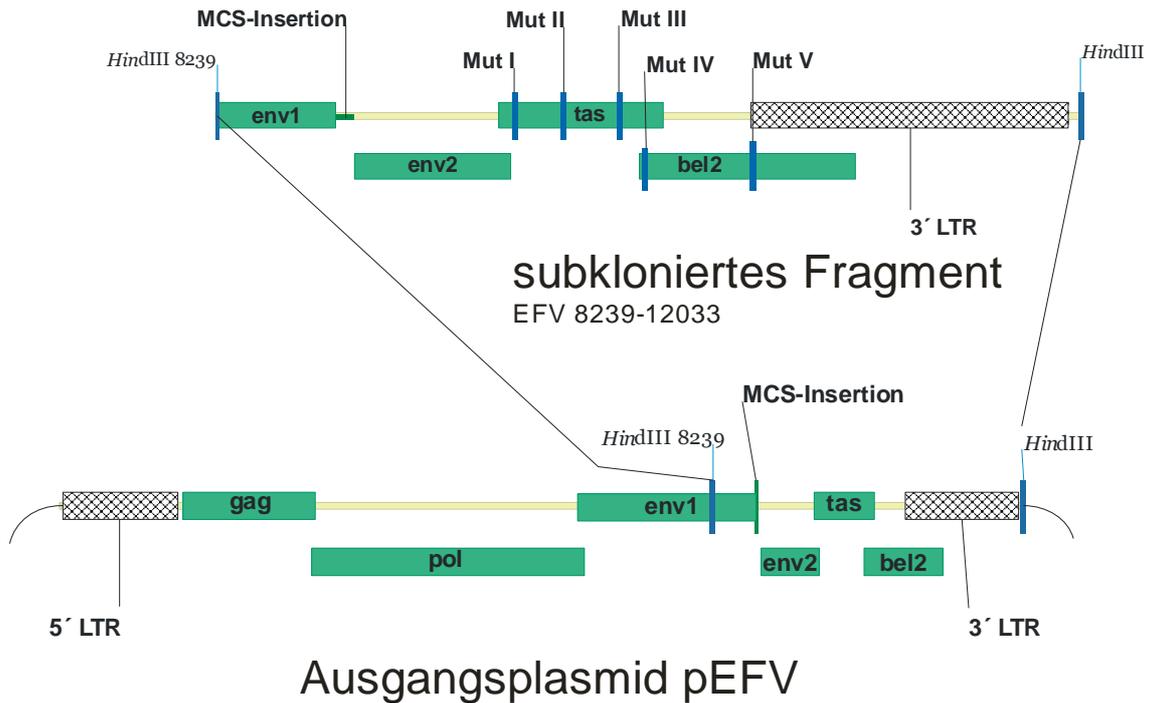
Ein Austausch von Guanin zu Adenin an der Stelle 10593 im klonierten EFV-Genom bewirkt die Einführung eines Stoppcodons anstelle eines Tryptophans im bel2-Raster, die Synthese von Bet wird dadurch an Stelle 287 abgebrochen. Diese Veränderung heißt im Folgenden Mutation V.

Für die Etablierung eines infektiösen Klons auf der Basis der vorliegenden Plasmide ergab sich also, dass zu mindestens die beschriebene Einfügung aus dem Plasmid eliminiert werden musste und die genannten fünf Mutationen zu korrigieren waren.

## **3.2. Eliminierung expressionskritischer Insertionen und Mutationen**

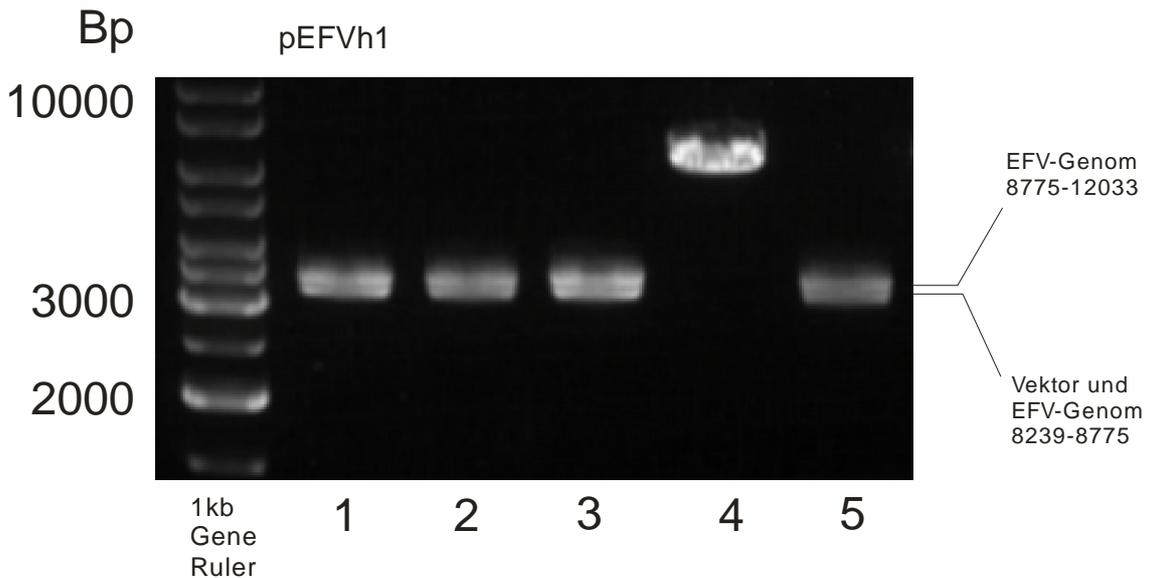
### **3.2.1. Subklonierung von pEFV-Fragmenten**

Um die kritischen Abschnitte mit den beschriebenen expressionskritischen Abweichungen einer Korrektur zugänglich zu machen, wurde der abwärts gelegene Teil des klonierten EFV-Genoms von 8239-12033 subkloniert. Da keine geeigneten Einzelschnittstellen zu finden waren, wurde das Ausgangsplasmid pEFV4 mit HindIII verdaut (vgl. Abb. 3.4) und das nach Gelelektrophorese und Gelextraktion gewonnene Fragment von ca. 3900Bp in das mit HindIII geschnittene Plasmid pUC19 kloniert. Die genutzten HindIII-Schnittstellen befanden sich zum einen im Genom (Position 8239), zum anderen in der an das 3'-Ende des Genoms angrenzende MCS des Vektors.

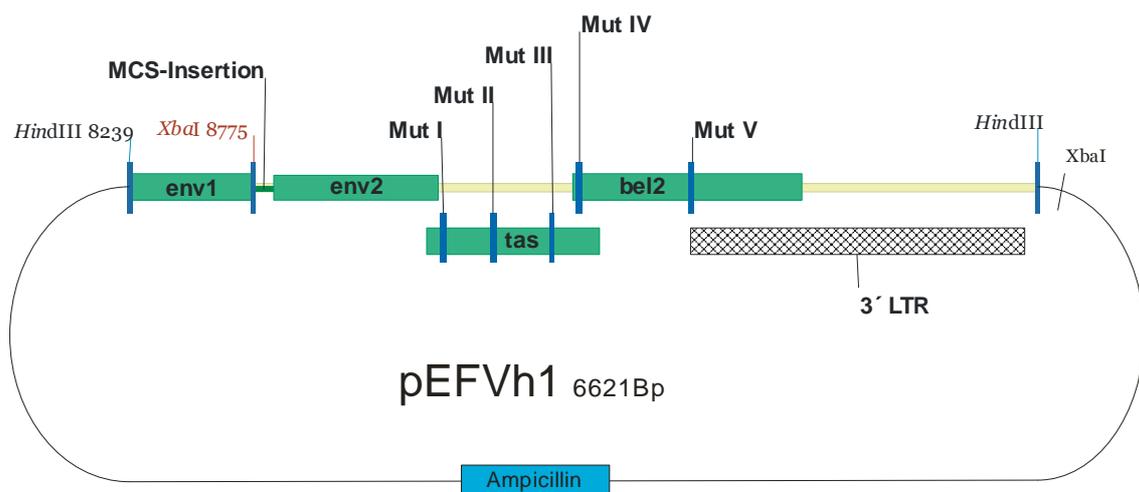


**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung der Subklonierung des Genomabschnittes 8239-12033. als Schnittstellen dienen HindIII an Position 8239 im EFV-Genom und eine HindIII-Schnittstelle aus der an das Genom anschließenden MCS von pCR-XL-TOPO. Das in pUC19 subklonierte Fragment enthält alle zu verändernden Positionen. Die durch die MCS-Insertion getrennten *env*-Abschnitte werden als *env1* und *env2* gekennzeichnet.

Von nach Transformation des Ligationsproduktes gewonnenen Klonen (vgl. Abb. 3.4) wurde ein Klon ausgewählt, in dem das Insert mit seiner pCR-XL-TOPO-MCS an die MCS von pUC19 anschließend orientiert war. Die Orientierung des subklonierten EFV-Genomfragmentes im Vektor ließ sich über einen Verdau der fraglichen Plasmide mit XbaI beurteilen (vgl. die Erläuterungen zu Abb. 3.5. und 3.6.). Der ausgewählte Klon wurde unter dem Namen pEFVh1 für die weiteren Schritte verwendet (Plasmidkarte in Abb. 3.6.).



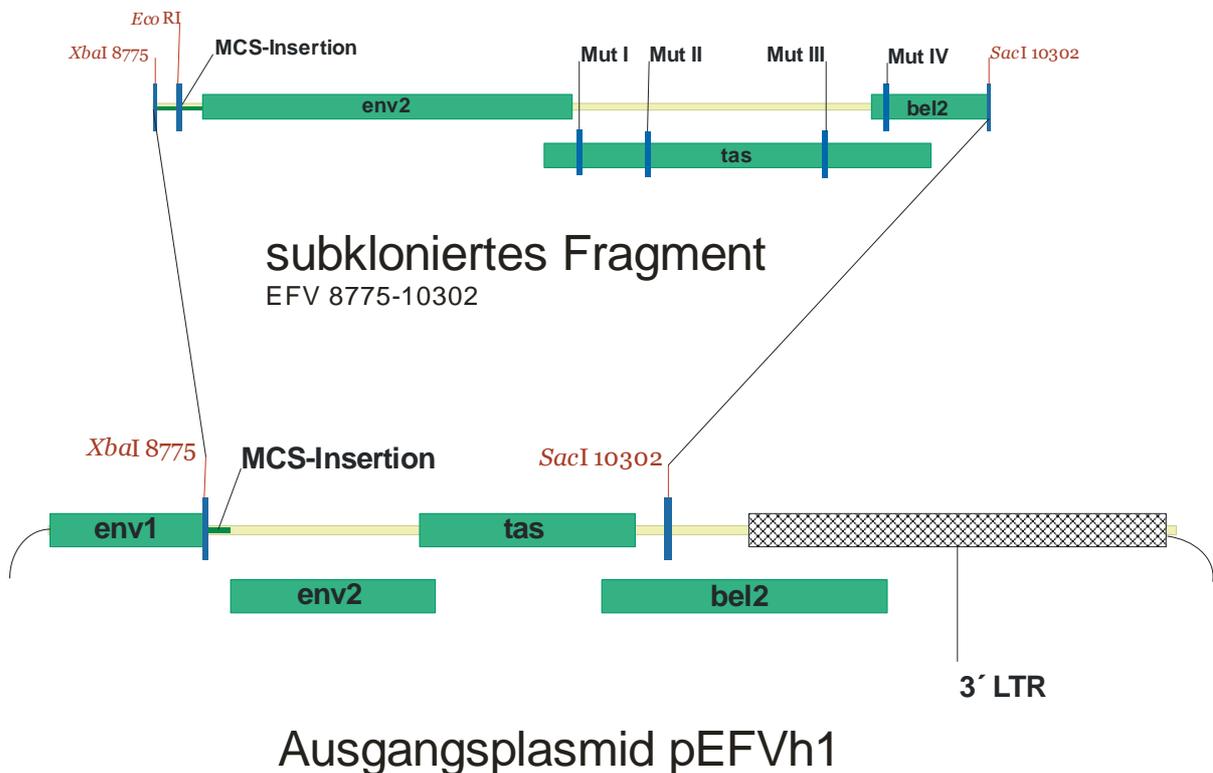
**Abbildung 3.5.: Diagnostischer Verdau von Plasmid-DNA mit XbaI; 1: pEFVh1, 2-5: andere gewonnene Klone. Das Restriktionsmuster (zwei ähnlich große Fragmente) beweist Orientierung des subklonierten Inserts (vgl. Plasmidkarte in Abb. 3.6.). Klon in Spalte 4 mit alternativer Insert-Orientierung (ein erkennbares Fragment).**



**Abbildung 3.6.: Plasmidkarte pEFVh1; der Abschnitt des EFV-Genoms von 8239-12033 ist über HindIII in pUC19 kloniert worden, alle zu korrigierenden Positionen sind maßstabsgetreu markiert. Die Orientierung des Inserts lässt sich über XbaI-Verdau nachweisen. Ein XbaI-Verdau bei der dargestellten Orientierung ließe zwei ähnlich große Fragmente zwischen 3000 und 3500 Bp entstehen, bei umgekehrter Orientierung entstünde eine mehr als 6 kBp große Bande und eine kleine bei 500 Bp.**

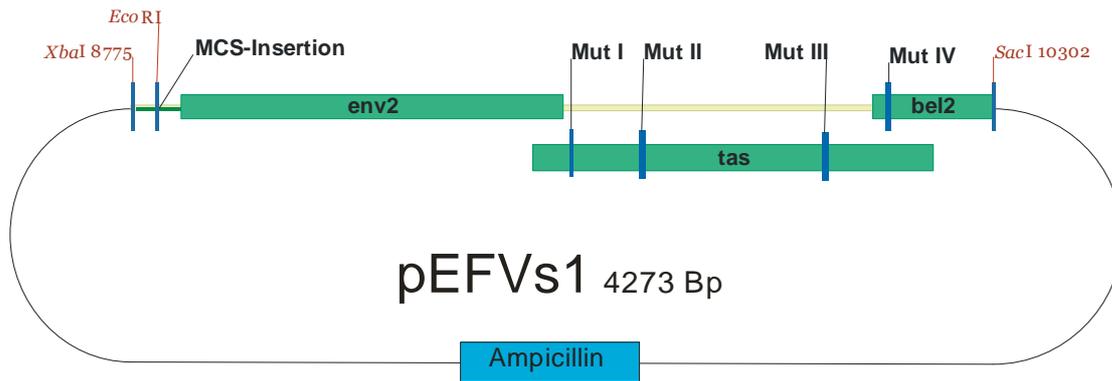
Das subklonierte Genomfragment in pEFVh1 war zusammen mit dem Vektor immer noch zu groß für eine effektive PCR-Mutagenese. Sinn und Ziel weiterer Subklonierungen war zum einen die PCR-Mutagenese der Punktmutationen an kleineren Plasmiden vornehmen zu können, zum anderen die Möglichkeit zur Beseitigung der MCS-Insertion zu schaffen.

Zunächst wurde aus pEFVh1 über einen Verdau mit XbaI und SacI ein Fragment der Größe 1527Bp, das EFV-Genom von Position 8775-10302, gewonnen und erneut in pUC19 ligiert (vgl. Abb. 3.7.). Der Vektor war zuvor mit XbaI und SacI aufgeschnitten worden.



**Abbildung 3.7.:** Schematische Darstellung der Subklonierung des Genomabschnittes 8775-10302. Als Schnittstellen dienten XbaI und SacI im EFV-Genom. Das in pUC19 subklonierte Genomfragment enthält die MCS-Insertion und Mut I-IV.

Die nach Transformation gewonnenen Klone wurden in einem Restriktionsverdau mit XbaI orientierend auf ihre Vollständigkeit geprüft. Einer der hergestellten Klone wurde als pEFVs1 bezeichnet (Plasmidkarte in Abb. 3.8.) für die Mutagenese der Punktmutationen als Matritze weiterverwendet. Das in pEFVs1 subklonierte EFV-Genomfragment enthielt am 5'-Ende die beschriebene MCS-Insertion, außerdem vier der fünf zu korrigierenden Abweichungen.



