

Molekulare Untersuchungen zum Gag-Protein der Foamyviren



Dissertation

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

vorgelegt von

Daniel Matthes

geboren am 14. Oktober 1980 in Görlitz

Würzburg 2010

Eingereicht am

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Axel Rethwilm

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kuhn

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Retroviren – allgemeine Übersicht.....	1
1.1.2. Taxonomie.....	2
1.2. Foamyviren.....	2
1.2.1. Allgemeine Übersicht.....	2
1.2.2. Genomorganisation.....	4
1.2.3. Foamyvirale Struktur- und Nicht-Strukturproteine.....	6
1.2.3.1. Das Gag-Protein.....	6
1.2.3.2. Das Pol-Protein.....	8
1.2.3.3. Das Env-Protein.....	8
1.2.3.4. Akzessorische Proteine Tas und Bet.....	10
1.2.4. Der foamyvirale Replikationszyklus.....	12
1.2.5. Strategien der (ortho-) retroviralen Partikelmorphogenese.....	15
1.2.6. Die Rolle des Gag-Proteins während der foamyviralen Partikelmorphogenese.....	16
1.2.7. Die Rolle von Ubiquitin sowie von Lysinen in retroviralen Gag-Proteinen während des Buddings.....	19
1.2.8. Vergleich des Lysingehaltes retroviraler Gag-Proteine.....	20
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Material.....	25
2.1.1. Chemikalien.....	25
2.1.2. Enzyme und Reaktionspuffer.....	25
2.1.3. Größen- und Längenstandards.....	25
2.1.4. Antibiotika.....	26
2.1.5. Bakterienstämme.....	26
2.1.6. Zelllinien.....	26
2.1.7. Antikörper.....	27
2.1.8. Plasmide.....	28
2.1.9. Oligonukleotide.....	29
2.1.10. Bioinformatik.....	39
2.1.11. Kits	40
2.1.12. Sonstige Materialien.....	40
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.2.2. Sequenzierung.....	43
2.2.3. DNA-Agarosegelelektrophorese.....	44
2.2.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
2.2.5. Restriktionsverdau von DNA.....	45
2.2.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	45
2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten.....	46
2.2.8. Verdau von 3'- Überhängen mit der T4-Polymerase.....	46

2.2.9. Klenow-Reaktion.....	47
2.2.10. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	47
2.2.11. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mit DNA.....	48
2.2.12. Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit der TENS-Methode....	49
2.2.13. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	50
2.2.14. Spektrometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	50
2.2.15. Phenol-Chloroform Extraktion von DNA.....	50
2.2.16. Alkohol-Präzipitation.....	51
2.2.17. Herstellung einer RNA-Sonde.....	52
2.2.18. Präparation von DNA und RNA aus Virusüberständen.....	53
2.2.19. cDNA-Synthese.....	53
2.2.20. Quantitative real-time PCR.....	54
2.3. Zellbiologische Methoden.....	55
2.3.1. Kultivierung adhärenter Zellen.....	55
2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	56
2.3.3. Transfektion.....	57
2.3.4. Herstellung von Zellysaten.....	59
2.3.5. Indirekte Immunfluoreszenz.....	59
2.3.6. Fixierung transfizierter Zellen für die elektronenmikroskopische Analyse...	61
2.3.7. Histochemische β -Galactosidase-Färbung.....	61
2.4. Virologische Methoden.....	62
2.4.1. Vektorsysteme für die Analyse von PFV Gag.....	62
2.4.2. Herstellung virushaltiger Überstände	63
2.4.3. Quantitative Bestimmung des Virustiters.....	63
2.4.4. Viruspartikelpräparation aus Zellkulturüberständen.....	64
2.4.5. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	65
2.5. Proteinbiochemische Methoden.....	65
2.5.1. SDS-Polyacrylamidgel-Ektrophorese (SDS-PAGE).....	65
2.5.2. Western Blot.....	67
3. Ergebnisse.....	70
3.1. Identifikation eines Env-interagierenden Motivs in PFV Gag.....	70
3.1.1. Klonierung eines PFV/MPMV-Hybridplasmids.....	70
3.1.2. Überprüfung der Funktionalität der Konstrukte.....	74
3.1.3. Analyse des PFV Env-spezifischen Exportes von <i>gag</i> -Deletionsmutanten.	76
3.1.4. Analyse des PFV Env-spezifischen Exportes von <i>gag</i> -Alaninmutanten.....	79
3.1.5. Immunfluoreszenzanalyse Export-negativer Alaninmutanten.....	85
3.1.6. EM-Analyse Export-negativer Alaninmutanten.....	88
3.1.7. Expression der Export-negativen Alaninmutanten in pczHSRV2.....	89
3.1.8. Immunfluoreszenzanalyse der pczHSRV2-Alaninmutanten.....	90
3.1.9. EM-Analyse der pczHSRV2-Alaninmutanten.....	92
3.2. Funktionelle Analyse basischer Aminosäurereste in FV Gag.....	95
3.2.1. Klonierung von Substitutionsmutanten infektiöser PFV- und FFV-Klone.....	95
3.2.2. Bestimmung der Titer der mutierten Proviren.....	98
3.2.3. Untersuchung auf Revertantenbildung von PFV-Mutanten.....	104

3.2.4. Bestimmung des Zeitpunktes der reversen Transkription der mutierten Proviren.....	105
3.2.5. Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes der mutierten Proviren.....	109
3.2.6. Nachweis der Infektiösität von PFV DNA aus extrazellulären Partikeln....	115
3.2.7. Untersuchung einer möglichen Ubiquitinierung der zusätzlichen Lysine in PFV und FFV Gag.....	117
3.2.8. Untersuchung einer VLP-Freisetzung sowie der Pseudotypisierung ubiquitiniertes PFV <i>gag</i> -Mutanten.....	121
3.2.9. Untersuchung der Replikationsfähigkeit der Substitutionsmutanten in Interferon-behandelten MRC-5-Zellen.....	126
4. Diskussion.....	131
4.1. Identifikation eines Env-interagierenden Motivs in PFV Gag.....	131
4.2. Funktionelle Analyse basischer Aminosäurereste in FV Gag.....	137
4.2.1. Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf das virale Replikationsverhalten.....	137
4.2.2. Betrachtung der Lysin-Arginin-Transitionen im evolutionären Kontext.....	148
5. Literaturverzeichnis.....	154
6. Anhang.....	170
6.1. Zusammenfassung.....	170
6.2. Summary.....	172
6.3. In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	174
6.4. Abbildungsverzeichnis.....	179
6.5. Tabellenverzeichnis.....	181
6.6. Abkürzungsverzeichnis.....	182
6.7. Erklärung.....	186
6.8. Lebenslauf.....	187
6.9. Publikationsliste.....	187
6.10. Danksagung.....	188

1. Einleitung

1.1. Retroviren – allgemeine Übersicht

Die Familie der Retroviren wurde vor etwa 100 Jahren zum ersten Mal beschrieben. Ellermann und Bang zeigten 1908, daß die Mäuseleukämie durch Ultrafiltrate auf gesunde Tiere übertragen werden konnte (Ellermann und Bang, 1908, nach Modrow, Falke, Truyen, 2003). Drei Jahre später entdeckte Peyton Rous, daß er mit ultrafiltrierten Extrakten aus Geflügelsarkomen diese Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen konnte. Dementsprechend wurde das in den Extrakten enthaltene Retrovirus Rous-Sarkoma-Virus (RSV) genannt (Rous, 1911, nach Modrow, Falke, Truyen, 2003). Seitdem wurde eine Reihe weiterer onkogener Retroviren entdeckt wie das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV, Bittner, 1936) oder das humane T-Zell-Leukämievirus (HTLV, Gallo et al., 1981). Neben Tumorerkrankungen rufen Retroviren jedoch auch andere Erkrankungen hervor wie Immundefizienzen (humanes Immundefizienzvirus, HIV, Barre-Sinoussi et al., 1983, Gallo et al., 1984, Coffin et al., 1986) oder neurologische Erkrankungen (HTLV, Gallo et al., 1981).

Das onkogene Potential von Retroviren beruht auf einigen bemerkenswerten Eigenschaften, welche sie von anderen Virusfamilien unterscheiden. Zum einen kodieren Retroviren ein Enzym, die Reverse Transkriptase (RT), welches ihnen ermöglicht, RNA in DNA umzuschreiben. Dies bedeutet eine Umkehr des genetischen Informationsflusses von DNA zu RNA (Baltimore 1970, Temin und Mizutani 1970). Diese Fähigkeit weisen sonst nur Hepadnaviren (Beck und Nassal, 2007) sowie Caulimoviren der Pflanzen (Pfeiffer und Hohn, 1983) auf. Im Vergleich zu diesen zeichnen sich Retroviren jedoch durch eine weitere Eigenschaft aus, nämlich der Integration ihres in DNA umgeschriebenen Genoms in das Wirtsgenom. Verantwortlich dafür ist die Aktivität der Integrase (IN, Lewinski und Bushman, 2005). Dadurch sind Retroviren nicht nur aufgrund ihrer Bedeutung als Pathogene für viele Säugetiere, sondern auch hinsichtlich ihrer Verwendung als Vektoren für die Gentherapie interessant geworden.

Einleitung

1.1.2. Taxonomie

Retroviren sind umhüllte Partikel mit einem Genom aus positiv-einzelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA) sowie Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Replikationsintermediat. Sie werden in zwei Subfamilien eingeteilt, die der *Orthoretrovirinae* sowie die der *Spumaretrovirinae*. Während erstere aus sechs Genera besteht, umfasst letztere nur ein Genus, das der Foamyviren (FV). Abb. 1 stellt eine Übersicht der Genera mit charakteristischen Vertretern dar. Alle Retroviren kodieren für die Strukturgene *gag* (gruppenspezifische Antigene), *pol* (enzymatische Aktivitäten) sowie *env* (Glykoproteine). Daneben kodieren komplexe Retroviren im Gegensatz zu einfachen Retroviren für weitere akzessorische Proteine mit regulatorischen Funktionen (Cullen, 1998). Früher erfolgte zudem eine Einteilung nach unterschiedlicher Partikelmorphologie und -morphogenese.

Subfamilie	Genus	Charakteristische Vertreter	Genom	Morphogenese
<i>Orthoretrovirinae</i>	α -Retroviren	Rous-Sarkoma-Virus	einfach	C-Typ
	β -Retroviren	Maus-Mammatumor-Virus	komplex	B-Typ
		Mason-Pfizer Monkey Virus	einfach	D-Typ
	γ -Retroviren	Mausleukämieviren	einfach	C-Typ
	δ -Retroviren	Humanes T-Zell-Leukämievirus	komplex	C-Typ
	ϵ -Retroviren	Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus	komplex	C-Typ
	Lentiviren	Humane Immundefizienzviren	komplex	C-Typ
<i>Spumaretrovirinae</i>	Foamyviren	Prototypisches Foamyvirus	komplex	Ähnlich B-/D-Typ

Tab. 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren (verändert nach Modrow et al., 2003, Dissertation Cartellieri, 2005)

1.2. Foamyviren

1.2.1. Allgemeine Übersicht

Foamyviren (FV) nutzen ein breites Spektrum innerhalb der Säugetiere als Wirt. Neben höheren Primaten sind dies viele Affenarten der Alten wie der Neuen Welt sowie Katzen, Pferde und Rinder. Tab. 2 gibt eine Übersicht über Foamyvirus-Isolate und ihre Wirte. Ein 1971 aus dem Nasopharynx-Karzinom eines Kenianers gewonnenes Isolat wurde anfangs als Humanes Foamyvirus (HFV) bezeichnet (Achong et al., 1971). Spätere Sequenzanalysen ergaben jedoch eine hohe

Einleitung

Übereinstimmung dieses Isolates mit verschiedenen Schimpansen-Isolaten (Herchenröder et al., 1994). Somit wird heute davon ausgegangen, daß dieses Isolat über einer Zoonose von einem Schimpansen in den Patienten gelangte (Switzer et al., 2004), und in einer neuen Nomenklatur die Bezeichnung Prototypisches Foamyvirus (PFV) anstelle HFV verwendet. Zoonosen von Affen auf Menschen konnten seitdem mehrmals bei Zoowärtern sowie afrikanischen Affenjägern beobachtet werden (Schweizer et al., 1997, Heneine et al., 1998, Sandstrom et al., 2000, Switzer et al., 2004). Übertragungen von Mensch zu Mensch konnten bisher nicht nachgewiesen werden (Meiring und Linial, 2001, Boneva et al., 2002, Switzer et al., 2004).

FV induzieren *in vitro* einen ausgeprägten zytopathischen Effekt in vielen verschiedenen adhärenen Zelltypen. Dieser zeichnet sich durch das Auftreten vakuolisierter, multinukleärer Synzytien aus, welche unter dem Lichtmikroskop an Schaum erinnern.

Dies brachte der Unterfamilie den Namen *Spumaretrovirinae* (Spuma (lat.): Schaum) bzw. dem Genus den Namen Foamyviren (foamy (engl.): schäumend) ein (Mergia et al., 1996, Hill et al., 1999, Meiring und Linial, 2001). Im Kontrast dazu steht die Apathogenität *in vivo*. Bisher konnte sowohl im Menschen als auch im Tier keine Erkrankung mit einer FV Infektion assoziiert werden (Übersicht in Meiring und Linial, 2001). Während provirale DNA in fast allen Organen nachgewiesen werden kann und eine ausgeprägte Antikörperantwort gegen FV induziert wird, konnte eine aktive Virusreplikation bisher nur in der oralen Mukosa nachgewiesen werden (Falcone et al., 1999, Meiring und Linial, 2001, Murray et al., 2008). German et al. zeigten 2008, daß experimentell mit FFV infizierte Katzen zwar histopathologische Veränderungen in der Lunge sowie der Niere aufweisen, diese aber klinisch inapparent sind. Ihre Apathogenität, das breite Wirtsspektrum, der breite Gewebetropismus sowie die Tatsache, daß FV trotz der Anwesenheit hoher Antikörpertiter in fast allen Organen persistieren können, machen sie als Vektoren für die somatische Gentherapie interessant. Zudem besitzen sie mit einer Größe von 12 bis 13 Kilobasen (kb) ein im Vergleich zu anderen Retroviren sehr großes Genom (Lecellier und Saib, 2000), welches zusätzlich genetisch sehr viel stabiler ist als das anderer Retroviren (Meiring und Linial, 2001, Gärtner et al., 2009).

Einleitung

Wirt	Virusisolat	Referenz
Mensch (<i>Homo sapiens</i>) (Zoonose)	PFV	Achong et al., 1971
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	SFVcpz (SFV-6, SFV-7)	Rogers et al., 1967
Orang-Utan (<i>Pongo pymaeus</i>)	SFVora (SFV-11)	McClure et al., 1994
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	SFVgor (SFVgg)	Bieniasz et al., 1995
Afrikanische Grüne Meerkatze (<i>Cercopthieus aethiops</i>)	SFVagm (SFV-3)	Stiles et al., 1964
Rundgesichtsmakkake (<i>Macaca mulatta</i> , <i>M. fascicularis</i>)	SFVmac (SFV-1, SFV-2)	Johnston, 1961
Klammeraffe (<i>Ateles sp.</i>)	SFVspm (SFV-8)	Hooks et al., 1973
Kapuzineraffe (<i>Cebus sp.</i>)	SFVcap (SFV-9)	Hooks und Gibbs, 1975
Galago (<i>Galago crassicaudatus panganiensis</i>)	SFVgal (SFV-5)	Johnston, 1961
Krallenaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)	SFVmar	Pacheco et al., 2010
Katze (<i>Felix domestica</i>)	FFV	Riggs et al., 1969
Rind (<i>Bos taurus</i>)	BFV	Malmquist et al., 1969
Pferd (<i>Equus caballus</i>)	EFV	Tobaly-Tapiero et al., 2000

Tab. 2: Beispiele für Foamyvirus-Isolate und ihre Wirte (verändert nach Meiering und Linial, 2001)

1.2.2. Genomorganisation

FV sind umhüllte Viren mit einem Durchmesser von etwa 100-110 nm (Wilk et al., 2001). Ihr Genom gehört mit einer Größe von 13,25 kb (Provirus) bzw. 11,68 kb (prägenomische RNA) zu den längsten innerhalb der Retroviren (Schmidt et al., 1997). Ihr provirales Genom umfaßt offene Leserahmen (ORFs) für die drei Strukturgene *gag* (gruppenspezifische Antigene), *pol* (enzymatische Aktivitäten) und *env* (Glykoproteine) sowie für die akzessorischen Gene *tas* (*bel-1*) und *bet*, was sie als komplexe Retroviren auszeichnet. Flankiert wird das Provirus durch Long Terminal Repeats (LTRs). Jede LTR (5' und 3') besteht aus einer U3- (unique), einer R- (repeat) sowie einer R5-Region. Eine Besonderheit ist das Vorhandensein eines zweiten, internen Promotors (IP) im 3'-Bereich des *env*-Gens, welcher zusätzlich zum U3-Promotor der LTRs die Genexpression reguliert (Löchelt et al., 1993). Die Regulation beider Promotoren erfolgt über das regulatorische Protein Tas. Im Gegensatz zum U3-Promotor, welcher in Abwesenheit von Tas keine Aktivität aufweist (Keller et al., 1991, Baunach et al., 1993), besitzt der IP eine schwache Basalaktivität, welche zur Bildung geringer Mengen an Tas- und Bet-Protein führt

Einleitung

(Yang et al., 1997). Tas stimuliert daraufhin den IP, was eine verstärkte *tas*- sowie *bet*-Expression zur Folge hat. Ist die Tas-Konzentration genügend hoch, so stimuliert dieses den U3-Promotor, was zur Transkription ungespleißter, prägenomischer sowie einfach gespleißter mRNAs und damit zur Translation der Strukturproteine Gag, Pol und Env führt (Löchelt, 2003, s. Abb. 1).