**Abbildung 3.8.: Plasmidkarte von pEFVs1.** Das subklonierte EFV-Genomfragment von 8775-10302 beinhaltet die MCS-Insertion und vier Stopmutationen, welche maßstabsgetreu dargestellt sind. Als Vektor dient pUC19.

Der weiter nach 3' gelegene Abschnitt der in pEFVh1 subklonierten EFV-Sequenz (von 10302 bis 12033) wurde per PCR amplifiziert (siehe Abb. 3.9.) und mit dem PCR Cloning Kit von Qiagen in den pDrive Cloning Vektor kloniert. Der Einsatz einer Pfu-Polymerase verminderte das Risiko der Einfügung weiterer Punktmutationen in der PCR. Über die Sequenz des antisense Primers war es möglich, eine HindIII-Restriktionsschnittstelle an das 3'-Ende der amplifizierten Sequenz anzufügen, die im späteren Verlauf für die Rückführung der subklonierten EFV-Genomfragmente in die Ausgangsplasmide pEFV benötigt wurde. Über den Primer wurden außerdem zwischen 3'-Ende von EFV und HindIII-Schnittstelle Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SwaI und SacII eingefügt. Beide Enzyme schneiden weder in EFV noch in pCR-XL-TOPO, so dass im finalen Konstrukt Einzelschnittstellen ans 3'-Ende der EFV-Sequenz angeschlossen stehen sollten.

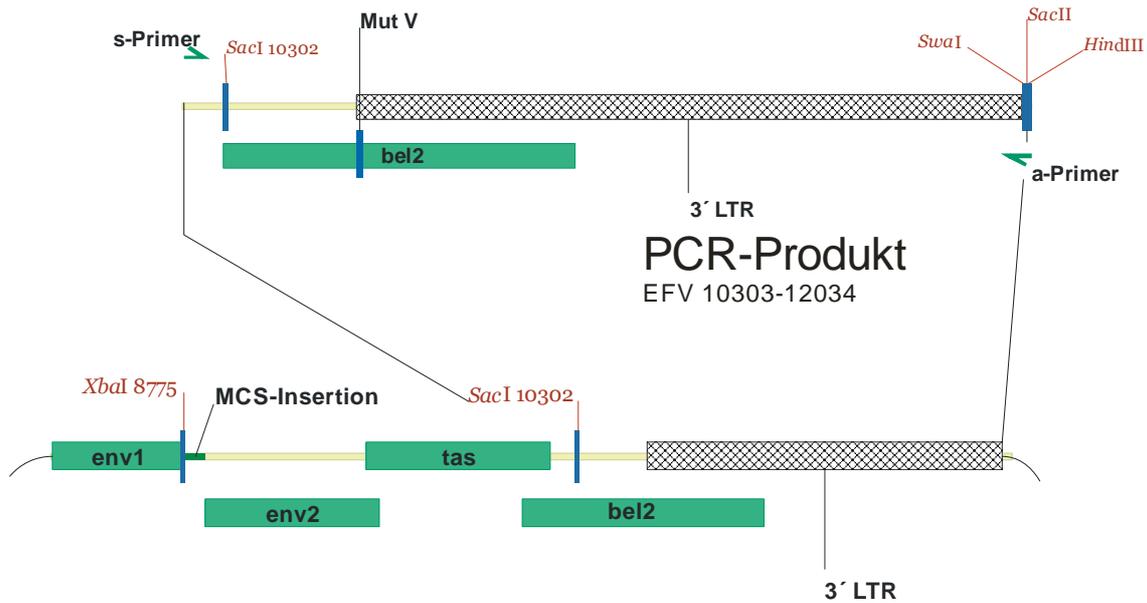
Primer:

10219(s):

5'-TTGTGGACCTGCTTCATGCTATACTATTGTGTGGG-3'

hindnon(a):

5'-AT[AAGCTT][CCGCGG][ATTTAAAT]ATTGTCGCGGTATCTCCTTAAAATAGGG-3'



## Ausgangsplasmid pEFVh1

Abbildung 3.9.: Schematische Darstellung von Matrize (unten) und PCR-Produkt zur Herstellung von pEFVb2. Die Primersequenzen sind dargestellt, die im antisense Primer vorliegenden Schnittstellen sind darin durch eckige Klammern markiert, die übrige Primersequenz überlappt mit dem 3'-Ende der EFV-Sequenz. Das PCR-Produkt wurde über eine TA-Klonierung in den pDrive Cloning Vector kloniert.

Die gewonnenen Klone wurden orientierend durch Restriktionsverdau auf Vollständigkeit geprüft. Außerdem wurden die Klonierungsstellen sequenziert, um Vorhandensein und Abfolge der hinzugefügten Restriktionsschnittstellen zu überprüfen. Ein Klon wurde für die Mutagenese weiterverwendet und als pEFVb2 bezeichnet (Plasmidkarte in Abb. 3.10.). Die Orientierung des PCR-Produktes wurde im Rahmen der Sequenzierung ermittelt. Das In pEFVb2 subklonierte EFV-Genomfragment beinhaltet mit Mut V eine zu korrigierende Abweichung.

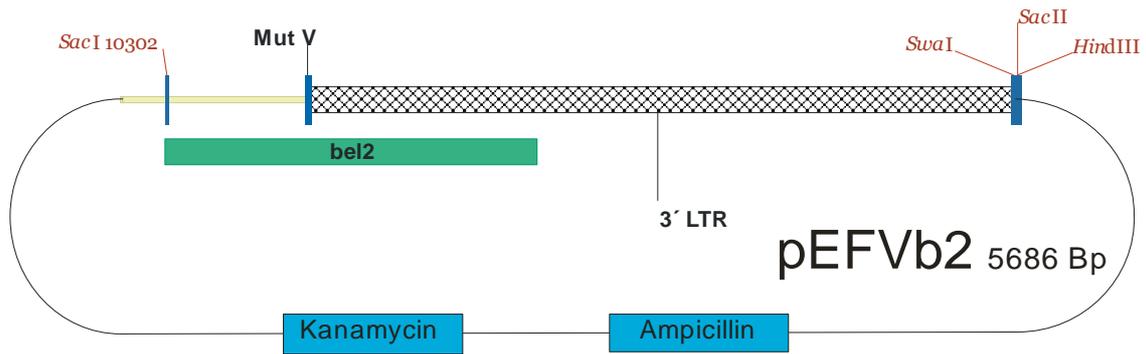


Abbildung 3.10.: Plasmidkarte von pEFVb2; Das in den pDrive Cloning Vector subklonierte EFV-Genomfragment von 10302-12033 beinhaltet Mutation V. Die durch die PCR-Reaktion am 3' Ende hinzugefügten Restriktionsschnittstellen sind verzeichnet.

### 3.2.2. PCR-Mutagenese von Stopp-Mutationen, Eliminierung der Insertion

Von den zu korrigierenden Mutationen lagen die ersten vier im subklonierten Abschnitt von 8775-10302 des EFV-Genoms. Außerdem beinhaltete das Plasmid pEFVs1 die MCS-Insertion von 85 Basenpaaren. Die Korrektur erfolgte in jedem Fall durch Mutations-PCR.

Das Ausgangsplasmid pEFVs1 wurde als Template für eine erste PCR-Mutagenese verwendet. Die eingesetzten, auf der Grundlage der publizierten Sequenz hergestellten Primer (mut2s, mut2a) beinhalteten als Zielsequenz ein Tryptophancodon statt des Stoppcodons an der Stelle von Mutation II.

Nukleotidsequenz (9714-9746)

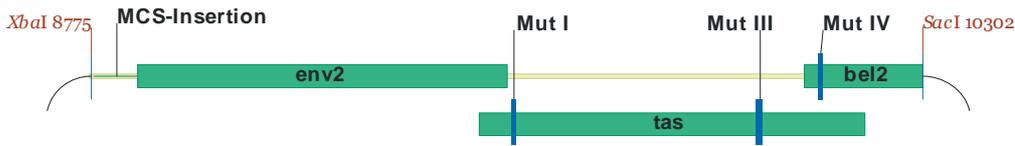
vor M.: ATAGACTGTAATAGGT**G**ACTATAATCATAAT

nach M.: ATAGACTGTAATAGGT**G**GACTATAATCATAAT

AS-Sequenz (Tas 91-102)

Vor M.: I D C N R \* H Y N H N

Nach M.; I D C N R **W** H Y N H N



## pEFVm1 4273 Bp

Abbildung 3.11.: PCR-Mutagenese von Mut II. Der Einsatz von Mutagenese-Primern mit Tryptophancodon (kursiv) korrigiert die Stopp-Mutation. Veränderte Aminosäuren sind fett markiert.

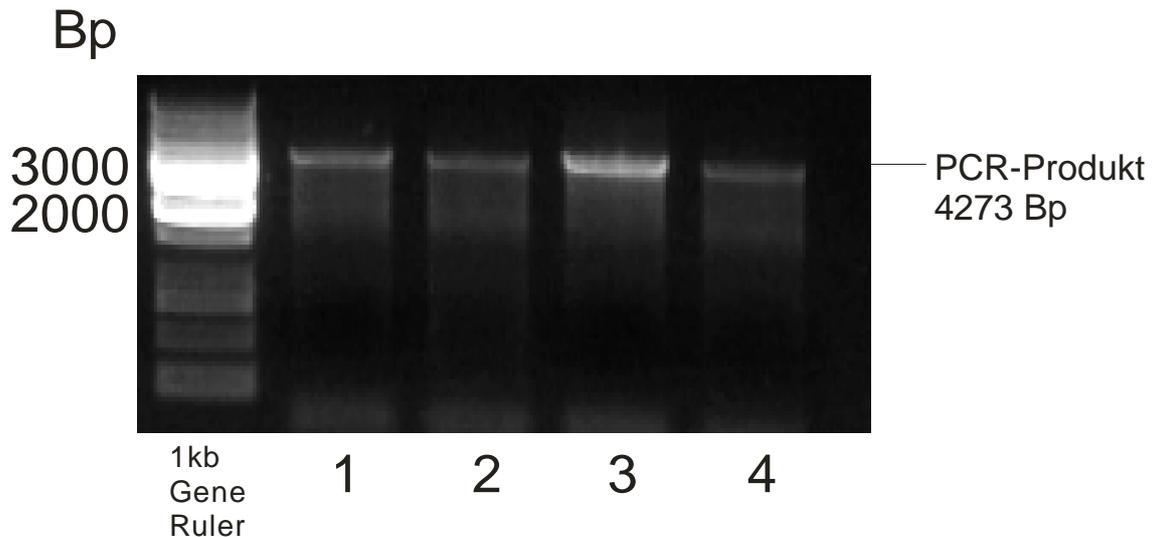


Abbildung 3.12.: Auftrag von PCR-Produkten aus Mutagenese-PCR, deutlich erkennbar ist in allen Ansätzen (1-4) ein PCR-Produkt in Größe des template-Plasmids (ca. 4,2kbp)

Eine Probe des PCR-Produktes wurde in einer Gelelektrophorese untersucht, dort war das PCR-Produkt als Einzelbande bei 4,3 kbp nachzuweisen (vgl. Abb. 3.12.). Nach der PCR wurde das Reaktionsgemisch mit DpnI verdaut, um die template-DNA abzubauen, und kompetente Zellen wurden mit dem PCR-Produkt transformiert. Die Integrität der hergestellten Klone wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdau überprüft (Abb. 3.13.), der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung sichergestellt.

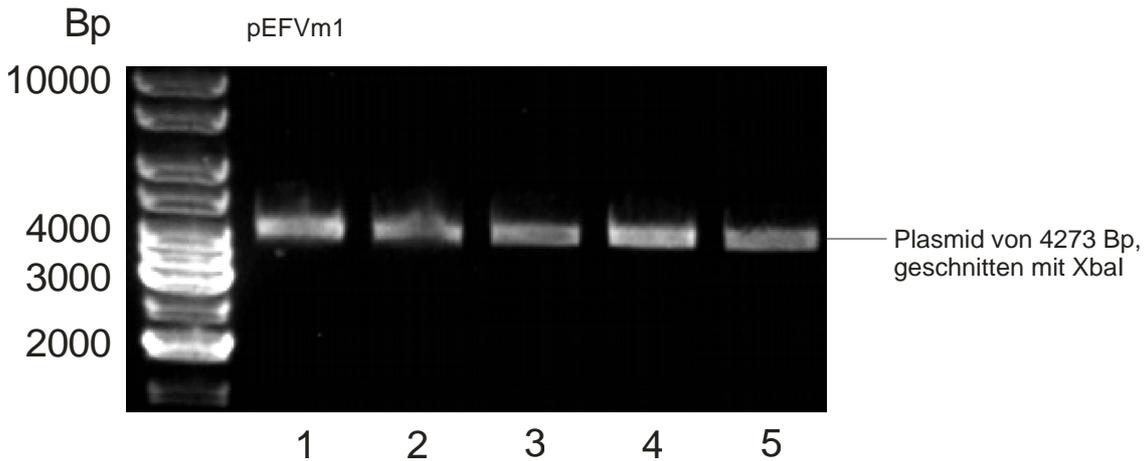


Abbildung 3.13.: Diagnostischer Verdau von Plasmid-DNA mit XbaI; 1: pEFVm1, 2-5: andere erzeugte Klone. Das Plasmid hat die erwartete Größe nach Mutagenese.

Einer der Klone mit korrigierter Mutation II wurde als pEFVm1 bezeichnet und weiterverwendet (Auszug aus Plasmidkarte in Abb. 3.11.)

Das Plasmid pEFVm1 diente als template für die zweite PCR-Mutagenese, die zur Korrektur von Mutation I diente. Die eingesetzten Oligonukleotide (mut1s, mut1a) enthielten das Tryptophancodon aus der publizierten Sequenz.

Nukleotidsequenz (9495-9527)

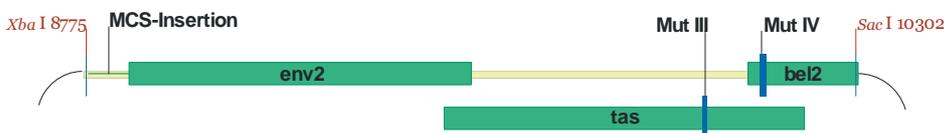
Vor M.: ACCAAAAAAGAACTCT**AAAAAGTAAACTT**TATCC

Nach M.: ACCAAAAAAGAACTCT**GGGAAGTGGACTT**TATCC

AS-Sequenz (Tas 19-29)

vor M.: T K K E L \* K V N L S

nach M.: T K K E L **W** E V **D** L S



pEFVt4 4273 Bp

Abbildung 3.14.: PCR-Mutagenese von Mut I. Die betroffenen Kodons und veränderte Aminosäuren sind fett markiert.

Die hergestellten Klone wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Neben der Stoppmutation waren auch noch zwei weitere abwärts

gelegene Aminosäuren (vgl. Abb. 3.14) im Sinne der EFV.fr-Sequenz verändert worden. Ein erfolgreich mutagenisierter Klon wurde als pEFVt4 bezeichnet und weiterverwendet (Auszug aus Plasmidkarte in Abb. 3.14.)

In einer dritten PCR-Mutagenese wurde das Plasmid pEFVt4 als template eingesetzt, mit den eingesetzten Primern (mut3s, mut3a) sollte die Mutation III korrigiert werden (vgl. Abb. 3.15.).

Nukleotidsequenz (9972-10004)

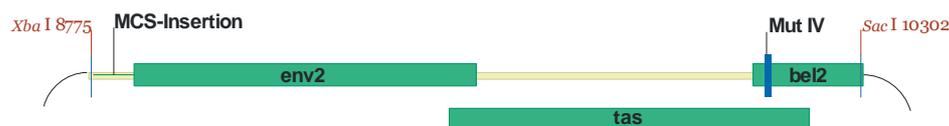
vor M.: **CAACCTATTCCCAATTAACAGCCGGAGCCCCCA**

nach M.: **CAGCCTATTCCCAATCAACAGCCGGAGCCCCCA**

AS-Sequenz (Tas 178-188)

vor M.: **Q P I P N \* Q P E P N**

nach M.: **Q P I P N Q Q P E P N**



## pEFVu1 4273 Bp

**Abbildung 3.15.: PCR-Mutagenese von Mut III. Die veränderten Kodons und die betroffenen AS sind fett markiert.**

Die gewonnenen Klone wurden mit Hilfe von Restriktions- und Sequenzanalysen überprüft. In der mutagenisierten Sequenz war statt des Stoppcodons ein Glutaminocodon zu finden, außerdem war eine aufwärts gelegene Aminosäure von Bet (Bet 81N>S) im Sinne der EFV.fr-Sequenz verändert. Ein Klon mit korrigierter Mutation, bezeichnet pEFVu1 (Ausschnitt aus Plasmidkarte in Abb. 3.15) wurde für den letzten Mutageneseschritt in diesem Genomabschnitt eingesetzt.