Die prägenomische RNA enthält mehrere *cis*-aktive Sequenzen (CAS), welche während der Replikation verschiedene Vorgänge regulieren (reverse Transkription, Integration, Dimerisierung sowie Verpackung der genomischen RNA). So dient die Primerbindungsstelle (pbs) als Ort der Initiation der DNA-Minusstrangsynthese, indem sie als Bindungsstelle für eine spezifische, zelluläre tRNA ($tRNA^{lys1,2}$) fungiert (Rethwilm, 2007b). Am Polypurintrakt (PPT), einer Abfolge mehrerer Purine am 3'-Ende der prägenomischen RNA, findet die Initiation der DNA-Plusstrangsynthese statt. Zusätzlich sind im 3'-Bereich des *pol*-Gens vier weitere purinreiche Motive vorhanden, von denen einer (cPPT) wahrscheinlich als zweiter Initiationsort der DNA-Plusstrangsynthese dient (Kupiec et al., 1988, Tobaly-Tapiero et al., 1991, Peters et al., 2008). Für die Verpackung der prägenomischen RNA sind zwei Sequenzen verantwortlich. Dies ist zum einen CASI, welche von der U5-Region am 5'-Ende des Genoms bis in den *gag*-ORF hineinreicht, und zum anderen CASII, welche im 3'-Bereich des *pol*-ORFs lokalisiert ist (Erlwein et al., 1998, Heinkelein et al., 1998, Wu et al., 1998). Zwischen der PBS und dem *gag*-ORF befindet sich außerdem die Dimerisierungssequenz (Cain et al., 2001). In Abb. 1 ist eine Übersicht über die Genomorganisation sowie die Genexpression von PFV dargestellt.

Einleitung

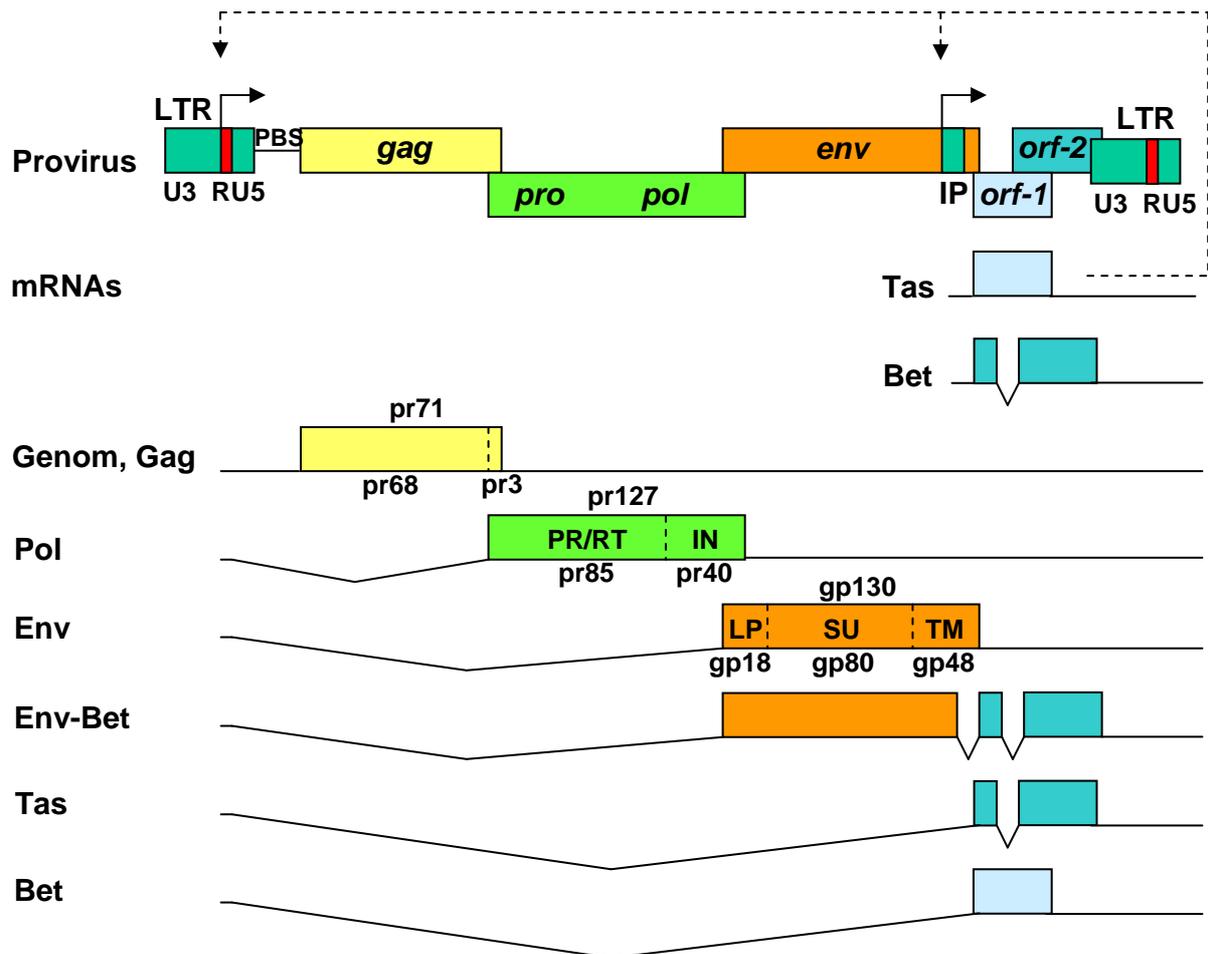


Abb. 1: Genomorganisation und Genexpression von PFV; LTR: Long Terminal Repeats, PBS: Primerbindungsstelle, IP: interner Promotor, *orf*: open reading frame (Leserahmen), PR/RT: Protease/Reverse Transkriptase mit RNaseH-Funktion, IN: Integrase, LP: Leader-Peptid, SU: Surface-Untereinheit, TM: Transmembran-Untereinheit, durchgehende Pfeile symbolisieren Transkriptionsstarts, gestrichelte Pfeile die Promotorstimulation durch Tas

1.2.3. Foamyvirale Struktur- und Nicht-Strukturproteine

1.2.3.1. Das Gag-Protein

Dieses Kapitel bietet einen Überblick über die Funktionen und strukturellen Besonderheiten des Gag-Proteins der FV. Auf die einzelnen Motive sowie deren Funktion während der Replikation wird in Kap. 1.2.3.4. näher eingegangen werden.

Das foamyvirale Gag-Protein wird von einer genomischen ungespleißten RNA translatiert und erfüllt mehrere Funktionen. Zum einen dient es als Strukturprotein dem Aufbau des viralen Kapsids. Desweiteren sichert es die Inkorporation der viralen Nukleinsäure in das Viruspartikel. In dieser Hinsicht gleicht es dem orthoretroviralen Gag-Protein. Jedoch weist es auch mehrere, für Retroviren ungewöhnliche

Einleitung

Charakteristika auf. Orthoretrovirale Gag-Proteine werden nach ihrer Translation in Matrix- (MA), Kapsid- (CA) sowie Nukleokapsid- (NC) Proteine gespalten. Diese Prozessierung unterbleibt bei Foamyviren. Lediglich ein 3 Kilodalton (kD) schweres Fragment (pr3) wird vom C-Terminus des Gag-Vorläuferproteins (pr71) durch die virale Protease abgespalten (Konvalinka et al., 1995, Giron et al., 1997, Pfrepper et al., 1999). Obwohl sich das pr3-Spaltprodukt anders als das Vorläuferprotein pr71 sowie das Prozessierungsprodukt pr68 nicht in Partikeln nachweisen lässt (Flügel und Pfrepper, 2003), ist diese primäre Prozessierung essentiell für die Infektiosität der Viren (Konvalinka et al., 1995, Enssle et al., 1997). Cartellieri et al. (2005b) konnten in aufgereinigten Viruspartikeln ein Verhältnis von unprozessiertem pr71 zu prozessiertem pr68 von etwa eins zu vier bestimmen. Desweiteren kommt es nach Zelleintritt des Virus zu weiteren Gag-Prozessierungen an drei Spaltstellen, was eine Voraussetzung für die Genomfreisetzung (Uncoating) ist (Pfrepper et al., 1999, Petit et al., 2003, Lehmann-Che et al., 2008).