Das Plasmid pEFVu1 war der Ausgangspunkt einer PCR-Mutagenese mit dem Ziel, Mutation IV durch passende Primer (mut4s, mut4a) dahingehend zu

verändern, dass wieder ein Tryptophan- anstelle des Stoppcodons stünde (vgl. Abb. 3.16.)

Nukleotidsequenz (10091-10123)

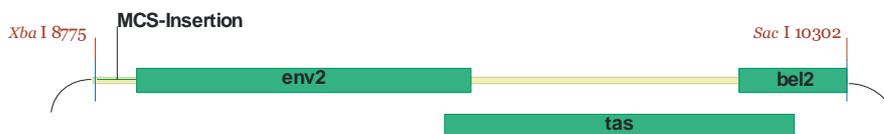
vor M.: CTGGGTTGCCTAACAT**AG**ACTGGACAGTTGAAT

nach M.: CTGGGTTGCCTAACAT**GG**ACTGGACAGTTGAAT

AS-Sequenz (Bet 120-130)

vor M.: L G C L T \* T G Q L N

nach M.: L G C L T **W** T G Q L N



## pEFVw1 4273 Bp

**Abbildung 3.16.: PCR-Mutagenese von Mut IV. Das korrigierte Kodon und die damit veränderte AS sind fett hervorgehoben. Im Plasmid pEFVw1 sind alle Punktmutationen korrigiert, die MCS-Insertion jedoch noch vorhanden.**

Die angefallenen Klone wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Die mutagenisierten Plasmide enthielten das Tryptophancodon anstelle des Stopps. Einer der Klone, aus dem alle kritischen Stoppcodons eliminiert waren, wurde als pEFVw1 (Plasmidkartenauszug in Abb. 3.16.) bezeichnet und weiterverwendet.

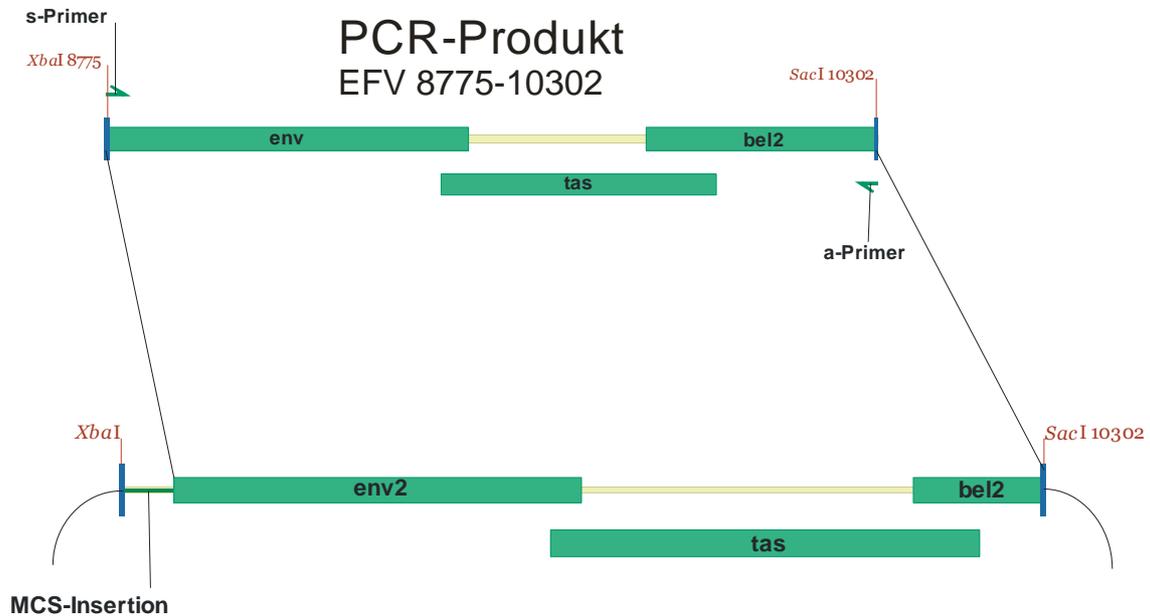
Um den letzten Korrekturschritt in diesem subklonierten Genomabschnitt, die Ausschaltung der eingefügten 85-Bp-Insertion, zu vollziehen, wurde der Genomabschnitt per PCR aus pEFVw1 amplifiziert. Der sense-Primer wurde dabei so gewählt, dass er mit seiner Sequenz an die jenseits der pCR-XL-TOPO-MCS befindliche EFV-Sequenz binden konnte, beinhaltete davor geschaltet aber eine XbaI-Site (vgl. Primersequenzen und Schema in Abb. 3.17.). Die Insertion wurde auf diese Weise überbrückt, so dass im PCR-Produkt die EFV-Sequenz von der XbaI-Schnittstelle bei 8775 bis zur SacI-Schnittstelle bei 10302 vorlag.

pEFVw1: 5´-...TCTAGA(pCR-XL-TOPO-MCS)ACTCAAGGGATGTCAA...-3´

Primer:

xbarepair(s): 5´-**TCTAGA**ACTCAAGGGATGTCAAGAATTGGATTATC-3´

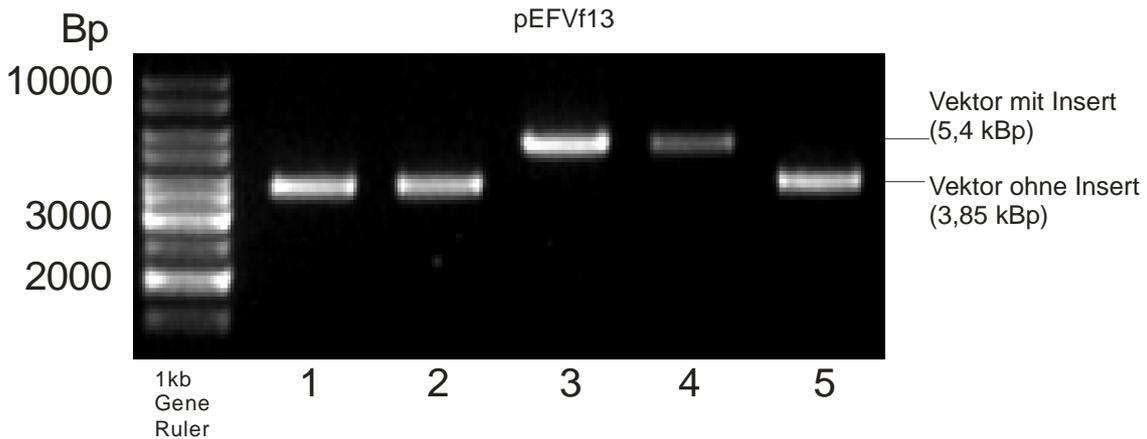
sac1(a): 5´-AAGAGCTCTGAAAAGATAAGGAGTTCCTGTTGC-3´



## Ausgangsplasmid pEFVw1

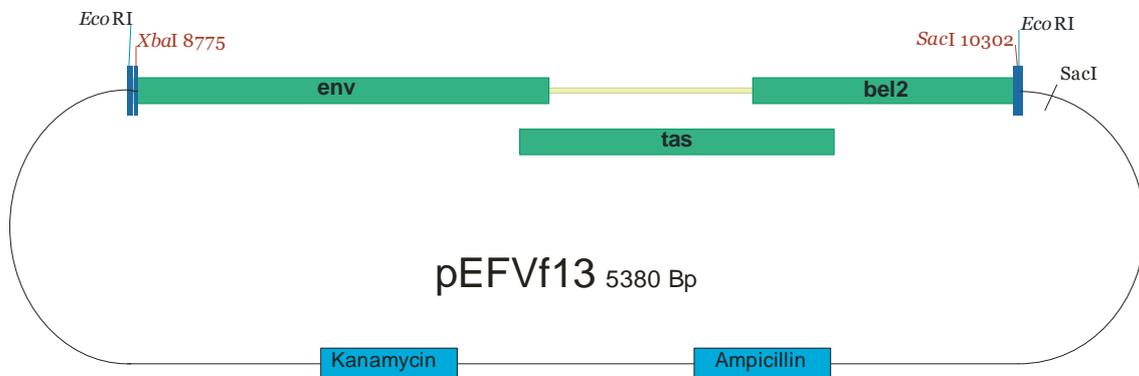
Abbildung 3.17.: Reparatur-PCR zur Elimination der MCS-Insertion. Der s-Primer beinhaltet eine XbaI-Schnittstelle (fett markiert), die entsprechend der publizierten Sequenz an die EFV-Sequenz nach der Insertion anschließt. Der Primer lagert sich an die template-Sequenz über die kursiv markierten Basen an, die MCS-Insertion wird auf diese Weise umgangen und findet sich im PCR-Produkt nicht mehr.

Das PCR-Produkt wurde in den pDrive Cloning Vector kloniert, die hergestellten Plasmide wurden per Restriktionsverdau überprüft. Die Bestimmung der Orientierung war über einen Verdau mit SacI möglich. Wenn die SacI-Schnittstelle im Insert an die Seite der MCS des Vektors anschloss, die eine SacI-Schnittstelle enthält, war ein Restriktionsmuster mit einem erkennbaren Fragment zu erwarten, bei einer umgekehrten Ausrichtung des Inserts wären zwei kleinere Fragmente abzugrenzen (Abb. 3.18.)



**Abbildung 3.18: Diagnostischer Verdau von Plasmid-DNA mit *SacI*; 3: pEFVf13, 1,2,4,5: sonstige gewonnene Klone. In den Spalten 1, 2 und 5 Klone ohne Insert, in den Spalten 3 und 4 Klone mit Insert. Das Restriktionsmuster der Klone mit Insert beweist Orientierung des Inserts. Im Falle einer umgekehrten Orientierung wären zwei Banden erkennbar gewesen (Vektor 3,85 kBp; Insert 1,5 kBp).**

Ein ausgewählter Klon mit definierter Orientierung wurde als pEFVf13 (Plasmidkarte in Abb. 3.19.) bezeichnet, das komplette Insert wurde sequenziert. Durch die PCR war es gelungen, die vollständige EFV-Sequenz von 8775-10302 als Insert im Vektor zu haben.



**Abbildung 3.19.: Plasmidkarte von pEFVf13; das Korrekturprogramm im subklonierten Genomabschnitt ist abgeschlossen. Das Plasmid enthält den vollständigen EFV-Genomabschnitt von 8775-10302 im pDrive Cloning Vector, alle Leseraster sind offen. Die Orientierung ist über eine *SacI*-Verdau nachweisbar. Bei der dargestellten Orientierung wäre im *SacI*-Verdau nur ein großes Fragment zu erkennen, bei umgekehrter Ausrichtung zwei kleinere in Größe des Vektors und des Inserts.**

Die eingefügten 85 Basen der MCS-Insertion waren eliminiert, alle Stopp-Mutationen in diesem Genomabschnitt korrigiert, die Leseraster von Tas und Bet offen. Das Plasmid pEFVf13 wurde für die Rückführung in das Gesamtgenom bereitgestellt.

Im Genomabschnitt 10302-12033, subkloniert vorliegend auf dem Plasmid pEFVb2, war lediglich Mutation V zu korrigieren.

Das Plasmid wurde als template in einer PCR-Mutagenese verwendet, die Primer waren so gewählt, dass mit ihnen das Stoppcodon an Mutation V in das Tryptophancodon der publizierten EFV.fr-Sequenz verwandelt wurde (vgl. Abb. 3.20.). Außerdem wurde durch die Mutagenese die Adeninbase an Position 10614 durch eine Guaninbase ersetzt.

Nukleotidsequenz (10576-10608)

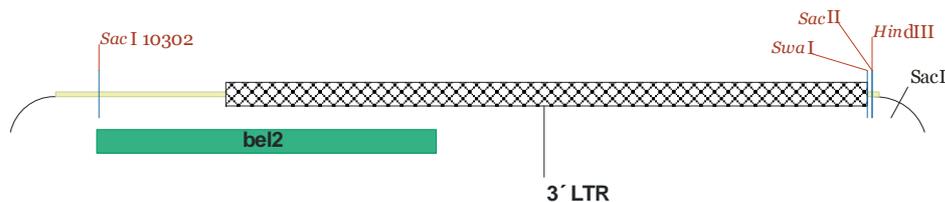
vor M.: AAGGAGAGGGTGTGCAT**G**AAATGAGGATCCAGAG

nach M.: AAGGAGAGGGTGTGCAT**G**GAATGAGGATCCAGAG

AS-Sequenz (Bet 282-292)

vor M.: K E R V S \* N E D P E

nach M.: K E R V S **W** N E D P E

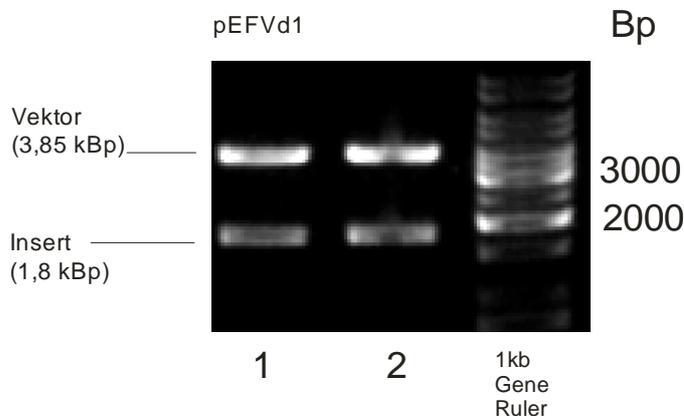


pEFVd1 5686 Bp

**Abbildung 3.20.: PCR-Mutagenese von Mut V. Das veränderte Kodon und die resultierend veränderte Aminosäure sind fett markiert. Im Plasmid pEFVd1 liegt der vollständige EFV-Genomabschnitt 10302-12033 vor, das Bel2-Leseraster ist offen. Ein Verdau mit SacI ermöglicht den Rückschluss auf die Orientierung des Plasmides.**

Die hergestellten Klone wurden mit Hilfe von Restriktionsverdau (Abb. 3.21) und Sequenzierung auf Integrität, Orientierung und Erfolg der Mutagenese untersucht. Die Orientierung des subklonierten Fragmentes im Vektor konnte obwohl schon aus Sequenzierung des template-Klones pEFVb2 bekannt durch eine SacI-Verdau bestätigt werden. Wenn die SacI-Schnittstelle am 5'-Ende des Inserts gelegen an die MCS des Vektors ohne SacI-Schnittstelle grenzt, wären zwei Banden etwa von der Größe von Insert und Vektor nach Restriktionsverdau zu erwarten. Dieser Befund zeigte sich im Restriktionsverdau (vgl. Abb 3.21.) und bestätigt die Orientierung des

Genomfragmentes im Plasmid pEFVd1 (Ausschnitt aus Plasmidkarte in Abb. 3.20.).



**Abbildung 3.21.:** Diagnostischer Verdau von Plasmid-DNA mit *SacI*; 1: pEFVd1, 2: anderer korrekter Klon. Vektor (3,85 kBp) und Insert (1,8 kBp) liegen als erkennbare Banden vor. Das Restriktionsmuster erlaubt klaren Rückschluss auf Orientierung des Inserts, im Falle einer umgekehrten Orientierung wäre nur eine Bande bei 5,6 kBp erkennbar gewesen.