Die Verpackung der genomischen RNA erfolgt bei Orthoretroviren über Cys-His-Boxen im Nukleokapsidprotein (Berkowitz et al., 1996). Diese Motive sind im foamyviralen Gag-Protein nicht vorhanden. Stattdessen sind im C-terminalen Bereich drei Glycin-Arginin-reiche Proteinabschnitte lokalisiert (GR-Boxen I-III). Ausnahmen hiervon stellen das feline Foamyvirus (FFV) sowie das equine Foamyvirus (EFV) dar, deren Gag-Proteine keine GR-Box III enthalten (Winkler et al., 1997, Tobaly-Papiero et al., 2000). Die GR-Box I enthält eine Nukleinsäure-bindende Domäne, über welche sowohl DNA als auch RNA gebunden werden können (Yu et al., 1996). Vergleichbar damit bindet auch der C-terminale Bereich des Core-Proteins der Hepadnaviren über spezifische Argininreste DNA wie RNA (Hatton et al., 1992, Nassal, 1992). In der GR-Box II befindet sich ein Kernlokalisierungssignal, welches einen transienten Gag-Transport in den Nukleus vermittelt (Schliephake und Rethwilm, 1994, Yu et al., 1996). Die Bedeutung dieser Kernlokalisierung ist bislang unbekannt, wie auch die Funktion der GR-Box III. Desweiteren wird eine Rolle der GR-Box I bei der Pol-Verpackung postuliert (Lee und Linial, 2008), wohingegen Wiktorowicz et al., 2009 sogenannte Pol-Enkapsidierungssequenzen (PES) I und II innerhalb der CAS I und II als notwendige, wenn auch nicht ausreichende Sequenzabschnitte für die Pol-Inkorporation identifizieren konnten. Ein weiteres Motiv, welches im orthoretroviralen Gag-Protein konserviert ist, in dem von FV aber nicht vorkommt, ist ein etwa 20 Aminosäure (As) langer Abschnitt im C-terminalen Bereich des CA-Proteins. Dieses

Einleitung

Major homology region (MHR) genannte Motiv wie auch der C-terminal daran angrenzende Proteinabschnitt sind an der konformationellen Reorganisation und Multimerisation des CA-Proteins beteiligt und übernehmen damit eine wichtige Funktion während des Kapsidzusammenbaus (Chang et al., 2007, Purdy et al., 2008, Lokhandwala, 2008).

1.2.3.2. Das Pol-Protein

Die Translation des foamyviralen Pol-Proteins erfolgt von einer separaten, einfach gespleißten mRNA, im Gegensatz zur Synthese als Gag-Pol-Fusionsprotein bei Orthoretroviren (Enssle et al., 1996, Jordan et al., 1996, Löchelt und Flügel, 1996). Das so entstehende Pol-Vorläuferprotein pr127 umfaßt die enzymatischen Aktivitäten der Protease, Reverse Transkriptase, RNase H sowie der Integrase. Es konnte gezeigt werden, daß die autokatalytische Spaltung dieses Vorläuferproteins in die beiden Untereinheiten pr85 (Protease, Reverse Transkriptase und RNase H) sowie pr40 (Integrase) erst im Partikel erfolgt (Netzer et al., 1993, Löchelt und Flügel, 1996, Heinkelein et al., 2002b, Peters et al., 2005). Somit enthalten foamyvirale Partikel im Gegensatz zu Orthoretroviren keine separate Proteaseuntereinheit (Flügel und Pfrepper, 2003). Auch die Integrase von FV unterscheidet sich von jener der Orthoretroviren. Vor der Integration entfernt sie nur am rechten U5-Ende je zwei Nukleotide der doppelsträngigen viralen DNA, jedoch unterbleibt diese Prozessierung am linken U3-Ende der viralen DNA (Enssle et al., 1999, Juretzek et al., 2004). Durch die Translation als separates Protein ergibt sich das Problem einer regulierten Pol-Inkorporation in das Partikel. Wie schon in Kap. 1.2.3.1. erwähnt, wird dabei sowohl eine Rolle von Gag als auch der genomischen RNA diskutiert.

1.2.3.3. Das Env-Protein

Wie im Falle von Pol wird auch das foamyvirale Env-Protein von einer einfach gespleißten mRNA synthetisiert. Es wird als 130 kDa schweres Vorläuferprotein in das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) translatiert und nimmt anfänglich eine Typ III-Konformation ein, bei der sowohl der N- als auch der C-Terminus in das Zytoplasma hineinreichen (Geiselhart et al., 2003, Lindemann et al., 2001). Die anschließende Spaltung dieses Vorläuferproteins gp130 in das Leaderpeptid (LP,

Einleitung

gp18, ubiquitinierte Formen gp28 und gp38), die Transmembranuntereinheit (TM, gp48) sowie die Oberflächenuntereinheit (Surface, SU, gp80) wird durch eine zelluläre Furin-ähnliche Protease katalysiert (Lindemann et al., 2001, Duda et al., 2004, Geiselhart et al., 2004). Wie für Env-Proteine üblich, findet eine umfangreiche Glykolysierung statt (Lüftenegger et al., 2005). Im Viruspartikel liegt Env als Trimer vor (Wilk et al., 2000). Im Gegensatz zu Orthoretroviren erfüllt das Leaderpeptid essentielle Funktionen während der Partikelmorphogenese. FV-Kapside benötigen für die zelluläre Freisetzung (Knospung, Budding) die Anwesenheit des homologen Glykoproteins, eine Verpackung mit heterologen Glykoproteinen (sog. Pseudotypisierung) wie im Falle orthoretroviraler Kapside ist nicht möglich (Friedmann et al., 1995, Swanstrom und Wills, 1997, Baldwin et al., 1998, Fischer et al., 1998, Pietschmann et al., 1999). Im N-Terminus des LP ist eine Domäne mit zwei konservierten Tryptophanresten (W12,15) lokalisiert, welche den Export der FV Kapside durch Interaktion mit Gag vermitteln (Lindemann et al., 2001). Die TM-Untereinheit enthält ein ER-Zurückhalte-Signal (ER-retrieval-signal, ERRS) genanntes Motiv mit zwei konservierten Lysinresten. Dieses Signal bewirkt eine Akkumulation von Env am ER und wird für das Knospen (Budding) an intrazellulären Membranen verantwortlich gemacht (Goepfert et al, 1997, Goepfert et al, 1999, Pietschmann et al., 2000). Jedoch ist die Rolle des ERRS nicht eindeutig geklärt, da es für eine Freisetzung infektiöser Viruspartikel nicht essentiell ist (Goepfert et al, 1999). Ein zum ERRS der FV analoges Motiv ist auch im Glykoprotein der Hepadnaviren vorhanden (Kuroki et al., 1989). Ein weiteres Merkmal, welches FV und Hepadnaviren teilen, ist die Fähigkeit zur Freisetzung sog. subviraler Partikel (SVP). Dabei kommt es zur Abschnürung Env-haltiger Partikel, welche jedoch keine Kapsidstrukturen enthalten und somit nicht infektiös sind. Im Falle des Hepatitis-B-Virus übersteigt dabei die SVP-Sekretion die Freisetzung infektiöser Partikel um ein Vielfaches (Faktor 1000-100.000, Ganem, 2004), was möglicherweise ein Mittel zum Abfangen neutralisierender Antikörper darstellt (Ganem, 1991) oder zu einer Immuntoleranz im Wirt beiträgt (Gerlich, 2005). Im Gegensatz dazu findet bei FV nur eine sehr begrenzte Freisetzung von SVPs statt. Reguliert wird dies durch das LP, dessen zytoplasmatische Domäne fünf Lysinreste enthält. Die Seitenkette von Lysinen dient dabei als potentieller Ubiquitinakzeptor. Es konnte gezeigt werden, daß alle fünf Lysine des LP ubiquitiniert werden können, jedoch die ersten drei präferentiell genutzt werden. Die Substitution dieser drei ersten wie auch aller fünf

Einleitung

Lysine gegen Arginin führt zu einer massiven Freisetzung von SVPs sowohl an intrazellulären Membranen wie auch der Plasmamembran (Stanke et al., 2005). Die Ubiquitinierung von Lysinresten in FV LP stellt somit ein Mittel dar, die Freisetzung subviraler Partikel zu inhibieren und dadurch eine quantitative Interaktion des Env-Proteins mit Gag zu gewährleisten (Stanke et al., 2005, Stange et al., 2008).