Ein erfolgreich mutagenisierter Klon wurde als pEFVd1 bezeichnet und das Insert vollständig sequenziert, um mögliche neue durch PCR eingefügte Fehler zu erkennen. Der subklonierte Abschnitt des EFV-Genoms von 10302-12033 war vollständig, das Bet-Leseraster offen, die PCR-Reaktion hatte keine weiteren kritischen Mutationen hervorgerufen. Der Klon pEFVd1 wurde für die Rückführung in das Gesamtgenom bereitgestellt.

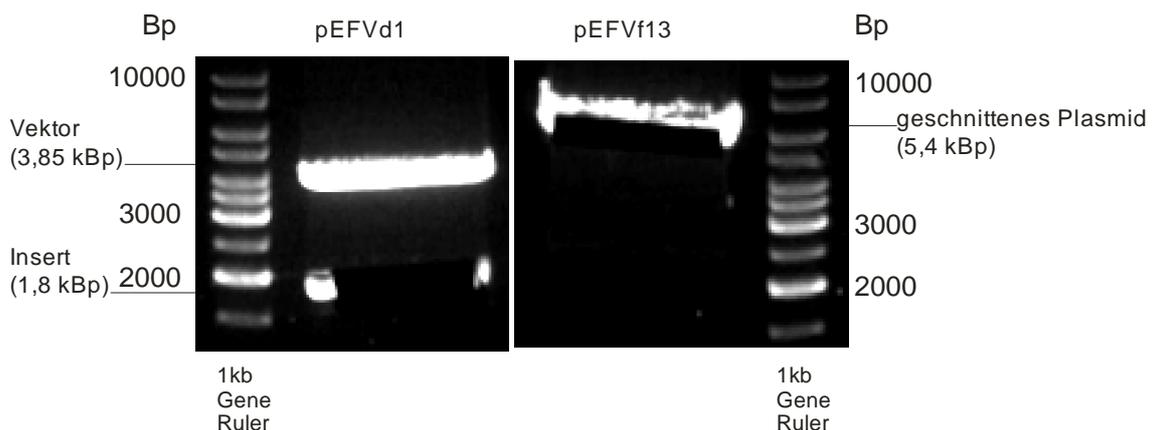
### 3.2.3. Zusammenfügen von korrigierten EFV-Fragmenten

Um zu einem vollständigen infektiösen EFV-Klon zu gelangen, galt es, die korrigierten Segmente wieder in das klonierte Kompletengenom einzuführen, damit dieses dann anstelle seines abwärts gelegenen Teils mit MCS-Insertion und Stoppcodons diesen Teil des Genoms ohne expressionskritische Positionen enthält.

Ein möglicher Weg dazu bestand darin, die subklonierten Genomfragmente (EFV 8775-10302 in pEFVf13 und EFV 10302-12033 in pEFVd1) zunächst aneinanderzufügen und gemeinsam in die erste Subklonierungsstufe (pEFVh1) einzuführen. Aus dem neu entstandenen Plasmid sollte der korrigierte

Genomabschnitt EFV 8239-12033 wieder in die Ausgangsklone pEFV4, pEFV8 und pEFV13 kloniert werden.

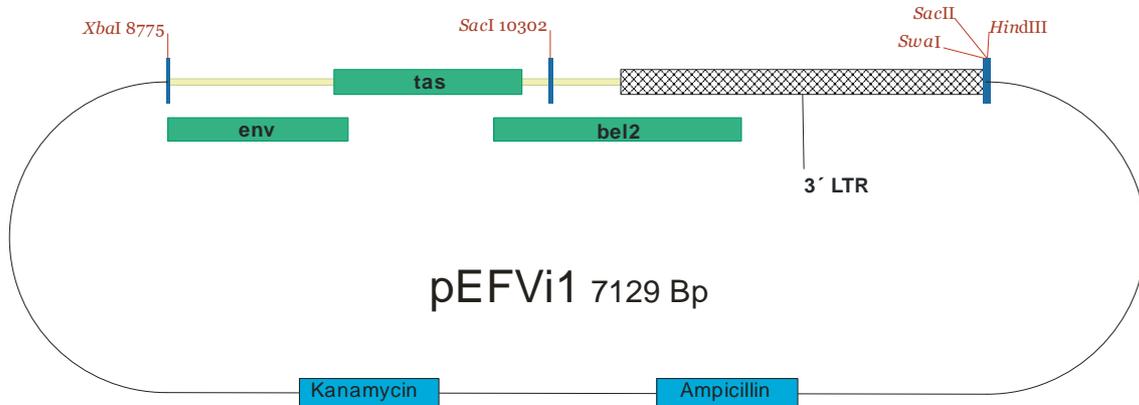
Um die Genomfragmente aneinanderzufügen, sollte zunächst der Abschnitt EFV 10302-12033 aus pEFVd1 in pEFVf13 kloniert werden. Der Anschluss an das Fragment EFV 8775-10302 erfolgte dabei über die *SacI*-Schnittstelle an Position 10302 im EFV-Genom. Aus dem Plasmid pEFVd1 wurde durch Verdau mit *XhoI*, Auffüllen der Schnittstelle mit Klenow Fragment und einen weiteren Verdau mit *SacI* ein Fragment von ca. 1700Bp gewonnen (Abb. 3.22. links). Um die Einfügung dieses Fragmentes zu ermöglichen, wurde pEFVf13 mit *NotI* verdaut, anschließend ebenfalls aufgefüllt und mit *SacI* verdaut. In der Gelelektrophorese wurde das so geschnittene Plasmid mit einer Größe von ca. 5400Bp isoliert (Abb. 3.22. rechts)



**Abbildung 3.22.: Präparativer Verdau von Plasmid-DNA; links pEFVd1 nach Verdau mit *XhoI* und *SacI*, Isolation des Fragments bei 1700Bp; rechts pEFVf13 nach Verdau mit *NotI* und *SacI*, Isolation aus Bande bei 5400Bp. Das Fragment aus pEFVd1 wurde in das Fragment aus pEFVf13 ligiert.**

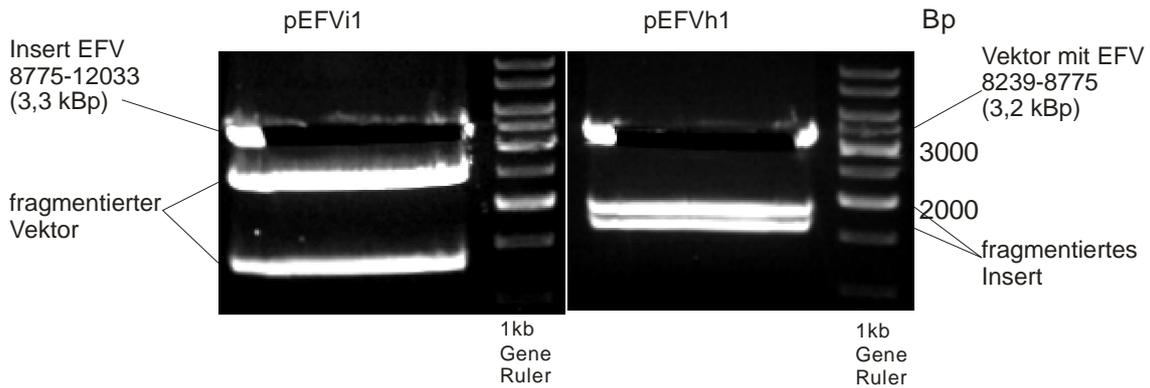
Ausgeschnittenes Fragment aus pEFVd1 und aufgeschnittenes Plasmid pEFVf13 wurden ligiert. Die gewonnenen Klone wurden durch Restriktionsverdau analysiert, zwei Klone mit passendem Restriktionsmuster wurden mit den Primern m13 und m13rev sequenziert, um die korrekte Einfügung des Fragmentes in Fragment mit Vektor zu überprüfen, eine Sequenzierung mit dem Primer EFV10000s sollte die korrekte Aneinanderfügung beider Genomfragmente an Position EFV10302 sicherstellen. Ein Klon, der sich in Verdau und Sequenzierung als korrekt

erwiesen hatte, wurde pEFVi1 (Plasmidkarte in Abb. 3.23.) benannt und weiterverwendet.



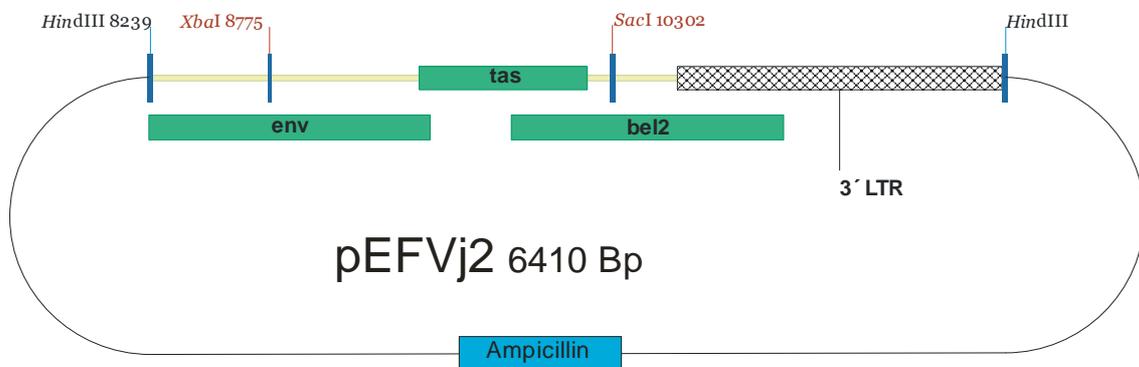
**Abbildung 3.23.: Plasmidkarte von pEFVi1; die beiden subklonierten Genome sind über *Sac*I an Position 10302 zusammengeführt worden.**

Der in pEFVi1 subkloniert vorliegende Abschnitt EFV 8775-12033 mit den vorgenommenen Korrekturen, sollte in den Subklon pEFVh1 eingefügt werden und den in diesem vorliegenden, nicht korrigierten entsprechenden Abschnitt ersetzen. Die Aneinanderfügung des korrigierten Abschnittes an das in pEFVh1 verbleibende EFV-Genom von 8239-8775 sollte über die *Xba*I-Schnittstellen an Position 8775 erfolgen. Dazu wurde pEFVi1 mit *Xba*I und *Eco*RI verdaut, der Vektor wurde mit *Bgl*II gezielt fragmentiert, um das Zielfragment mit einer Größe von 3300Bp sicher isolieren zu können (Abb. 3.24. links). Aus pEFVh1 wurde mit *Xba*I und *Eco*RI der Genomabschnitt EFV 8775-12033 ausgeschnitten und durch *Sac*I-Verdau nochmals zerlegt. Eine Zielbande der ungefähren Größe von 3200Bp bestehend aus Vektor und EFV 8239-8775 konnte isoliert werden (Abb. 3.24. rechts).



**Abbildung 3.24.:** Präparativer Verdau von Plasmid-DNA; links pEFVi1 nach Verdau mit XbaI, EcoRI und BglII, isoliert Fragment bei 3300Bp; rechts pEFVh1 nach Verdau mit XbaI, EcoRI und SacI, isoliert Fragment bei 3200Bp. Das Fragment aus pEFVi1 wurde über eine Ligationsreaktion in den aus pEFVh1 isolierten Vektor eingefügt.

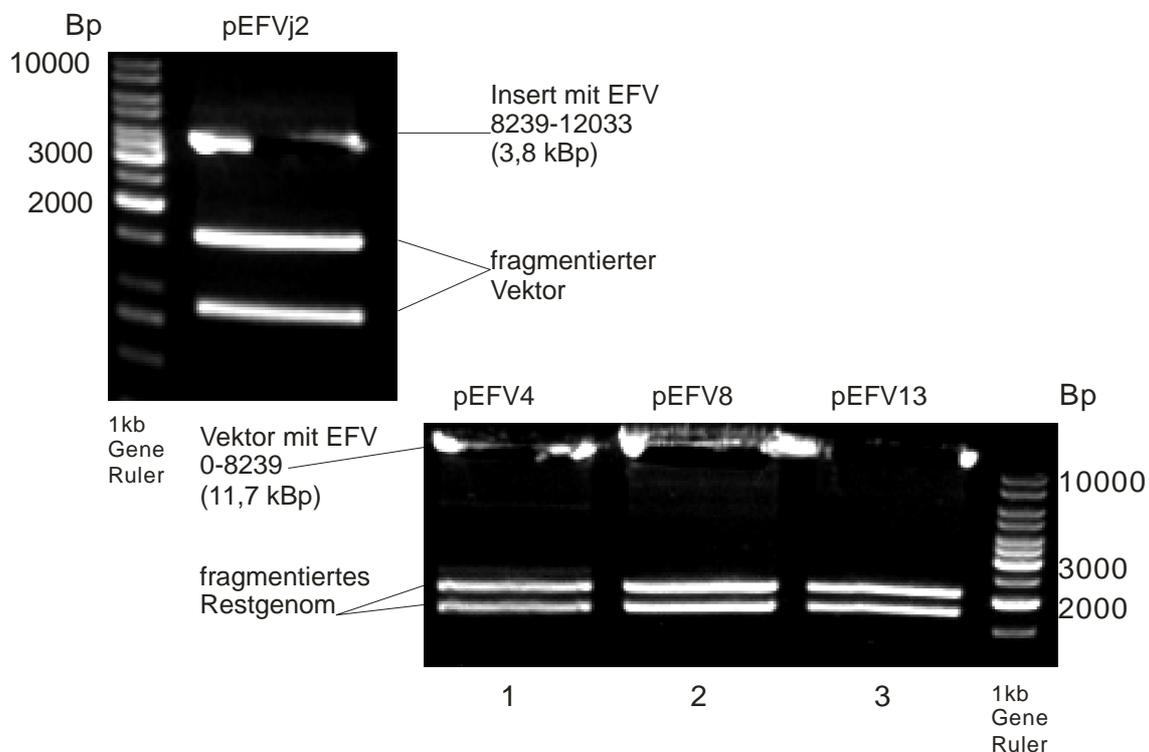
Fragment aus pEFVi1 und aufgeschnittener Vektor aus pEFVh1 wurden in einer Ligationsreaktion zusammengefügt. Die hergestellten Klone konnten durch Restriktionsverdau und Sequenzieren der Klonierungsstellen auf korrekte Zusammenfügung der Genomabschnitte überprüft werden. Als Ausgangspunkt für den letzten Klonierungsschritt wurde ein Klon ausgewählt und als pEFVj2 (Plasmidkarte in Abb. 3.25.) bezeichnet.



**Abbildung 3.25.:** Plasmidkarte von pEFVj2. Die mutagenisierten Genomfragmente sind wieder in die erste Subklonierungsstufe eingefügt und fertig zur Rückklonierung in die Plasmide mit Gesamtgenom.

Der im Plasmid pEFVj2 vorliegende Abschnitt des EFV-Genoms von 8239-12033 mit den vorgenommenen Korrekturen sollte in die Ausgangsklone zurückgeführt werden. Die Verknüpfung mit dem Restgenom erfolgte über die HindIII-Schnittstelle an Position 8239. Aus EFVj2 wurde mit HindIII der komplette Genomabschnitt von 8239-12033 ausgeschnitten, zum Tragen kam

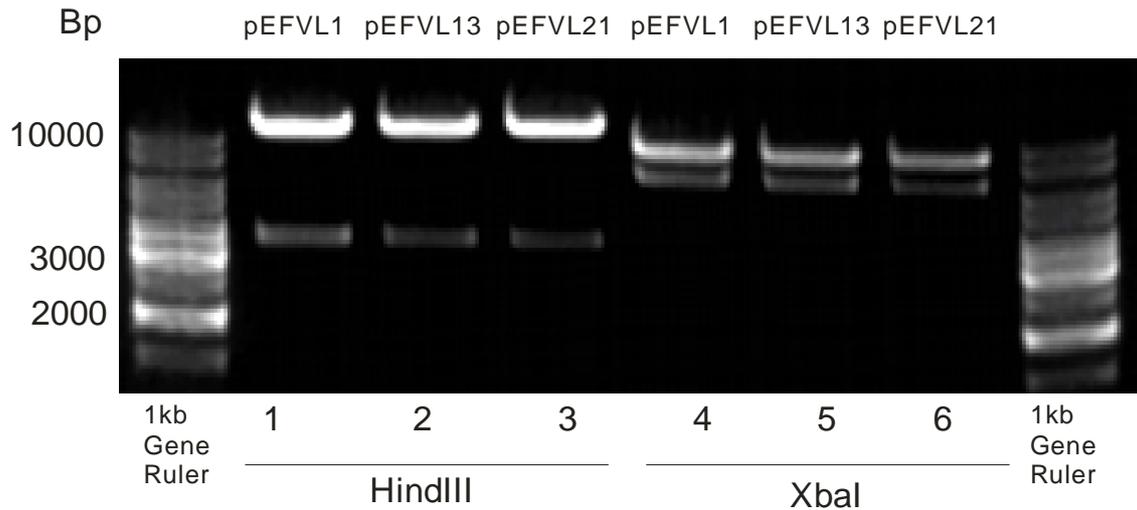
hier neben der HindIII-Site an Position 8239 die im Zuge der Subklonierung (siehe Abb. 3.9.) die hinter das 3'-Ende des Genom geschaltete HindIII-Site. Um eine sichere Isolierung des etwa 3800Bp großen Fragmentes zu ermöglichen, wurde das Plasmid auch mit PvuI verdaut, das den Vektor in zwei Teile schnitt (Abb. 3.26. links). Die Kompletengenome pEFV4, pEFV8 und pEFV13 wurden mit HindIII aufgeschnitten und zusätzlich mit SacI verdaut, um das herausgefallene Fragment nochmals zu verkleinern. Die DNA-Banden mit einer Größe von etwa 11700Bp beinhaltend den Vektor pCR-XL-TOPO mit EFV-Genom von Position 0-8239, konnten isoliert werden (Abb. 3.26 rechts).