1.2.3.4. Akzessorische Proteine Tas und Bet

Als komplexe Retroviren exprimieren FV akzessorische Proteine mit regulatorischen Funktionen während des Replikationszyklus. Dabei handelt es sich zum einen um Tas, einen Transaktivator der Transkription, zum anderen um Bet. Die Transkription von Tas erfolgt von ORF1, welcher zwischen dem *env*-ORF und der 3'-LTR lokalisiert ist. Wie in Kap. 1.2.2. beschrieben, stimuliert Tas durch Aktivierung des IP seine eigene Expression und daran anschließend durch Aktivierung des U3-Promotors die Expression der Strukturproteine (Erlwein und Rethwilm, 1993, Löchelt, 2003). Die Bindung an die Promotoren erfolgt dabei über eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne, die Aktivierung über eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (Garrett et al., 1993, He et al., 1996, Bodem et al., 2007). Als zweites akzessorisches Protein wird Bet von einer gespleißten mRNA transkribiert, welche Teile des *tas*-ORF sowie des ORF2 (früher *bel-2*-ORF) umfaßt (Muranyi und Flügel, 1991). Wie Bock et al., 1998 zeigen konnten, besitzt Bet die Fähigkeit, Zellen vor einer Superinfektion zu schützen. Neuere Untersuchungen ergaben zudem, daß Bet ähnlich wie das Vif-Protein von HIV-1 den Einbau zellulärer APOBEC3- (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic complex 3) Proteine in das Viruspartikel verhindern kann (Löchelt et al., 2005, Russel et al., 2005). APOBEC-Proteine sind zelluläre Proteine mit antiretroviraler Wirkung, welche während der reversen Transkription Cytosine im DNA-Erststrang zu Uracil deaminieren. Dies führt zu einem Einbau von Adenin anstelle von Guanin im DNA-Zweitstrang (sog. G-zu-A-Hypermuation) und infolge dessen entweder zur Degradation der viralen DNA oder zu einer Inkorporation der fehlerhaften DNA in die Viruspartikel (Yu et al., 2004, Delebecque et al., 2006). Einen zweiten Mechanismus der APOBEC3-Wirkung konnten Bishop et al., 2006 nachweisen. Dabei handelt es sich um eine von der Hypermuation unabhängige Inhibition der Akkumulation reverser Transkripte. HIV-1 Vif antagonisiert die APOBEC3-Wirkung über dessen Ubiquitinierung durch zelluläre Proteine und daran

Einleitung

anschließender Degradation durch das Proteasom (Kobayashi et al., 2005). Im Gegensatz dazu führt FV Bet trotz einer direkten Interaktion mit APOBEC3 nicht zu dessen Degradation, sondern verhindert dessen Dimerisierung und damit dessen Inkorporation in das Viruspartikel (Perkovic et al., 2008). Neben Bet konnte ein 170 kDA schweres Env-Bet-Fusionsprotein nachgewiesen werden, welches sich aus den extrazellulären Teilen von Env sowie Bet zusammensetzt (Giron et al. 1998, Lindemann und Rethwilm, 1998). Da es nicht in Viruspartikeln nachgewiesen werden kann und sich Mutanten, denen dieses Protein fehlt, wie Wildtyp-Viren replizieren, konnte mit ihm bisher keine Funktion assoziiert werden.

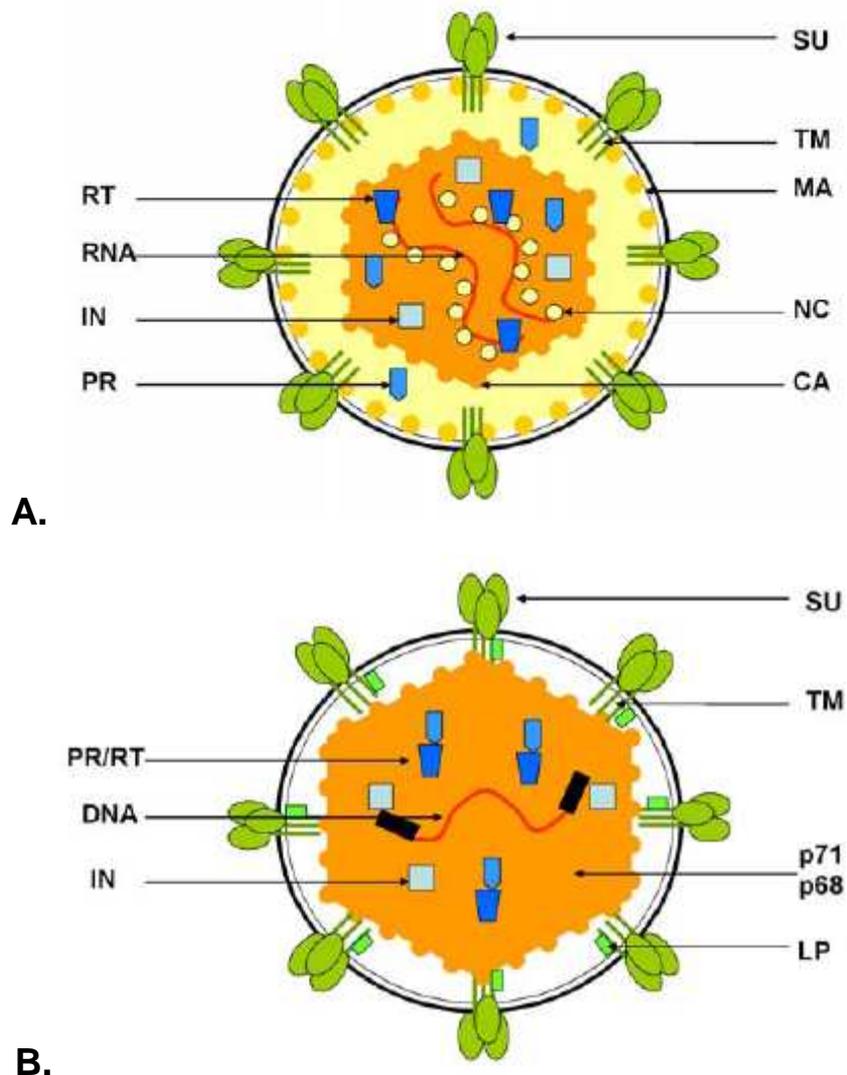


Abb. 2: Morphologie orthoretroviraler (A) und foamyviraler (B) Partikel; SU: Surface-Untereinheit, TM: Transmembran-Untereinheit, LP: Leader-Peptid, MA: Matrixprotein, CA: Kapsidprotein, NC: Nukleokapsidprotein, p71/p68: PFV Gag-Proteine, RNA: RNA-Genom, DNA: DNA-Genom, RT: reverse Transkriptase, PR: Protease, PR/RT: Protease/reverse Transkriptase-Untereinheit der FV; IN: Integrase (Dissertation Nowrouzi, 2007).

1.2.4. Der foamyvirale Replikationszyklus

Die Replikationsstrategie der FV weist eine Reihe von Besonderheiten auf, welche sie von Orthoretroviren unterscheidet und gleichzeitig Parallelen zu Hepadnaviren aufzeigt. Orthoretroviren schreiben ihr RNA-Genom zu einem frühen Zeitpunkt des Replikationszyklus um, zwischen dem Eintritt in die Wirtszelle und vor der Integration in das Wirtsgenom. Sie stellen also RNA-Viren mit einem doppelsträngigen (ds) DNA-Genom als Replikationsintermediat dar. Im Gegensatz dazu findet bei FV wie bei Hepadnaviren die reverse Transkription zu einem großen Teil noch in der virusproduzierenden Zelle statt. FV wie Hepadnaviren können somit als DNA-Viren bezeichnet werden, welche sich über eine RNA-Zwischenstufe replizieren. FV-Partikel enthalten jedoch nicht nur DNA, sondern auch RNA (Moebes et al., 1997, Yu et al., 1999, Roy et al., 2003). Die Tatsache, daß FV ihr Genom noch in der virusproduzierenden Zelle revers transkribieren, eröffnet ihnen die Möglichkeit der sog. Retrotransposition. Dabei kommt es anstatt einer Partikelfreisetzung zu einer Reintegration des viralen dsDNA-Genoms in das zelluläre Genom, was zu multiplen Proviruskopien in einem Wirtszellgenom führt. Dieser Vorgang konnte von Heinkelein et al., 1998 beschrieben werden. Wie bereits in Kap. 1.2.3.2. erwähnt, erfolgt die Translation des foamyviralen Pol-Proteins unabhängig von Gag von einer separaten, einfach gespleißten mRNA, im Gegensatz zur Synthese als Gag-Pol-Fusionsprotein bei Orthoretroviren (Enssle et al., 1996, Jordan et al., 1996, Löchelt und Flügel, 1996).

Ein weiterer Unterschied ist die Tatsache, daß FV Kapside nur in Anwesenheit ihres homologen Env-Proteins knospen können (Baldwin et al., 1998, Fischer et al., 1998, Pietschmann et al., 1999). Eine Freisetzung von Kapsiden in Form von virus-like particles (VLP) wie im Falle der Orthoretroviren ist also nicht möglich. Auch Hepadnaviren benötigen für die Partikelfreisetzung ihr homologes Env-Protein (Bruss, 2007).

Alle bisher getesteten Zelllinien sind mit FV infizierbar. Das deutet auf einen ubiquitären Rezeptor hin, welcher jedoch bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte (Falcone et al., 2003, Lindemann und Goepfert, 2003). Nach Eintritt in die Wirtszelle erfolgt die Freisetzung des Kapsids über pH-abhängige Endocytose (Picard-Maureau et al., 2003). Daran schließt sich der Transport des Kapsids entlang der Mikrotubuli zum Zellinnern in die Nähe des Mikrotubuli-Organisationszentrums

Einleitung

(MTOC) an, wobei es zu einer Interaktion zwischen einem coiled-coiled- (cc) Motiv im N-Terminus von Gag und dem Dynein/ Dynactin-Komplex kommt (Petit et al., 2003, Tobaly-Tapiero et al., 2008). Es kommt zur Anreicherung der Kapside um das MTOC herum und zur Freisetzung des viralen Genoms (Uncoating). Voraussetzung dafür ist eine weitere Prozessierung von Gag an drei zusätzlichen Spaltstellen, was zu einer Abschwächung der Wechselwirkungen innerhalb des Kapsids und damit zu dessen Zerfall führt. Dies wird sowohl von der viralen Protease wie auch von zellulären Proteasen katalysiert (Pfrepper et al., 1999, Petit et al., 2003, Lehmann-Che et al., 2007). Der so entstehende Präintegrationskomplex (PIC) wird anschließend zum Zellkern transportiert. Voraussetzung für die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom ist die Auflösung der Kernmembran während der Mitose, da FV im Gegensatz zu Lentiviren keine sich nicht teilenden Zellen infizieren können (Trobridge et al., 2002, Trobridge et al., 2004). Wie bereits in Kap. 1.2.3.1. erwähnt, sind im C-Terminus des Gag-Proteins der meisten FV drei GR-Boxen lokalisiert, wobei die GR-Box I eine Nukleinsäure-bindende Domäne zur Inkorporation des viralen Genoms in das Viruspartikel besitzt und die GR-Box II ein Kernlokalisierungssignal enthält (Yu et al., 1996, Schliephake und Rethwilm, 1994). Tobaly-Tapiero et al. konnten 2008 ein chromatin-binding site (CBS) genanntes Motiv im N-Terminus der GR-Box II identifizieren, welches über Interaktion mit den Core-Histonen H2A und H2B die Bindung des PIC an die Chromosomen der Wirtszelle vermittelt. Daneben sind auch zelluläre Proteine an dieser Bindung beteiligt (Tobaly-Tapiero et al., 2008). Katalysiert wird die Integration durch die virale Integrase unter Beteiligung zellulärer Kofaktoren (Nowrouzi et al., 2006). Nach Expression der regulatorischen Proteine Tas und Bet vom IP folgt die Expression der Strukturproteine Gag, Pol und Env vom U3-Promotor, wobei Pol und Env von einfach gespleißten mRNAs translatiert werden (s. Kap. 1.2.2., Löchelt et al., 1993, Erlwein und Rethwilm, 1993, Löchelt, 2003). Die mRNAs für die Strukturproteine werden mithilfe der zellulären Faktoren CRM1, HuR, ANP32A und ANP33B aus dem Zellkern exportiert (Bodem, unpublizierte Ergebnisse). Wie in Kap. 1.2.3.3. beschrieben, wird Env in das rER hinein translatiert und von zellulären Proteinen prozessiert, glykosyliert und ubiquitiniert (Lindemann et al., 2001, Geiselhart et al., 2003, Duda et al., 2004, Lüftenegger et al., 2005, Stanke et al., 2005). Die Translation von Gag und Pol findet an freien Ribosomen im Zytoplasma statt. Die genomische RNA wird in dsDNA revers transkribiert und es kommt zur Verpackung sowohl von dsDNA wie

Einleitung

auch genomischer RNA (Moebes et al., 1997, Yu et al., 1999, Roy et al., 2003) in das Viruspartikel. Ebenso wird Pol in das Partikel verpackt, wenn auch der Mechanismus dieser Inkorporation noch diskutiert wird (s. Kap. 1.2.3.1., Lee und Linial, 2008, Wiktorowicz et al., 2009). Auch der Ort der Interaktion zwischen Gag und Env und damit des Buddings ist bisher nicht eindeutig geklärt. Sowohl das trans-Golgi-Netzwerk (Yu et al., 2006) als auch das ER (Fischer et al., 1998, Pietschmann et al., 1999) werden dafür in Betracht gezogen. Eine Ausnahme hiervon stellt EFV dar, dessen Freisetzung hauptsächlich an der Plasmamembran stattfindet. EFV ist zudem das einzige FV, welches kein ERRS im C-Terminus von Env enthält (Tobaly-Papiero et al., 2000). Für das Abschnüren von zellulären Membranen benötigen Retroviren wie auch andere umhüllte Viren sog. late-budding- (L-) Domänen in ihren Gag-Proteinen. Mutationen in diesen Motiven führen zu einem Budding-Defekt, bei dem die letzten Schritte des Abschnürens von zellulären Membranen blockiert sind und das Virus an diesen haften bleibt (Freed, 2002). Im Falle von PFV Gag erfüllt ein PSAP-Motiv diese Funktion (Stange et al., 2004). In Kapitel 1.2.6. wird genauer auf die foamyvirale Morphogenese eingegangen, wobei insbesondere die Rolle des Gag-Proteins während der verschiedenen Prozesse näher beschrieben wird.

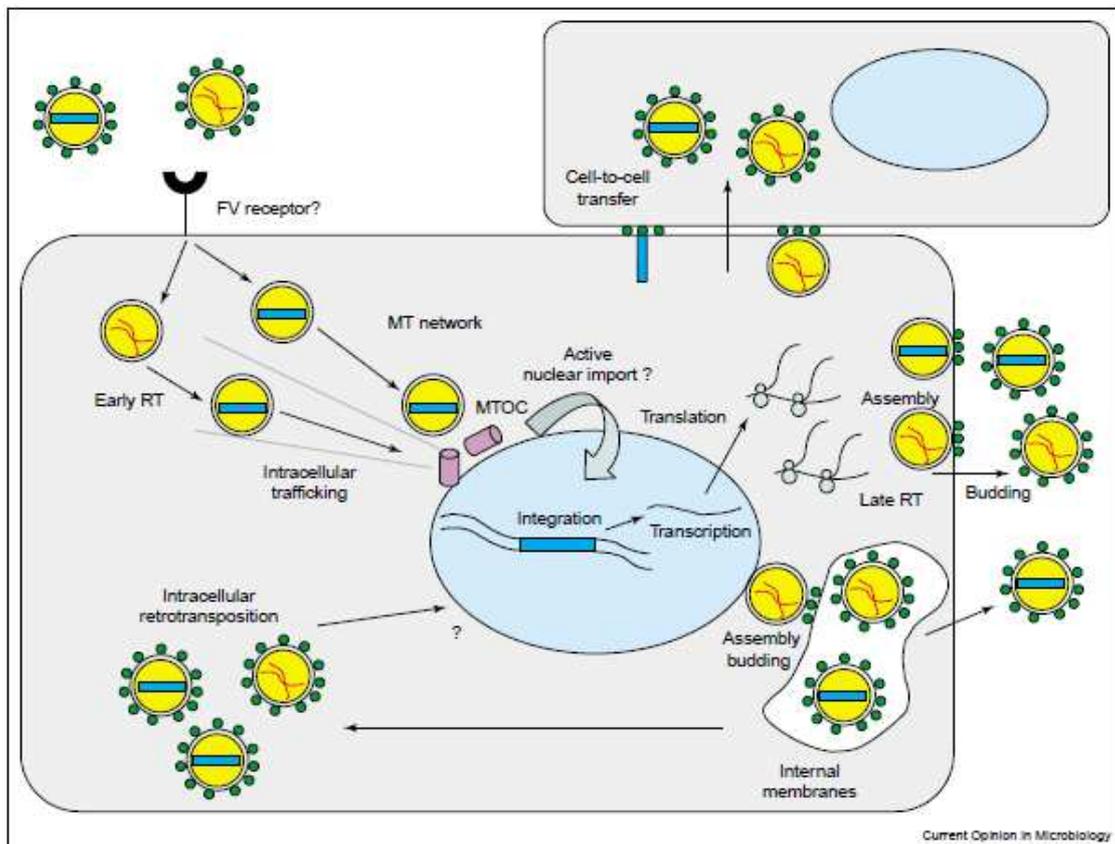


Abb. 3: Schematischer Ablauf des foamyviralen Replikationszyklus; RT: reverse Transkription, MT: Mikrotubuli, MTOC: Mikrotubuli-Organisationszentrum (Delelis et al., 2004).