**Abbildung 3.26.: Präparativer Verdau von Plasmid-DNA; links pEFVj2 nach Verdau mit HindIII und PvuI, Isolierung des Fragments bei 3800Bp; rechts: 1: pEFV4, 2:pEFV8, 3: pEFV13, jeweils nach Verdau mit HindIII und SacI, Fragmente der Größe 11700Bp wurden isoliert. Fragment isoliert aus pEFVj2 wurde jeweils in ein pEFV-Fragment ligiert.**

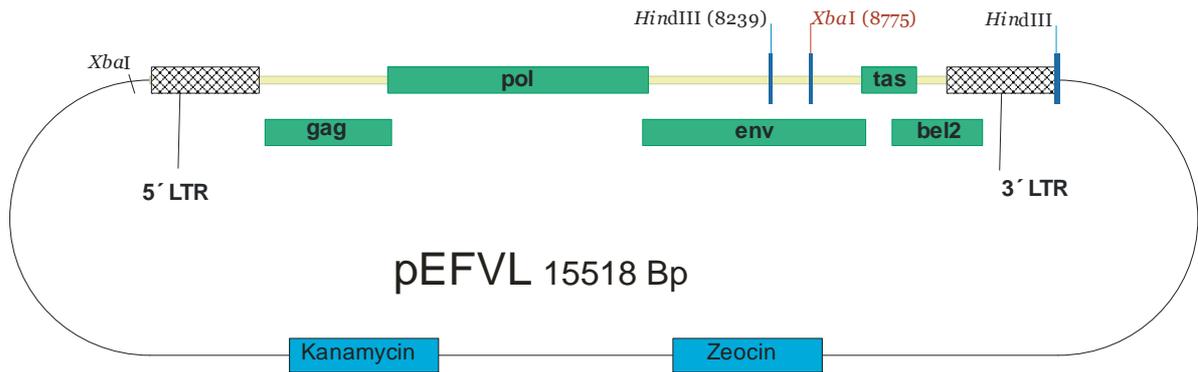
Die aufgeschnittenen Plasmide wurden mit SAP dephosphoryliert. Das Fragment aus pEFVj2 wurde mit Hilfe einer Ligationsreaktion jeweils in die aufgeschnittenen Plasmide pEFV4, pEFV8 und pEFV13 kloniert. Die hergestellten Klone wurden durch diagnostischen Verdau mit Restriktionsenzymen auf Vollständigkeit und Orientierung des über HindIII

klonierten Inserts geprüft. Das Vorhandensein des eingebrachten Fragmentes ließ sich über einen Verdau mit HindIII, nachweisen, die Orientierung des Fragmentes mit XbaI (vgl. Abb. 3.27 und Plasmidkarte in Abb. 3.28). Die korrekte Orientierung des eingebrachten Fragmentes war entscheidend, um einen durchgehenden Verlauf des Genoms zu gewährleisten.



**Abbildung 3.27.: Diagnostischer Verdau von Plasmid-DNA mit HindIII (1-3) und XbaI (4-6). Das in der jeweiligen Spur aufgetragene Plasmid ist über der Spur eingetragen. Der HindIII-Verdau in den Spuren 1-3 beweist die erfolgreiche Ligation des Inserts von 3,8 kBp in das Kompletengenom mit Vektor (11,7 kBp). Der Verdau mit XbaI veranschaulicht die intendierte Orientierung des Inserts. Im Falle einer umgekehrten Orientierung wären zwei Banden anderer Größe erkennbar gewesen (Vektor und 500Bp EFV als Bande von 4 kBp; EFV-DNA als Bande von 11,5 kBp).**

Aus den für korrekt befundenen Klonen wurde jeweils für ein Basisplasmid ein Klon ausgewählt, der Klon auf der Basis von pEFV4 wurde als pEFVL1, der Klon auf der Basis von pEFV8 als pEFVL13 und der Klon auf der Basis von pEFVL13 als pEFVL21 bezeichnet (Plasmidkarte gültig für alle pEFVL-Plasmide in Abb. 3.28.).



**Abbildung 3.28.:** Plasmidkarte gültig für pEFVL1, pEFVL13 und pEFVL21. Das Plasmid beinhaltet die vollständige Sequenz des EFV-Genoms, alle Leseraster sind offen. Ein XbaI-Restriktionsverdau beweist die intendierte Orientierung.

Die damit vorliegenden Klone beinhalteten das vollständige EFV-Genom und waren von Störsequenzen und Stopp-Mutationen befreit. Dies wurde durch erneute Sequenzierung des gesamten klonierten Genoms belegt. Mit Hilfe dieser Plasmide wurde versucht, EFV zu exprimieren.

### 3.3. Expression von infektiösem Virus in Zellkultur

Da in der Sequenz der EFVL-Plasmide keine zwingenden Hindernisse für die Expression aller viralen Proteine zu erkennen waren, wurde versucht, infektiöses Virus in einer Zellkultur anzuzüchten.

#### 3.3.1. Transfektion von 293T-Zellen, Gewinnung von Virusüberstand

Die hergestellten und analysierten Plasmide wurden jeweils mit dem FuGene Transfektionsreagenz in eine 293T-Zellkultur transfiziert. Als Positivkontrolle wurde pCHSRV, ein infektiöser, von einem CMV-Promotor getriebener Klon von PFV, ebenfalls in 293T transfiziert, als Negativkontrolle einfach destilliertes Wasser. Der Erfolg der Transfektion ließ sich nach zwei Tagen durch Nachweis des cotransfizierten GFP im Fluoreszenzmikroskop nachweisen. Drei Tage nach Transfektion wurde der Überstand abgenommen und durch 0,45mm-Filter sterilfiltriert.

Der Versuch, BHK-Zellen mit den Plasmiden zu transfizieren, scheiterte mehrmals.

### **3.3.2. Infektion von BHK-Zellen mit Überständen transfizierter Zellen, Viruskultur**

Zu BHK-Zellkulturen wurden 0,5ml sterilfiltrierter Virusüberstand gegeben und die Zellkultur über Tage im Brutschrank inkubiert. Die tägliche Kontrolle auf Foamyvirus-typische zytopathogene Effekte (Synzytienbildung, Vakuolisierung) ergab ab Tag 1 nach Infektion einen erkennbaren CPE in der mit PFV infizierten Positivkontrolle, der sich über die Zeit verstärkte und spätestens am Tag drei als maximal bezeichnet werden konnte. Im Blickfeld des Mikroskops waren mehrere große Synzytien (20 und mehr Zellkerne) zu sehen, nur wenige, nicht erkennbar betroffene Zellen waren zu beobachten. In den aus der Transfektion infizierten Zellkulturen waren ab Tag 2 sporadisch größere und kleinere Synzytien zu sehen. Die zahlenmäßige Dichte der beobachteten Synzytien lag unter einem pro Gesichtsfeld, die Größe schwankte zwischen kleinen Synzytien mit 5 bis zu 10 Kernen, was keiner foamy-typischen Größe entspricht, und größeren Exemplaren mit bis zu 15 Zellkernen, die aber nicht die Größe der PFV-Kontrolle erreichten. In der Negativkontrolle waren fast nur einzelständige BHK-Zellen zu sehen, vereinzelte Zellgruppierungen mit zwei oder vier Kernen waren die Ausnahme.

Nach drei Tagen erfolgte die zellfreie Passage von Virusüberstand auf neue BHK-Kulturen. Insgesamt erfolgten bis zu sechs Passagen. Die Beobachtung der Zellkultur ergab ein ähnliches Bild wie nach erstmaliger Infektion: Ein deutlicher CPE in der Positivkontrolle, mehr oder weniger deutliche, insgesamt schwache Effekte in den EFV-Kulturen und kein CPE in der Negativkontrolle. Zwischen den einzelnen, von den verschiedenen Plasmiden hergestellten EFV-Konstrukten gab es immer wieder graduelle Unterschiede im CPE, die aber auf lange Sicht nicht auf signifikante Unterschiede zwischen den Klonen hindeuteten. Der zytopathogene Effekt verlor sich in den EFV-Kulturen nach sechs Passagen, nach zwei Passagen ohne CPE wurde die Zellkultur abgebrochen.

Weitere Anzuchtversuche nach gleichem Schema erbrachten keine anderen Ergebnisse. Der mäßige CPE der EFV-Kultur ließ sich zwar im folgenden Anzuchtversuch wieder beobachten, ging aber erneut nach mehreren zellfreien Passagen verloren. Um einem Verlorengang des Virus durch zellfreie Passagen zu begegnen, wurde die Viruskultur versuchsweise so durchgeführt, dass auf zellfreie Passagen verzichtet wurde und die Zellkultur lediglich alle drei Tage gespalten wurde. Die Erwartung höherer Titer des vorwiegend zellständigen Virus bestätigte sich nicht. In weiteren Versuchen ließ sich überhaupt kein CPE mehr beobachten.

### **3.3.3. Infektion von ED-Zellen mit Überständen transfizierter Zellen, Viruskultur**

Die Schwierigkeiten bei der Virusexpression auf BHK-Zellen veranlassten dazu, statt der vom Hamster abgeleiteten Zellen ED-Zellen vom Pferd zu verwenden. ED-Zellen wurden bereits bei den Untersuchungen im Rahmen der Erstbeschreibung des Virus verwendet (Tobaly-Tapiero 2000). Analog zu den Versuchen mit BHK-Zellen wurden ED-Zellkulturen mit Überstand von transfizierten 293T-Zellen infiziert und über Tage bei 37°C bebrütet. Auch nach tagelanger Inkubation und Spaltung der Kulturen bei zu hoher Zelldichte zeigten sich bei der täglichen mikroskopischen Inspektion der Kulturen keine zytopathogenen Effekte und damit keine Zeichen einer Virusexpression.

### **3.3.4. Infektion von BHK- und ED-Zellen mit Virusüberstand**

Um zu klären, ob EFV überhaupt in der Zellkultur zu halten ist, wurden BHK- und ED-Zellen mit einem EFV-Überstand infiziert. Dieser EFV-Überstand stammte aus der Zellkultur, aus der bei Vorarbeiten zu diesem Projekt die Genomfragmente per PCR amplifiziert worden waren, aus denen die infektiösen Klone zusammengesetzt wurden. Zellkulturen von BHK- und ED-Zellen wurden mit 1ml oder 0,1ml dieses Virusüberstandes infiziert und inkubiert, eine nicht infizierte Negativkontrolle wurde parallel inkubiert. Die Kulturen wurden beim

Erreichen einer kritischen Zelldichte im Schnitt alle drei Tage gespalten. Ein foamy-typischer zytopathogener Effekt konnte in keiner der Kulturen bei mikroskopischen Untersuchungen beschrieben werden.

### **3.3.5. Versuch der Virusexpression in immunglobulinarmen und serumfreien Zellkulturen**

Um eine eventuelle Inaktivierung von EFV durch kreuzreagierende Immunglobuline des FCS zu verhindern, wurde Medium mit einem speziellen, immunglobulinarmen Serum (Gibco IgG ultra low) zur Virusanzucht eingesetzt. Ebenso wurde auch komplett serumfreies Nährmedium (OPPTI-PRO SFM) ausprobiert.

ED-Zellen wurden mit Hilfe von Polyfect mit den Klonen pEFVL1, pEFVL13 und pEFVL21 transfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die Kulturen wurden bei 37°C bebrütet und alle 2-3 Tage bei entsprechend hoher Zelldichte gespalten. Es zeigten sich auch bei diesem Vorgehen keine foamy-typischen Veränderungen im Lichtmikroskop, weder bei immunglobulinarmen noch bei serumfreien Medium.

### **3.3.6. Versuch der Virusexpression mit größeren DNA-Mengen**

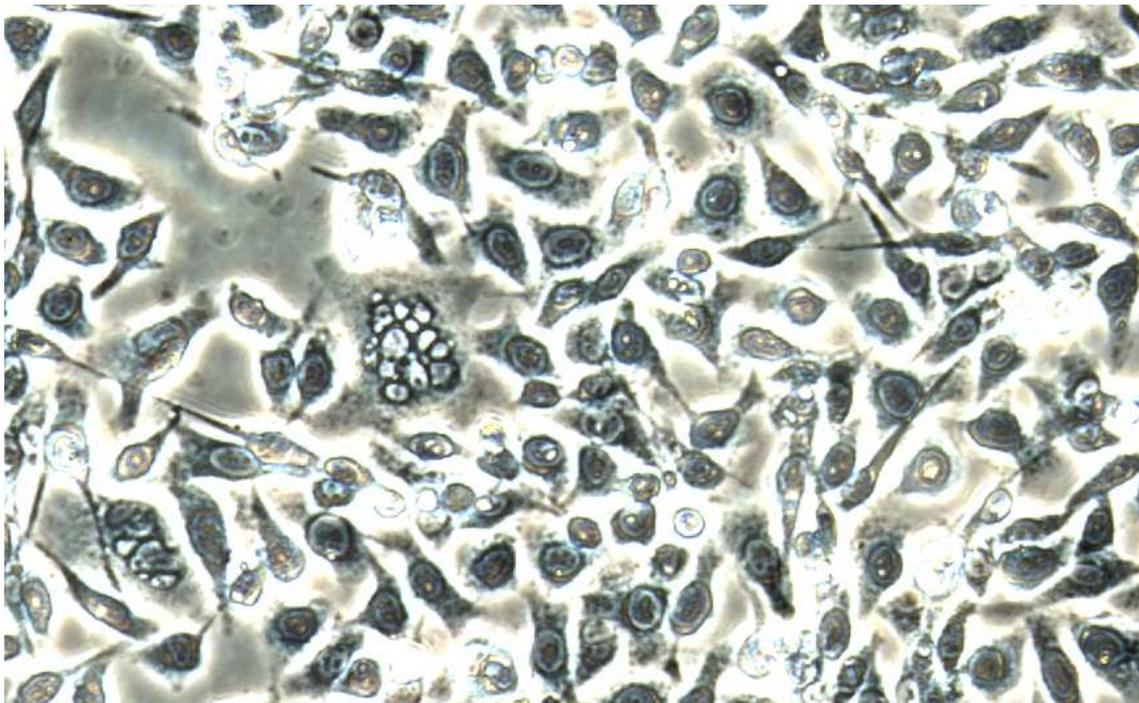
Die Calciumtransfektion ermöglicht das Einschleusen größerer Mengen an DNA. Es wurde versucht, eine möglicherweise geringe Replikationskompetenz durch Einsatz größerer DNA-Mengen zu Beginn der Virusexpression in der Transfektion einzusetzen.