1.2.5. Strategien der (ortho-) retroviralen Partikelmorphogenese

Retroviren verfolgen verschiedene Strategien zum Zusammenbau (Assemblierung) und der Freisetzung ihrer Kapside. Im Falle der sog. C-Typ-Morphogenese werden die Gag-Vorläufermoleküle zur Plasmamembran transportiert und die Assemblierung findet während des Knospens statt. Es sind also keine intrazellulären Partikel zu beobachten (Choi et al., 1999). Dieser Morphogeneseweg wird von allen Alpha-, Gamma-, Delta- und Epsilonretroviren sowie den Lentiviren verfolgt. Eine zweite Strategie stellt die sog. B-/D-Typ-Morphogenese dar. Dabei kommt es zu einem intrazytoplasmatischen Kapsidzusammenbau zu sog. intrazytoplasmatischen A-Typ-Partikeln (ICAPs), gefolgt vom Transport der vorgebildeten Kapside zur Plasmamembran und daran anschließender Freisetzung der Partikel (Choi et al., 1999). Das Mason-Pfizer Monkey Virus (MPMV) als prototypisches D-Typ-Retrovirus sowie das Maus-Mammatumor-Virus als Prototyp der B-Typ-Retroviren sind charakteristische Vertreter dieses Morphogeneseweges. Choi et al. konnten 1999 ein cytoplasmic targeting/ retention signal (CTRS) genanntes Motiv im Matrixanteil (MA) von MPMV Gag identifizieren, welches die Gag-Vorläufermoleküle zum MTOC dirigiert, wo sie zu Kapsiden multimerisieren. Eine Punktmutation in diesem 18 Aminosäure (As) langen Motiv (R55W) verändert den Morphogeneseweg von einer D-Typ- hin zu einer C-Typ-Morphogenese (Rhee und Hunter, 1990). Sowohl C-Typ- als auch B-/D-Typ-Retroviren benötigen für den Transport und die Verankerung der Vorläufer-Gagmoleküle bzw. der vorgebildeten Kapside in der Plasmamembran weitere Signale in ihren MA-Proteinen. Dabei handelt es sich zum einen um Myristinsäure, eine C14-Fettsäure, welche kotranslational an den N-Terminus von MA angefügt wird (Rhee und Hunter, 1987, Bryant und Ratner, 1990). Zum anderen fungiert eine Domäne mit basischen Aminosäuren im N-terminalen Bereich von MA als Transport- und Membranverankerungssignal (Yuan et al., 1993, Stansell et al., 2007). Da das CTRS dominant über diese Signale ist, ist nach dem Assembly eine Konformationsänderung (sog. switch) der Kapside nötig, um einen effizienten Transport zur Plasmamembran zu gewährleisten (Stansell et al., 2004, Stansell et al., 2007). Orthoretrovirale Kapside benötigen kein Env-Protein zur Freisetzung, sie können sich in Form von VLPs von den Zellen abschnüren, wengleich der Partikelexport in der Anwesenheit von homologem Env effizienter vonstatten geht (Sfakianos et al., 2003). Dadurch wird deutlich, daß orthoretrovirale Gag-Moleküle

sämtliche Informationen enthalten, welche zur Partikelmorphogenese und -freisetzung nötig sind.

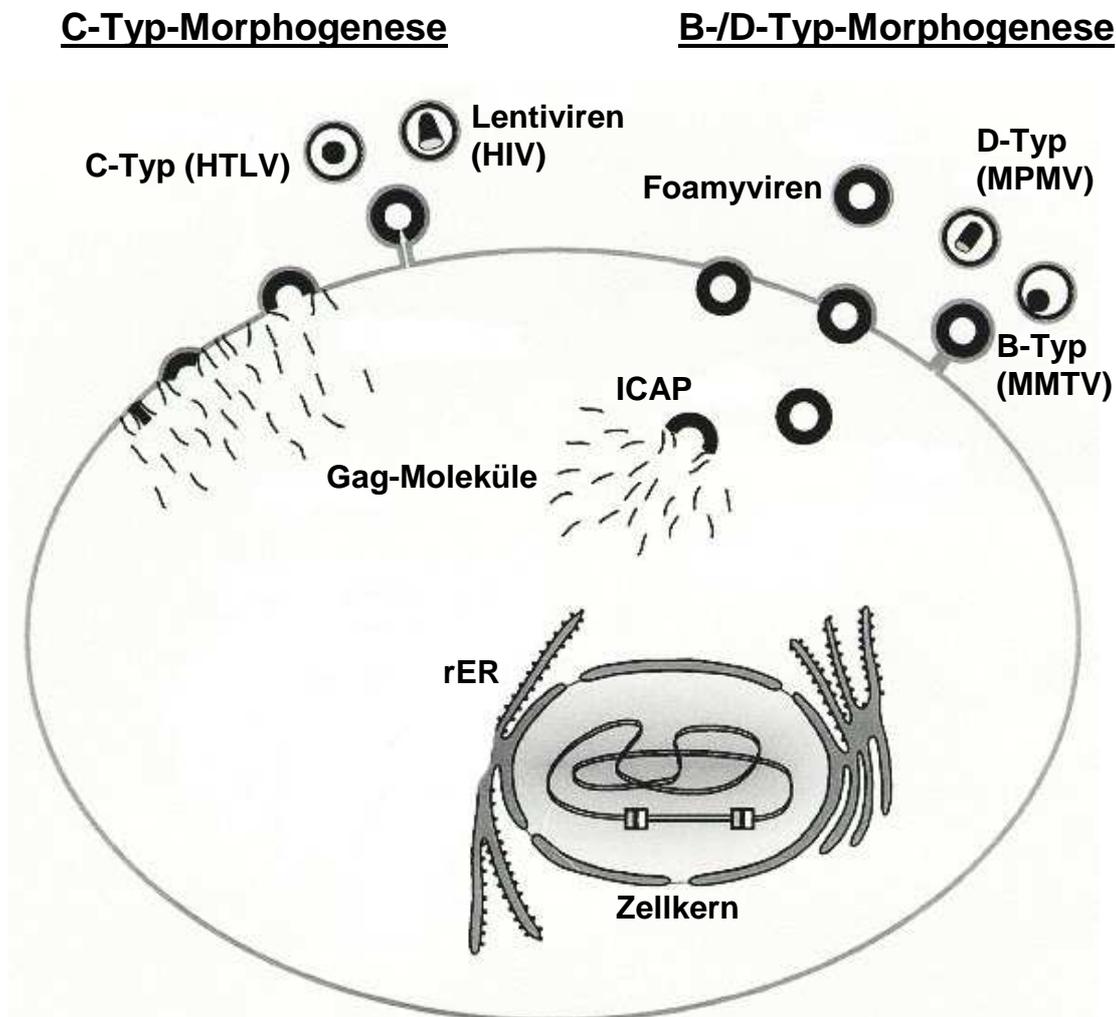


Abb. 4: Strategien der retroviralen Partikelmorphogenese mit charakteristischen Vertretern; HTLV: humane T-Zell-Leukämieviren, HIV: humane Immundefizienzviren, MPMV: Mason-Pfizer-Affenvirus, MMTV: Maus-Mammatumor-Virus, ICAP: intrazytoplasmatische A-Typ-Partikel (verändert nach Swanstrom und Wills, 1997)

1.2.6. Die Rolle des Gag-Proteins während der foamyviralen Partikelmorphogenese

FV verfolgen eine ähnliche Assembly-Strategie wie B- und D-Typ-Retroviren. Auch bei ihnen findet der Kapsidzusammenbau im Zytoplasma statt, jedoch buddet die Kapside wie bereits erwähnt hauptsächlich an intrazellulären Membranen und nur in Anwesenheit des homologen Env-Proteins (Baldwin et al., 1998, Fischer et al., 1998, Pietschmann et al., 1999). Im Folgenden soll die Rolle des PFV Gag-Proteins in den verschiedenen Stadien der Partikelmorphogenese beschrieben werden.

Einleitung

Nach Translation von Gag erfolgt über die GR-Box II, welche ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) enthält, ein transients Kernimport. Die Funktion dieses Imports ist nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise dient er dem Export der viralen genomischen RNA aus dem Zellkern über Bindung an die GR-Box I (Schliephake und Rethwilm, 1994). Für die Replikation scheint die GR-Box II jedoch entbehrlich zu sein (Yu et al., 1996).

Analog zum Gag-Protein von MPMV konnte auch in PFV Gag ein CTRS identifiziert werden, welches die Gag-Moleküle am MTOC konzentriert (Yu et al., 2006). Es erstreckt sich über die As 43 bis 60. Schon 2001 konnten Eastman und Linial zeigen, daß die Mutation der konservierten As R50 zu Alanin oder Tryptophan zu einem Assemblierungs- und Buddingdefekt führt, welcher selbst durch die Anwesenheit von Env nicht behoben werden kann. FV Gag-Proteine werden an ihrem N-Terminus nicht myristyliert und enthalten auch keine Abfolge basischer As, wie es bei Orthoretroviren der Fall ist. Dementsprechend ist bei ihnen nach Mutation bzw. Deletion des CTRS keine alternative Möglichkeit der Assemblierung vorhanden. Durch Anfügen eines Myristylierungssignals an den N-Terminus von Gag wird dieser Defekt aufgehoben, da die Gag-Moleküle gemäß einer C-Typ-Morphogenese an die Plasmamembran redirigiert werden, dort zu Kapsiden multimerisieren und buddieren (Eastman und Linial, 2001).