In ED-Zellen wurden dazu mit Hilfe einer Calciumtransfektion 3µg an DNA der EFV-Klone eingebracht. Nach erfolgreicher Transfektion erfolgte die Bebrütung über Tage im Brutschrank, wobei die Zellkulturen zunächst nicht gespalten, sondern auf größere Kulturbehältnisse überführt wurden. Auch dieses Vorgehen zeitigte keinen Erfolg in Gestalt sichtbarer morphologischer Kennzeichen einer Infektion mit Foamyvirus.

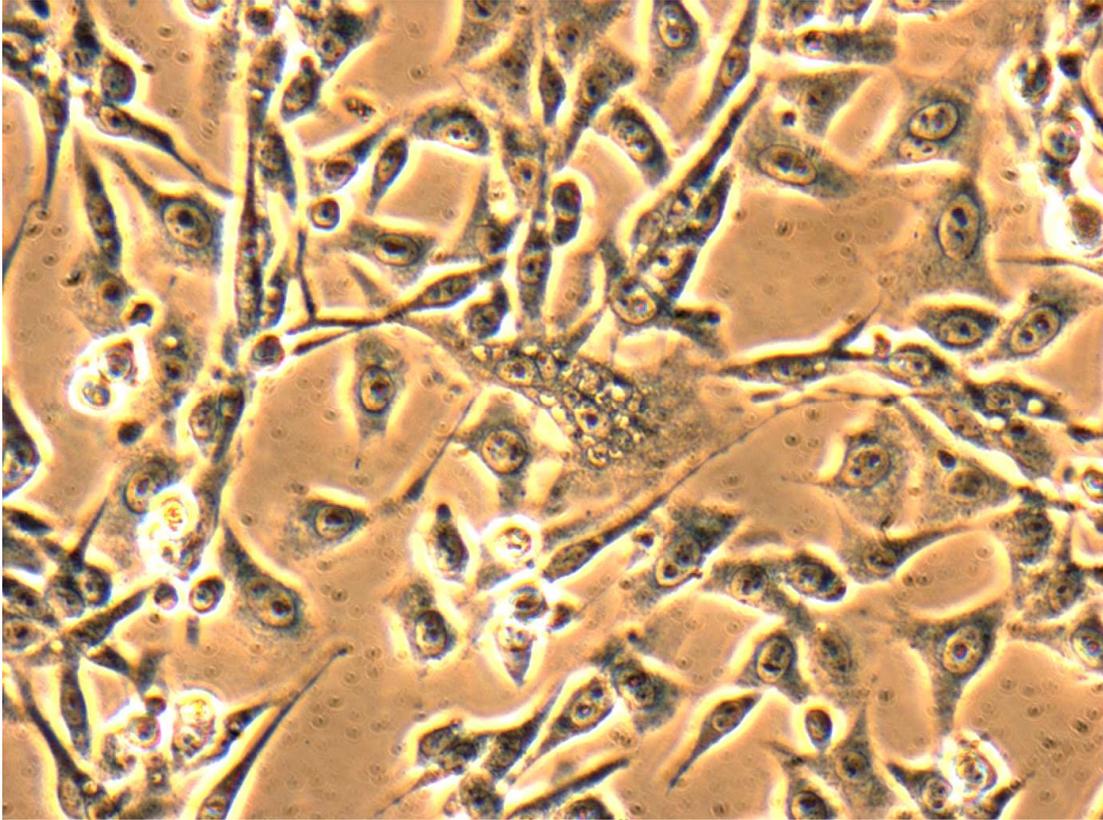
### 3.4. Lichtmikroskopische Beobachtung potentiell infizierter Zellen

Während der oben angeführten Versuche, EFV mit Hilfe der potentiell infektiösen Klone zu exprimieren, wurden die Zellkulturen immer wieder auf das Erscheinen eines foamy-typischen CPE hin untersucht. Wie unter 3.4.2. beschrieben, zeigten sich bei den ersten Anzuchtversuchen sporadisch größere Synzytien in den infizierten Zellkulturen, während die Kontrollkultur keine Synzytien mit mehr als vier Zellen aufwies.

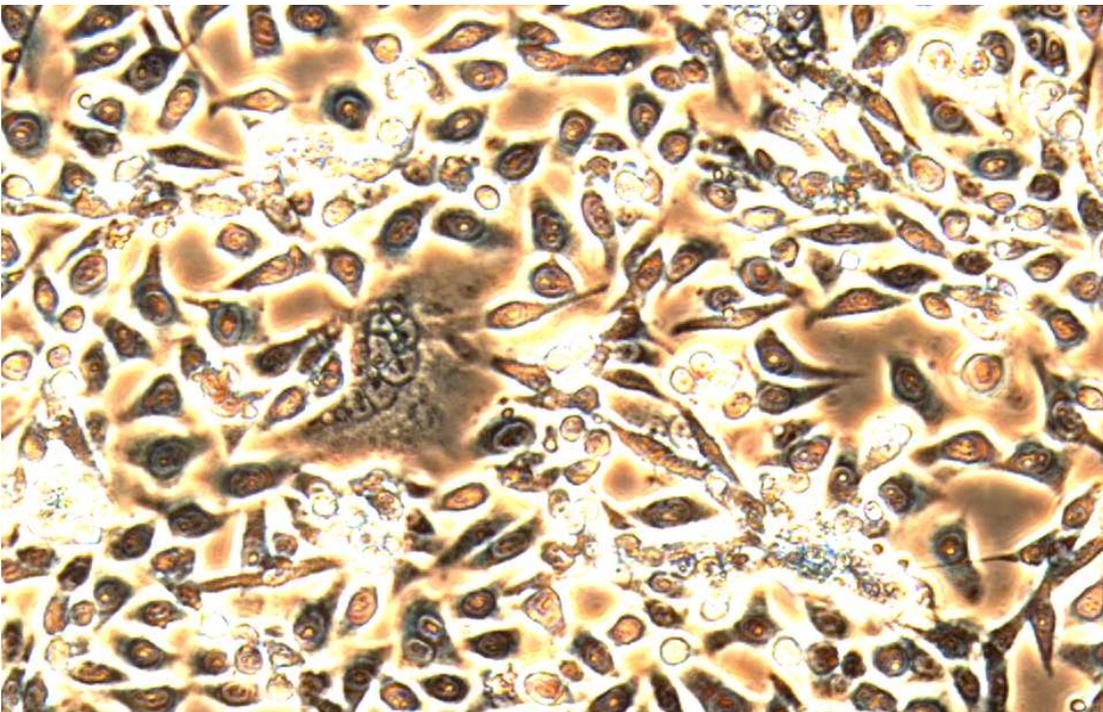
Nach einer zellfreien Passage wurden die folgenden Bilder von Zellkulturen mit EFV gemacht.



**Abb. 3.29.: BHK-Zellkultur mit sterilfiltriertem Überstand von mit pEFVL transfizierten 293T-Zellen. Erkennbar ist zentral ein Synzytium mit 5-6 Zellkernen und eine deutliche Vakuolisierung. Links davon leicht versetzt ebenfalls eine Aggregation von Zellkernen, ansonsten zeigt die Zellkultur in der gewählten Einstellung eine normale Morphologie.**



**Abb. 3.30.:** BHK-Zellkultur mit sterilfiltriertem Überstand von mit pEFVL transfizierten 293T-Zellen. Zentral ist ein Synzytium mit 6-7 Zellkernen und einer deutlichen Vakuolisierung zu erkennen.



**Abb. 3.31.:** BHK-Zellkultur mit sterilfiltriertem Überstand von mit pEFVL transfizierten 293T-Zellen. Zentral ist ein Synzytium mit sechs Kernen und einigen Vakuolen zu sehen. Die übrigen Zellen zeigen die normale Morphologie der BHK-Zellkultur.

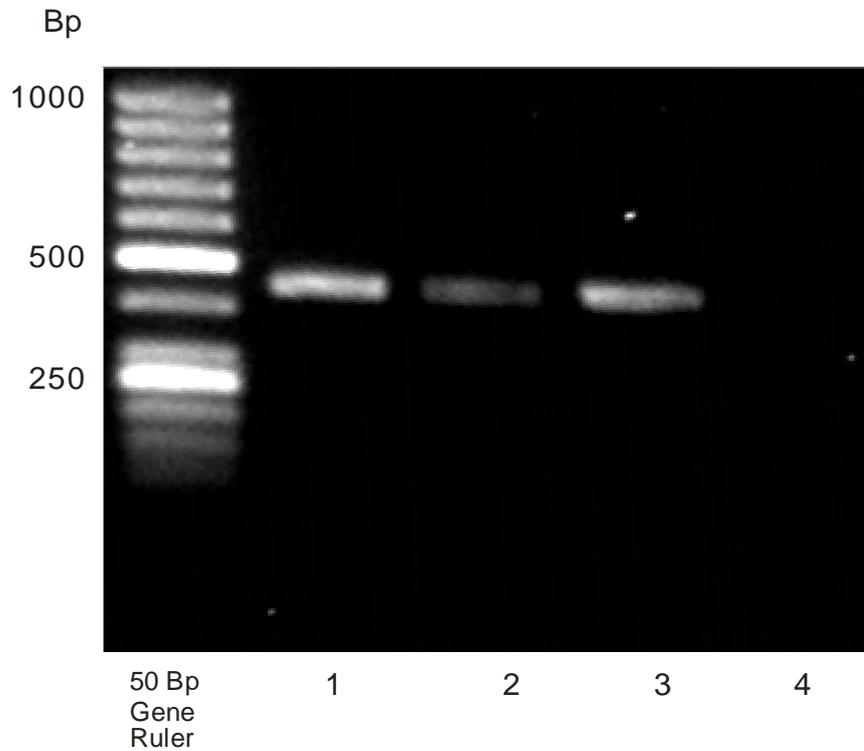
Die Abbildungen zeigen die typischen Effekte, wie sie für die Versuche zur Zellkultur mit EFV beschrieben werden konnten (s.o.), mäßige, sich von der Negativkontrolle abhebende Synzytienbildung, aber keine deutlichen zytopathogenen Effekte wie in der Positivkontrolle. Vereinzelt wurden auch deutlichere Effekte als die dokumentierten beobachtet. Die schwache Ausprägung der Effekte, das Verlorengehen nach einigen Passagen und die mangelnde Reproduzierbarkeit bei weiteren Expressionsversuchen lassen aber keinen auf die Mikroskopie gründbaren Schluss zu, dass wirklich EFV in den Zellkulturen vorhanden war.

### **3.5. Nachweisversuch von viraler DNA**

Im Zuge der ersten Kultivierungsversuche von EFV nach Transfektion der infektiösen Klone wurde versucht, das indifferente Bild der Lichtmikroskopie durch einen molekularbiologischen Nachweis des infektiösen Virus zu klären. Angestrebt wurde ein Nachweis von EFV-DNA in der Zellkultur nach mehrfacher, zellfreier Passage durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

DNA ließ sich mit dem Qiagen Tissue Extraction Kit nach 3 zellfreien Passagen sowie nach 6 zellfreien Passagen aus morphologisch auffälligen, möglicherweise EFV-infizierten Zellkulturen isolieren. Die isolierte DNA wurde photometrisch vermessen, wobei sich Ausbeuten von jeweils um die  $0,04\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ergaben. Für die PCR wurde eine Taq-Polymerase und auf Grundlage der EFV-Sequenz hergestellte Oligonukleotide (7667s/8143a) eingesetzt. Als template dienten jeweils  $5\mu\text{l}$  der aus Zellkultur isolierten DNA, als Positivkontrolle 20ng Plasmid-DNA von pEFVL1, die sonstigen Reagenzien und Reaktionsparameter entsprachen dem verwendeten Protokoll (s. o.). Die PCR-Produkte wurden auf 1,2%igen Agarosegelen visualisiert und auf die erwartete Bande von 476Bp untersucht. Positive Befunde bei erwartungsgemäßen Kontrollen fanden sich bei zwei Isolaten nach sechs Passagen aus zwei verschiedenen Zellkulturen, die mit Überstand von pEFVL1 infiziert worden waren. Außerdem fand sich ein positiver Befund bei einem Isolat nach drei Passagen einer ausgehend von pEFVL13 infizierten Zellkultur. Weitere Isolate zeigten kein PCR-Produkt.

Die erzeugten drei PCR-Produkte wurden einer nested-PCR unterzogen. Eingesetzt wurden dazu geeignete Primer (7680s-8120a) und jeweils 1µl des PCR-Produktes. Aus allen drei PCRs ließen sich die erwarteten Banden von 440Bp darstellen (vgl. Abb. 3.32.).



**Abb. 3.32.: Auftrag der PCR-Produkte der nested-PCR. 1: aus L1-Isolat nach sechs Passagen, 2: aus L13-Isolat nach drei Passagen, 3: aus weiterem L1-Isolat nach sechs Passagen, 4: Negativkontrolle. Deutlich erkennbar ist die erwartete Bande (440Bp).**

## 4. Diskussion

In den beschriebenen Experimenten wurde versucht, mit Hilfe eines molekularen Klons von EFV dieses Virus in der Zellkultur anzuzüchten. Die dabei erzielten Ergebnisse sind insgesamt als indifferent zu bewerten, wobei, wenn man die Verwertbarkeit für geplante Folgeversuche in Betracht zieht, das gesetzte Ziel bisher verfehlt wurde.

Aus einem Plasmid mit vollständiger EFV-Sequenz wurden technisch erfolgreich expressionskritische Punktmutationen sowie ein Stück Vektorsequenz eliminiert. Erstere waren ein Teil einer Vielzahl von Punktmutationen, schwerpunktmäßig G>A, in einem der klonierten Genomteile, letztere Insertion Folge eines technischen Fehlers der Vorarbeiten zu diesem Projekt. Durch dieses Vorgehen war die Anzucht von infektiösem Virus in der Zellkultur, zu mindestens was das eingesetzte Genom anbelangt, prinzipiell möglich geworden. Laut den Entdeckern von EFV ließ sich das Virus nach der Isolation auf verschiedenen Zelllinien anzüchten, genannt wurden BHK-21 (Hamster), RK13 (Kaninchen), COS-6 (Affe) und menschliche U373-MG (Tobaly-Tapiero et al. 2000), außerdem ED, eine Fibroblasten-Zelllinie vom Pferd (Lecellier et al. 2002). EFV zeige somit den typischen breiten Tropismus und die einfache Haltung in Zellkultur wie andere FV auch. In diesen bisher publizierten Versuchen zu EFV wurde hinsichtlich der Zellkulturmedien und dem verwendeten FCS keine spezielle Auswahl getroffen. Bei der Anzucht von EFV wurden deutliche zytopathogene Effekte gesehen (Tobaly-Tapiero et al. 2000). Die bei der Anzucht erreichten Virustiter reichten offenbar aus, die verschiedenen molekularbiologischen, elektronenmikroskopischen und proteomischen Versuche mit EFV durchzuführen.

Bei den beschriebenen Versuchen, EFV aus der Grundlage des klonierten Genoms auf BHK-21 bzw. ED-Zellen anzuzüchten, konnten keine praktisch für Folgeversuche wie die Elektronenmikroskopie zu verwendende Virustiter erzielt werden. Kleinere morphologische Auffälligkeiten wie stärkere Synzytienbildung und Vakuolisierung gegenüber den Negativkontrollen konnten vereinzelt und passager festgestellt werden. In einzelnen Zellkulturen ließ sich außerdem nach

zellfreien Passagen Virus-DNA durch PCR nachweisen. Diesen Beobachtungen stehen zahlreiche Versuche gegenüber, in denen keinerlei Hinweis auf eine EFV-Infektion zu finden war. Es ist aufgrund dieser Ergebnislage anzunehmen, dass in einzelnen Versuchen geringe Virustiter erzeugt wurden, das Virus sich in der Zellkultur jedoch nicht halten kann. Wenn auch bisher von keiner praktischen Relevanz für die Durchführbarkeit von Folgeversuchen, ergibt sich aber auf dieser Grundlage die Notwendigkeit, Gründe für das bisherige Scheitern der Anzucht von EFV nicht nur im klonierten Genom zu suchen, sondern auch die generelle Anzüchtbarkeit von EFV in der Zellkultur zu diskutieren.

Das Scheitern der Anzucht von EFV ist möglicherweise auf Fehler im klonierten Genom zurückzuführen. Auch wenn die eindeutigen Hindernisse bei der Expression viraler Proteine eliminiert wurden, bleibt eine Menge an im Rahmen statistischer Veränderungen nicht zu erklärender G>A-Punktmutationen im 3'-wärts gelegenen Genomteil. Die Menge an Punktmutationen in der Sequenz des Glykoproteins, der regulatorischen Proteine und der 3'-LTR waren hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung nicht eindeutig zu bewerten (vgl. 3.1.1.). Möglicherweise bewirkten der Austausch von Aminosäuren in Tas und Bet eine fehlende oder herabgesetzte Aktivität dieser für eine effiziente virale Replikation notwendigen Proteine. Die Abweichungen in der 3'-LTR können, soweit sie in der R-Region liegen, relevant für den Ablauf der Reversen Transkription sein. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass für die Bindung von Tas oder anderen Bestandteilen des Transkriptionskomplexes benötigte DNA-Sequenzen im Bereich des U3-Promotors von G>A-Mutationen affiziert werden. Es ist also durchaus möglich, die geringe oder fehlende Replikationsfähigkeit des EFV-Klons auf die Qualität der Sequenz im Bereich der letzten 3,5kBp des Genoms zurückzuführen.

Außer auf der genomischen Ebene kann das Problem auch bei der prinzipiellen Anzüchtbarkeit von EFV in der Standard-Zellkultur liegen. Im Rahmen der Anzuchtversuche wurde in Betracht gezogen, dass Antikörper gegen BFV im verwendeten FCS möglicherweise EFV binden und somit hohe Virustiter in der

Zellkultur verhindern. Eine Kreuzreaktivität von Anti-BFV mit EFV wurde inzwischen beobachtet (Lindemann; persönliche Kommunikation). Diese Kreuzreaktivität wäre eine stimmige Erklärung für die teils widersprüchlichen Ergebnisse bei der Virusanzucht. Versuche, das Virus ohne FCS oder mit IgG-armen Serum anzuzüchten scheiterten aber ebenfalls, so dass ein möglicher Einfluss von Anti-BFV in diesem Zusammenhang wohl nicht entscheidend ist. Interessanterweise scheiterten auch Versuche, Wildtyp-EFV aus dem Überstand infizierter Zellkulturen anzuzüchten, aus denen bei den Vorarbeiten zu diesem Projekt das EFV-Genom amplifiziert wurde. Diese Zellkulturen waren von der Arbeitsgruppe, die das Virus im Jahr 2000 erstmals beschrieben hatte, zur Verfügung gestellt worden. Obwohl die Kulturen nur einen geringen CPE zeigten, ließ sich EFV-Genom relativ unkompliziert amplifizieren (Bodem, Thümer; persönliche Kommunikation). Ergebnisse zur Anzucht von Wildtyp-EFV aus einer anderen Arbeitsgruppe (Lindemann; persönliche Kommunikation) zeigen ein ähnliches Bild: EFV kann aus der Zellkultur kloniert, aber nicht in dem Maße angezüchtet werden, dass ein prominenter CPE auftritt oder ausreichend Virus für die proteomische oder elektronenoptische Analyse vorhanden ist. In der Zusammenschau der Erfahrungen mit der Anzucht von EFV außerhalb der Arbeitsgruppe der Erstbeschreiber lässt sich sagen, dass es praktische Schwierigkeiten bei der Viruskultur gibt. Auch auf der Basis eines möglichen „perfekten“ molekularen Klons von EFV lässt sich somit vielleicht auch kein Virus in der Zellkultur anzüchten. Die Ursachen liegen angesichts der Tatsache, dass EFV aus den gelieferten Zellkulturen amplifiziert werden konnte, nicht darin, dass das Virus bei Transport oder Lagerung verloren gegangen sein könnte.

Wie beschrieben befinden sich im 3'-wärts gelegenen klonierten Genomteil (Teil 4 im Rahmen der Klonierungsstrategie, vgl. Abb. 3.1.) insgesamt 87 Punktmutationen, die im Rahmen der Mutagenese auf 77 reduziert wurden. Der weitaus größte Teil dieser Punktmutationen war ein Austausch G>A. Es ist davon auszugehen, dass diese Punktmutationen bereits in der aus EFV-Zellkultur isolierten DNA, von der aus das Genom amplifiziert und kloniert

wurde, vorhanden war. Angesichts dreier ohne Mutationen amplifizierter anderer Genomabschnitte liegt eine Fehlfunktion der bei der PCR eingesetzten Polymerase nicht nahe. Die Hypermuation retroviraler DNA von G>A ist Bestandteil der Resistenz vieler Zelltypen gegen Retroviren. Proteine der APOBEC3-Familie vermitteln während der Reversen Transkription über eine Cytidineaminase-Aktivität die Umwandlung von dC zu dU auf der Minusstrang-DNA (Cullen 2006). Dies erfolgt bei bis zu 20% aller dC und resultiert auf dem Plusstrang der Provirus-DNA in G>A Hypermuation. EFV begegnen diesem replikationshemmenden Mechanismus der Wirtszellen mit der Expression von Bet, welches die Inkorporation von APOBEC3 in Viruspartikel verhindert (Cullen 2006, Perkovic et al. 2009). Möglicherweise ist die Menge an G>A Mutationen im klonierten Genom auf die Wirkung von APOBEC3-Aktivität in der Zellkultur zurückzuführen, die durch virales Bet nicht unterbunden wurde. In einer verminderten oder fehlenden Aktivität von EFV Bet gegenüber den von den Wirtszellen exprimierten APOBEC3-Proteinen liegt ein Erklärungsansatz für die allgemein schlechte Kultur von EFV in der Standard-Zellkultur wie sie im Rahmen dieses Projektes und anderweitig festgestellt wurde. APOBEC3-Proteine sind nicht in jedem Zelltyp und in jeder Zelllinie vorhanden, man kann was die Resistenz gegenüber Retroviren ohne Bet- oder Vif-Aktivität anbelangt permissive und nonpermissive Zelllinien unterscheiden (Cullen 2006). Wenn EFV Bet auch im Wildtyp-Virus keine ausreichende Aktivität gegen APOBEC3-Proteine anderer Spezies aufweist, wäre die Viruskultur nur auf permissiven Zellen möglich, vielleicht waren die Zellen, auf denen EFV nach der Isolation angezüchtet wurde, permissiv, während die in diesem Projekt verwendeten Zellen eine APOBEC3-Aktivität aufwiesen. Gegen diese Hypothese spricht die fehlende Anzüchtbarkeit auf ED-Zellen, an deren mögliche APOBEC3-Expression EFV ja angepasst sein sollte. Eine gegen verschiedenen Orthoretroviren wirksame APOBEC3-Expression wurde für Immunzellen vom Pferd beschrieben (Zielonka et al. 2009), in vivo wird die EFV-Replikation im Gleichgewicht mit diesen antiretroviralen Mechanismen stehen. Ob EFV Bet bzw. die APOBEC3-Expression der Wirtszelllinien wirklich einen

entscheidenden Einfluss auf die Viruskultur mit EFV hat, muss aufgrund der vorliegenden Datenlage aber offen bleiben.

Um das Ziel der Erzeugung größerer Mengen von replikationsfähigem Virus mit einem infektiösen EFV-Klon zu erreichen, sind weitere Arbeiten und Versuche auf beiden charakterisierten Problemfeldern nötig. Zunächst gilt es die Qualität der Sequenz des EFV-Klones zu verbessern. Die Menge der Punktmutationen stellt eine zu große Unwägbarkeit dar, wenn es darum geht festzustellen, ob überhaupt replikationsfähiges Virus mit diesem Klon erzeugt werden kann. Anders als die Mutagenese der Stopp-Mutationen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, wäre eine einzelne Mutagenese aller Punktmutation viel zu aufwändig. Um eine bessere Sequenzqualität zu erreichen, wird es nötig sein, den von Punktmutationen betroffenen hinteren Genomteil erneut zu klonieren. Einige Isolate von Zellkultur-DNA mit enthaltener EFV-DNA liegen noch vor, aus einem wurde die aktuelle Sequenz kloniert. Sinnvoll wäre es, den fehlerhaften Teil des Genoms noch einmal aus den verschiedenen DNA-Präparationen zu amplifizieren. Die Wahrscheinlichkeit besteht, dass sich auch EFV-DNA ohne G>A Punktmutationen in den Isolaten befindet. Die PCR-Produkte ließen sich klonieren, die Sequenz überprüfen. Mögliche bessere Sequenzen können dann relativ einfach in den bestehenden kompletten EFV-Klon eingefügt werden. Gelingt es nicht, Sequenzen mit weniger Punktmutationen zu amplifizieren, kann man auch versuchen, die intakte 5'-LTR aus dem aktuellen Klon zu amplifizieren und damit die fehlerhafte 3'-LTR zu ersetzen. Wenn das entscheidende Hindernis in der 3'-LTR läge, wäre das Problem somit gelöst. Mit einem Klon mit weniger oder keinen nennenswerten Abweichungen zur publizierten Sequenz kann dann erneut die Expression von EFV in der Zellkultur versucht werden.

Parallel zur oder an die Verbesserung des infektiösen Klon anschließend kann versucht werden, die Frage der generellen Anzuchtbarkeit von EFV in Zellkulturen zu klären. Dazu müsste erneut Virus von den Erstbeschreibern zur Verfügung gestellt werden bzw. eine Neuisolierung von EFV von infizierten Pferden erfolgen. Bei anhaltenden Schwierigkeiten bei der Viruskultur bestünde

die Möglichkeit, mit permissiven oder non-permissiven Zelllinien in Bezug auf APOBEC3 zu arbeiten, um zu prüfen, ob diese Proteine die Replikation von EFV relevant beeinflussen. So ließe sich gegebenenfalls feststellen, welche APOBEC3-Proteine welcher Spezies von EFV-Bet blockiert werden können. Der Aufwand solcher Versuche steht jedoch in keinem rechten Verhältnis zur Relevanz der Ergebnisse, so dass sich die nächsten Schritte auf die Verbesserung des molekularen Klons erstrecken werden.

Als besondere Eigenschaft des EFV wurde von den Erstbeschreibern die Partikelausschleusung *ausschließlich* von der Zellmembran beschrieben (Tobaly-Tapiero et al. 2000, Lecellier et al. 2002). In einer Übersichtsarbeit wurde die Einschätzung zu *schwerpunktmäßig* an der Plasmamembran verschoben (Saib 2003). Darin spiegelt sich die Erweiterung des Kenntnisstandes über FV Env und die Partikelausschleusung um die Jahrtausendwende allgemein wider. Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten seit Jahren darauf hin, dass FV schwerpunktmäßig von intrazytoplasmatischen Membranen freigesetzt werden, zuletzt bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Identifikation eines auf die Partikelreifung wirkenden ER-Rückführungsmotivs in Env (Goepfert et al. 1997, 1999). Die Beobachtung, dass EFV dieses Motiv nicht besitzt und ausschließlich von der Plasmamembran freigesetzt wird, passte hervorragend in die Vorstellung vom ER-Rückführungsmotiv in Env als Schalter für die Partikelfreisetzung. Fast zeitgleich wurde jedoch festgestellt, dass weitere Regionen in Env, ein Motiv in der MSD (Pietschmann et al. 2000) und ein Motiv im LP (Lindemann et al. 2001), mindestens im gleichen Maß die Lokalisation des Buddings beeinflussen. Diese sind überdies essentiell für die virale Replikation, was für das ER-Rückführungsmotiv nicht gilt. Neben EFV fehlt das ER-Rückführungsmotiv auch in der Sequenz des vom Rind isolierten BFV. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation der Partikelreifung bei BFV lag im Jahr 2000 noch nicht vor, wurde aber folglich in der Diskussion der Ergebnisse zu EFV angeregt (Tobaly-Tapiero et al. 2000). Nach einer Neuisolation von BFV von polnischen Rindern wurden

elektronenmikroskopische Aufnahmen zum Partikelnachweis durchgeführt. Es wurde eine Freisetzung von Virionen mit typischer FV Morphologie sowohl von der Plasmamembran als auch von intrazytoplasmatischen Membranen beobachtet (Materniak et al. 2006), ein Befund wie bei Primaten-FV oder FFV auch. Allerdings ist dazu zu sagen, dass keine vollständige Klonierung und Sequenzierung des neuen Isolates publiziert wurde, möglicherweise enthält das neue Isolat ein ER-Rückführungsmotiv im Gegensatz zum bekannten (Renshaw et al. 1991). Die Ergebnisse der letzten Jahre lassen die beobachtete Sonderstellung von EFV bei der Partikelausschleusung, begründet mit dem Fehlen des ER-Rückführungsmotives, als hinterfragenswert erscheinen. Möglicherweise stellt EFV gar keinen Sonderfall bei den FV dar bzw. unterscheidet sich von den Primaten-FV nur in dem Maße wie es BFV auch tut. Weitere Isolate von Nicht-Primaten-FV könnten hier weiterhelfen. Eine Verifikation oder Falsifikation der Sonderstellung von EFV war in diesem Projekt mangels ausreichender Mengen an Virus nicht möglich.

Insgesamt wird die Partikelfreisetzung von FV in vivo als komplexer Prozess begriffen, in dem neben den erwähnten Env-Motiven auch zelluläre Proteine eine Rolle spielen können (Lindemann und Goepfert 2003). Zur Lokalisation der Ausschleusung ist festgestellt worden, dass nicht das ER, sondern das TGN Ort der notwendigen Env-Gag-Interaktion ist (Yu et al. 2006). Dass jahrelang das ER als Ort der Env-Akkumulation auch als Ort der Partikelreifung angesehen wurde, zeigt, dass bei alleiniger mikroskopischer Untersuchung durchaus Ermessens- und Irrtumsspielräume verbleiben, vorsichtige Autoren haben das durch die Beschreibung von „intrazytoplasmatischen Membranen“ zu würdigen gewusst. Die technischen Grenzen und die fragliche Objektivität mikroskopischer Beobachtungen hat sogar schon zu weiterführenden Vermutungen Anlass gegeben. Möglicherweise sind die intrazytoplasmatischen Vesikel, in denen FV beobachtet wurde, durch die Schnittführung bedingte Artefakte und es handelt sich lediglich um Einstülpungen der Plasmamembran. Das hieße, dass FV wie andere Retroviren auch von der Plasmamembran der Wirtszelle freigesetzt werden und nicht von intrazytoplasmatischen Membranen. Die Schwierigkeit, die Frage der Lokalisation endgültig zu klären, liegt in der

Tatsache, dass fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen lediglich eine Momentaufnahme eines an sich dynamischen Prozesses liefern. Mit infektiösen Klonen von PFV, BFV und EFV hergestellte Viruskulturen könnte eine Basis für parallele Untersuchung der Partikelreifung mit verschiedenen Methoden der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie hergestellt werden. Ein infektiöser Klon von PFV besteht, fehlt noch von BFV und ist was EFV anbelangt durch dieses Projekt in greifbare Nähe gerückt.

## 5. Zusammenfassung

Foamyviren (FV) sind komplexe Retroviren, die sich in ihrem Replikationszyklus in vielerlei Hinsicht von den klassischen Retroviren (*Orthoretrovirinae*) unterscheiden. Funktional nehmen sie eine Mittelstellung zwischen Orthoretroviren und Hepadnaviren ein.

Wichtige Unterschiede zu Orthoretroviren liegen in der Reifung und Ausschleusung viraler Partikel. Die Partikelreifung findet wie bei Typ B/D-Orthoretroviren an intrazytoplasmatischen Strukturen statt. Die Partikelfreisetzung wurde bei FV im Gegensatz zu Orthoretroviren hauptsächlich als Ausknospen an intrazellulären Membranen beschrieben. Neben anderen für das Ausknospen relevanten Motiven wurde im viralen Glykoprotein ein ER-Rückführungsmotiv gefunden, das in fast allen FV vorhanden ist und die Ausschleusung an intrazytoplasmatische Membranen dirigieren soll.

Im Jahr 2000 wurde erstmals ein FV aus Pferden isoliert. Dieses Equine Foamy Virus (EFV) zeigte die beschriebenen Eigenschaften anderer FV, jedoch ein ausschließliches Ausknospen viraler Partikel an der Plasmamembran. Ein ER-Rückführungsmotiv ist im Genom von EFV nicht konserviert.

In dieser Arbeit wurde aus mit EFV infizierten Zellkulturen mit Hilfe der PCR das virale Genom amplifiziert und kloniert. Die Genomanteile wurden zu einem proviralen molekularen Klon des Virus zusammengefügt. Eine vollständige Sequenzierung erlaubte die Identifikation expressionskritischer Veränderungen. Mittels weiterer Klonierungen und PCR-Mutagenese konnten eine Sequenzunterbrechung und verschiedene Stopp-Mutationen korrigiert werden. Verschiedene Zelllinien wurden mit dem proviralen Klon transfiziert, eine quantitativ relevante Anzucht von Viren in der Zellkultur gelang trotz Nachweis von viralem Genom durch PCR nach mehreren zellfreien Passagen nicht.

Als Ursache der fehlenden Virusexpression sind Mutationen des Matrizengenoms vor der Klonierung zu vermuten, die für die effektive Replikation relevante, aber bisher noch nicht bekannte Positionen in regulatorischen Proteinen oder LTR-Regionen betreffen.

## 6. Abkürzungen

A	Adenin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Azidothymidin
BFV	Rinderfoamyvirus ( <i>bovine foamy virus</i> )
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CPE	Zytopathogener Effekt ( <i>cytopathogenic effect</i> )
CTRS	Zytoplasmatisches Retentionssignal
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EFV	Pferdefoamyvirus ( <i>equine foamy virus</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FFV	Katzenfoamyvirus ( <i>feline foamy virus</i> )
FV	Foamyvirus
G	Guanin
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
HBV	Hepatitis-B-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFV	Humanes Foamyvirus ( <i>human foamy virus</i> )
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HSRV	Humanes Spumaretrovirus ( <i>human spumaretrovirus</i> )
IP	Interner Promotor
kB	Kilobasen
LP	Signalpeptid ( <i>leader peptide</i> )
LTR	lange, endständige Wiederholung ( <i>long terminal repeat</i> )

MCS	<i>multiple cloning site</i>
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MSD	Membran durchspannende Domäne ( <i>membrane spanning domain</i> )
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
ORF	offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
PBS	Primerbindungsstelle ( <i>primer binding site</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFV	Prototypisches Foamyvirus ( <i>prototypic foamy virus</i> )
PPT	Polypurintrakt
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Shrimp-Phosphatase ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )
SFV	Affenfoamyvirus ( <i>simian foamy virus</i> )
SP	Signalpeptid
T	Thymin
Tas	Foamyvirales Transaktivatorprotein ( <i>transactivator of spumavirus</i> )
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
u	Einheit ( <i>unit</i> )

## 7. Literatur

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

Ali, M., Taylor, G.P. et al. 1996. No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Re Hum Retroviruses*, **12**, 1473-1483

Baldwin, D.N. und 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

Banks, J.D., Beemon, K.L., Linial, M.L. 1997. RNA regulatory elements in the genomes of simple retroviruses. *Sem Virol*, **8**, 194-204

Bienasz, P.D., Rethwilm A., et al. 1995. A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new foamy virus from a gorilla. *Virology*, **207**, 217-228

Bodem, J., Löchelt, M. et al. 1996. Characterization of the spliced pol transcript of feline foamy virus: the splice acceptor site of the pol transcript is located in gag of foamy virus. *J Virol*, **70**, 9024-9027

Bowzard, J.B., Bennett, R.P., Krishna, N.K. et al. 1998. Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue. *J Virol*, **72**, 9034-9044

Cartellieri, M., Rudolph W., et al. 2005. Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology*, **2**, 44

Choi, G., Park, B., Choi, S. et al. 1999. Identification of a cytoplasmic targeting/retention signal in a retroviral Gag polyprotein. *J Virol*, **73**, 5431-5437

Cullen, B.R. 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev*, **56**, 375-394

Cullen, B.R. 2006. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol*, **80**, 1067-1076

Enders, J.F. und Peebles, T.C. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 4137-4141

Enssle, J., Jordan, I. et al. 1996. Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 4137-4141

Enssle, J., Moebes, A. 1999. An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J Gen Virol*, **80**, 1445-1452

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

Falcone, V., Schweizer, M. und Neumann-Haefelin, D. 2003. Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, **277**, 161-180

Fischer, N., Heinkelein, M. et al. 1998. Foamy virus particle formation. *J Virol*, **72**, 1610-1615

Geiselhart, V., Schwantes, A. et al. 2003. Features of the Env leader protein and the N-terminal Gag domain of feline foamy virus important for viral morphogenesis. *Virology*, **310**, 235-244

Goepfert, P.A., Wang, G. und Mulligan, M.J. 1995. Identification of an ER retrieval signal in a retroviral glycoprotein. *Cell*, **82**, 543-544

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

Goepfert, P.A., Shaw, K., Wang, G. et al. 1999. An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol*, **73**, 7210-7217

Heinkelein, M., Schmidt, M., et al. 1998. Characterization of a cis-acting sequence in the pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol*, **72**, 6307-6314

Heinkelein, M., Pietschmann, T. et al. 2000. Efficient intra-cellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *EMBO J*, **19**, 3436-3445

Heinkelein, M. Leuers C., et al. 2002. Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol*, **77**, 11855-11558

Helps, C.R. und Harbour, D.A. 1997. Comparison of the complete sequence of feline spumavirus with those of the primate spumaviruses reveals a shorter gag gene. *J Gen Virol*, **78**, 2549-2564

Heneine, W., Woods, T.C., et al. 1994. Lack of evidence for infection with known human and animal retroviruses in patients with chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis*, **18**, 121-125

Herchenröder, O., Renne, R., et al. 1994. Isolation, cloning and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology*, **201**, 187-199

Hill, C.L., Bieniasz, P.D., und McClure, M.O. 1999. Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol*, **80**, 2003-2009

Hooks, J.J., Gibbs, C.J., et al. 1972. Characterization and distribution of two new foamy viruses isolated from chimpanzees. *Arch Gesamte Virusforsch*, **38**, 38-55

Hooks, J.J., Gibbs, C.J., et al. 1973. Isolation of a new simian foamy virus from a spider monkey brain culture. *Infect Immun*, **8**, 804-813

Jacks, T. 1990. Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Curr Top Microbiol Immunol*, **157**, 93-124

Keller, A., Partin, K.M. et al. 1991. Characterization of the transcriptional trans activator of human foamy retrovirus. *J Virol*, **65**, 2589-2594

Khan, A.S. 2009. Simian foamy virus infection in humans: prevalence and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **7**, 569-580

Kupiec, J. J., Tobaly-Tapiero, J., et al. 1988. Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9557-65

Lecellier, C.H., Neves, M. et al. 2002. Further characterization of equine foamy virus reveals unusual features among the foamy viruses. *J Virol*, **76**, 7220-7227

Lee, E.G., Linial M.L. 2008. The C Terminus of foamy retrovirus Gag contains determinants for encapsidation of Pol protein into virions. *J Virol*, **82**, 10803-10810

Lehmann-Che, J., Giron, M.L. et al. 2005. Protease-dependent uncoating of a complex retrovirus. *J Virol*, **79**, 9244-9253

Lindemann, D., Rethwilm, A. 1998. Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J Virol*, **72**, 4088-94

Lindemann, D., Pietschmann, T. et al. 2001. A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol*, **75**, 5762-5771

Lindemann, D. und Goepfert, P.A. 2003. The foamy virus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **277**, 111-129

Linial, M. 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

Linial, M. L. und Eastman S.W. 2003. Particle assembly and genome packaging. *Curr Top Microbiol Immunol*, **277**, 89-110

Löchelt, M., Flügel, R.M. und Aboud, M. 1994. The human foamy virus internal promotor directs the expression of the functional Bel1 transactivator and Bet protein early after infection. *J. Virol*, **68**, 638-645

Löchelt, M. 2003. Foamy virus transactivation and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, **277**, 27-61.

Malmquist, W.A., van der Maaten, M.J. und 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

Mannigel, I., Stange, A., Zentgraf, H, Lindemann, D. 2007. Correct capsid assembly mediated by a conserved YXXLGL motif in Prototype Foamy Virus Gag is essential for Infectivity and Reverse Transkription of the viral genome. *J Virol*, **81**, 3317-3326

Materniak, M., Bicka, L. und Kuzmak, J. 2006. Isolation and partial characterization of bovine foamy virus from Polish cattle. *Journal Abkürzung*, **9**, 207-211

Maurer, B., Bannert, H., et al. 1988. Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus. *J Virol*, **62**, 1590-1591

Mergia, A., Wu, M. 1998. Characterization of provirus clones of simian foamy virus type 1. *J Virol*, **72**, 817-822

Meiering, C.D. und Linial, M.L. 2002. Reactivation of a complex retrovirus is controlled by a molecular switch and is inhibited by a viral protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 15130-15135

Moebes, A., Enssle, J., et al. 1997. Human foamy virus transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol*, **71**, 7305-7311

Muranyi, W. und Flügel, R.M. 1991. Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol*, **65**, 727-735

Murray, S.M., Linial, M.L. 2006. Foamy virus infections in primates. *J Med Primatol*, **35**, 225-235

Neumann-Haefelin, D., Rethwilm, A., et al. 1983. Characterization of a foamy virus isolated from *Cercopithecus aethiops* lymphoblastoid cells. *Med Microbiol Immunol*, **172**, 75-86.

Parks, W.P., Todaro, G.J., et al. 1971. RNA dependent DNA polymerase in primate syncytium-forming (foamy) viruses. *Nature*, **229**, 258-260

Perkovic, M., Schmidt, S., et al. 2009. Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J Biol Chem*, **284**, 5819-5826

Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M. und Rethwilm, A. 2005. RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol*, **79**, 7005-7013

Peters, K., Barg, N., Gärtner, K., Rethwilm, A. 2008. Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication. *Virology*, **373**, 51-60

Pfrepper, K.I., Rackwitz, H.R. et al. 1998. Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J Virol*, **72**, 7648-7652

Pietschmann, T., Heinkelein, M. et al. 1999. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol*, **73**, 2613-1621

Pietschmann, T., Zentgraf, H. et al. 2000. An evolutionary conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J Virol*, **74**, 4474-4482

Plummer, G. 1962. Foamy virus of monkeys. *J Gen Microbiol*, **29**, 703-709

Renshaw, R.W., Gonda, M.A. und Casey, J.W. 1991. Structure and transcriptional status of bovine syncytial virus in cytopathic infections. *Gene*, **105**, 179-184

Rethwilm, A. 1996. Unexpected replication pathways of foamy viruses. *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, **13** (Suppl.1), 248-253

Rethwilm, A. 2003a. Foreword. In: Foamy viruses. Vol. 277. Berlin: Springer

Rethwilm, A. 2003b. The replication strategy of foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, **277**, 1-26

Rethwilm, A. 2007. Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther*, **7(4)**, 261-271

Riggs, J.L., Oshiro, L.S., et al. 1969. Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature*, **222**, 1190-1191

Rösener, M., Hahn, H., et al. 1996. Absence of serological evidence for foamy virus infection in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Virol*, **48**, 222-226

Russell, R.A., Wiegand, H.L. et al. 2005. Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol*, **79**, 8724-8731

Saib, A., Puvion-Dutilleul, F. et al. 1997. Nuclear targeting of incoming human foamy virus gag proteins involves a centriolar step. *J Virol*, **71**, 1155-1161

Saib, A. 2003. Non-primate foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, **277**, 197-211

Sandefur, S., Smith, R.M., Varthakavi, V., Spearman, P. 2000. Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus Type 1 Pr55(Gag). *J Virol*, **74**, 7238-7249.

Schliephake, A.W. und Rethwilm, A. 1994. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor Protein. *J Virol*, **68**, 4946-4954

Schweizer, M., Turek, R. Et al. 1995. Markers of foamy virus infections in monkeys, apes and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **11**, 161-170

Sfakianos, J.N., Hunter, E. 2003. M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic*, **4**, 671-680

Shaw, K.L., Lindemann, D. et al. 2003. Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle release. *J Virol*, **77**, 2338-2348

Stange, A., Mannigel, I., Peters, K. et al. 2005. Characterization of prototype foamy virus Gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J Virol*, **79**, 5466-5476

Swanstrom R. und Wills, J.W. 1997. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (Hrsg.), *Retroviruses*. Plainview, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 263-334

Switzer, W.M., Bhullar, V. et al. 2004. Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol*, **78**, 2780-2789

Thümer, L., Rethwilm A. et al. 2007. The complete sequence of a New World simian foamy virus. *Virology*, **369**, 191-197

Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., et al. 2000. Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J. Virol*, **74**, 4064-4073

Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., et al. 2001. Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N Terminus of Gag. *J Virol*, **75**, 4367-4375

Vogt, P.K. 1997. Historical introduction to the general properties of retroviruses. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (Hrsg.), *Retroviruses*. Plainview, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1-25

Wang, G. und Mulligan, M.J. 1999. Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of foamy viruses. *J Gen Virol*, **80**, 245-254

Wilk, T., Geiselhart, V. et al. 2001. Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag Domain. *J Virol*, **75**, 7995-8007

Wolfe, N.D., Switzer, W.M. et al. 2004. Naturally acquired simian retrovirus infections in central african hunters. *The Lancet*, **363**, 932-937

Yee, J.K., Friedmann, T., Burns, J.C. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Meth Cell Biol*, **43**, 99-112

Yu, S.F., Baldwin, D.N. et al. 1996a. Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science*, **271**, 1579-1582

Yu, S.F., Edelman, K., Strong, K. et al. 1996b. The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol*, **70**, 8255-8262

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

Yu, S.F., Eastman, S.W., Linial, M.L. 2006. Foamy virus capsid assembly occurs at a percentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag. *Traffic*, **7**, 966-977

Zemba, M., Wilk, T. et al. 1998. The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology*, **247**, 7-13

Zielonka, J., Bravo, I.G., et al. 2009. Restriction of equine infectious anemia virus by equine APOBEC3 cytidine deaminases. *J Virol*, **83**, 7547-7559

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm herzlich für die Vergabe des Themas und die freundliche Begleitung und Unterstützung bedanken, die ich während der ganzen Zeit bei diesem und anderen Projekten erfahren habe.

Herrn Prof. Dr. Klaus Brehm danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jochen Bodem, der diese Arbeit betreut und mich in die verwendeten Arbeitstechniken eingewiesen hat. Bei der Durchführung der Versuche und bei der Niederschrift war er stets für meine Fragen und Probleme erreichbar.

Mein Dank geht an Leonore Thümer für ihre Vorarbeiten zu dieser Arbeit.

Ich danke Tanja Schied, Alexandra Schmitt und Stefan Kowalzik für ihre praktische Unterstützung bei meiner Laborarbeit, ihnen und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für den allzeit freundlichen Umgang und das angenehme und kooperative Klima im Labor.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes verdanke ich finanzielle Förderung, die mir Zeit gegeben hat, neben dem Studium wissenschaftlich zu arbeiten.

Meiner Familie und vielen Freunden danke ich für die vielfältige Förderung und Unterstützung, die mir zuteilwurde.

# Lebenslauf

Markus Nistal, geboren am 24.09.1983 in Marburg

## Schulausbildung

1990-1994	Grundschulbesuch in Stade und Oldenburg
1994-1996	Besuch der Orientierungsstufe in Oldenburg
1996-1003	Besuch des Alten Gymnasiums in Oldenburg
05/2003	Abitur

## Hochschulstudium

09/2003	Immatrikulation für Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
02/2004	Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes
09/2005	Ablegen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
11/2005	Zulassung zum Begleitstudiengang „Experimentelle Medizin“
05/2006-12/2007	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Virologie
08/2007-10/2007	Forschungspraktikum an der Universität Stellenbosch (Südafrika), Division of Medical Virology
06/2008	Abschluss des Begleitstudiengangs
08/2008-07/2009	Praktisches Jahr am Klinikum Aschaffenburg (Innere Medizin, Neurologie), am Health Science Centre St. John´s, NL, Kanada (Chirurgie) und am Universitätsklinikum Würzburg (Chirurgie)
11/2009	Ablegen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
11/2009	Approbation als Arzt

---