Für die Multimerisierung zu Kapsiden benötigen Gag-Proteine Interaktionsdomänen. Für PFV Gag konnte im Bereich zwischen den As 130 und 150 ein solches Motiv identifiziert werden (Tobaly-Tapiero et al., 2001, Cartellieri et al., 2005). Dieses enthält eine Abfolge mehrerer hydrophober As, welche α -Helices ausbilden, die wiederum zu einer Superhelix (coiled-coil-Motiv, cc-Motiv) verdrillt sind. Außer im Gag-Protein von Primaten-FV wurde ein solches Motiv auch in FFV Gag identifiziert, wohingegen für BFV sowie EFV Gag nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung eines C-C-Motivs in diesem Bereich festgestellt wurde (Tobaly-Tapiero et al., 2001). Daneben spielt ein konserviertes YEIL-Motiv (AS 464-467) eine wichtige Rolle beim korrekten Kapsidzusammenbau (Stange et al., 2005). Im N-Terminus von PFV Gag konnte ein weiteres cc-Motiv zwischen den AS 160 und 180 identifiziert werden, welches mit einem Bestandteil der leichten Kette von Dynein interagiert und so die Kapside nach Eintritt in die Wirtszelle an den Mikrotubuli entlang zum MTOC dirigiert (Petit et al., 2003, s. auch Kap. 1.2.4.). Dazu bilden die As 433-445 ein cc-Motiv mit bislang unbekannter Funktion aus (Dirk Lindemann, pers. Mitteilung).

Einleitung

Wie bereits erwähnt, enthält das N-terminale LP von PFV Env ein Motiv mit zwei konservierten Tryptophanresten, welches die für den Partikelexport notwendige Interaktion mit dem Gag-Protein vermittelt (Lindemann et al., 2001). Ein Env-interagierendes Motiv in PFV Gag konnte dagegen bisher noch nicht identifiziert werden. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die N-terminalen 297 As für eine Env-abhängige Freisetzung von partikelassoziiertem Gag ausreichend sind. Durch weitere Deletionsstudien konnte eine Interaktionsdomäne mit dem foamyviralen Glykoprotein auf die N-terminalen 100 As eingegrenzt werden (Cartellieri et al., 2005). Für die As 9-18 am N-Terminus von PFV Gag wurde zudem die Ausbildung eines cc-Motivs vorausgesagt (Dissertation Cartellieri, 2005).

Retroviren wie auch andere umhüllten Viren benötigen für die Abschnürung von zellulären Membranen sog. late-budding- (L-) Domänen in ihren Gag-Proteinen (Freed, 2002). In PFV Gag konnte ein PSAP-Motiv zwischen den As 284 und 287 mit einer L-Domänen-Funktion identifiziert werden (Stange et al., 2004). Dieses interagiert mit Tsg101, einer Komponente des sog. Endosomal sorting complex required for transport I (ESCRT- I). Dieser wiederum ist ein Bestandteil der class E vacuolar protein sorting (VPS) Maschinerie. Dabei handelt es sich um ein zelluläres Transport- und Sortierungssystem, welches die Endozytose oligoubiquitinerter zellulärer Proteine in ein multivesicular bodies (MVB) genanntes Vesikelsystem reguliert. Das Budding umhüllter Viren vollzieht sich dabei nach einem zur Endozytose zellulärer Proteine in das MVB analogen Mechanismus (Katzmann et al., 2002). Interessanterweise enthalten nur Gag-Proteine von FV aus Primaten ein solches PSAP-Motiv, in den Gag-Proteinen von BFV, EFV sowie FFV ist weder ein PSAP- noch ein PPXY-Motiv enthalten, welches in den Gag-Proteinen anderer Viren als L-Domäne fungiert (Stange et al., 2005). Auf die Rolle von Ubiquitin sowie von Lysinresten in retroviralen Gag-Proteinen während der Partikelfreisetzung wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen. Abb. 5 gibt eine Übersicht über das PFV Gag-Protein mit seinen bisher identifizierten Motiven.

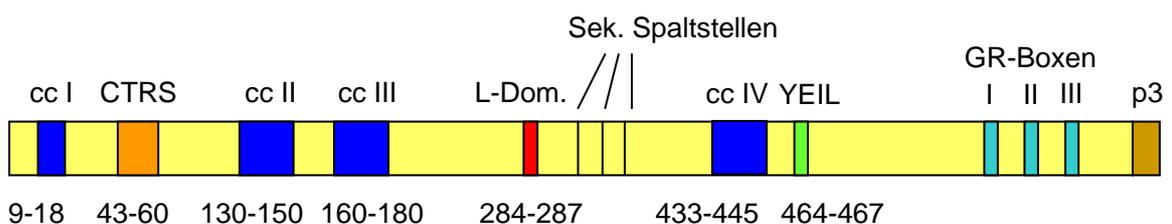


Abb. 5: Organisation des PFV Gag-Proteins; CTRS: cytoplasmic targeting/ retention signal ; cc: coiled-coil-Motiv

1.2.7. Die Rolle von Ubiquitin sowie von Lysinen in retroviralen Gag-Proteinen während des Buddings

Bisher sind vier Konsensussequenzen von L-Domänen in Retroviren identifiziert worden: ein P(T/S)AP-Motiv, welches ursprünglich in HIV-1 Gag beschrieben wurde (Göttlinger et al., 1991), ein PPXY-Motiv, welches zuerst in RSV Gag identifiziert wurde (Xiang et al., 1996), ein YPXL-Motiv im Gag-Protein des Virus der infektiösen Anämie des Pferdes (Puffer et al., 1997) sowie ein FPIV-Motiv im Matrixprotein eines Paramyxovirus (Schmitt et al., 2005). Für die jeweiligen L-Domänen sind verschiedene VPS-Komponenten als zelluläre Interaktionspartner identifiziert worden (Übersicht in Martin-Serrano, 2007). L-Domänen mit einem P(T/S)AP-Motiv interagieren mit Tsg101 (Martin-Serrano et al., 2001), solche mit einem PPXY-Motiv mit einer bestimmten Klasse von Ubiquitin-Ligasen (Freed, 2002), und solche mit einem YPXL-Motiv mit AIP1/ALIX, einem zellulären Protein, welches als Verbindung von ESCRT- I und - III fungiert (Strack et al., 2003). L-Domänen mit einem FPIV-Motiv interagieren ebenfalls mit der VPS-Maschinerie, jedoch konnte noch keine bestimmte Komponente davon als Interaktionspartner identifiziert werden (Schmitt et al., 2005).

Eine Rolle von Ubiquitin während des Buddings wurde erstmals aufgrund der Beobachtung in Erwägung gezogen, dass retrovirale Partikel unkonjugiertes Ubiquitin enthalten (Putterman et al., 1990, Ott et al., 1998). Zudem wurde eine Monoubiquitinierung von Lysinresten in den Gag-Proteinen von HIV-1, SIV sowie MLV festgestellt (Ott et al., 1998). Die Funktion dieser Modifikation von Lysinresten sowie von Ubiquitin selbst während der retroviralen Partikelfreisetzung ist bisher nicht eindeutig geklärt. Im Falle von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass die Mutation von zwei der L-Domäne benachbarten Lysinresten allein keine Auswirkung auf die Partikelfreisetzung hat. Dagegen führt die kumulative Mutation von Lysinen in weiteren HIV-1 Gag-Domänen zu einem Buddingdefekt (Gottwein und Kräusslich, 2005, Gottwein et al., 2006). Eine Monoubiquitinierung von RSV Gag konnte zwar nicht festgestellt werden, jedoch führt die Mutation von fünf der L-Domäne benachbarten Lysinresten ebenfalls zu einer stark verminderten Partikelfreisetzung. Dieser Defekt kann durch die Rückmutation schon eines Lysinrestes bzw. die Insertion neuer Lysine an anderen Positionen in Gag aufgehoben werden (Spidel et al. 2004). Möglicherweise findet eine transiente Gag-Ubiquitinierung statt, die jedoch

Einleitung

durch die Aktivität deubiquitinierender Enzyme wieder aufgehoben wird (Spidel et al. 2004). In scheinbarem Gegensatz dazu konnten Zhadina et al., 2007 an PFV Gag zeigen, dass eine ubiquitin-abhängige Partikelfreisetzung auch in der Abwesenheit jeglicher Ubiquitinakzeptoren in Gag vonstatten geht. PFV Gag enthält einen einzigen Lysinrest an Position 396. Wird an den N-Terminus von Gag ein Membranverankerungssignal angefügt, so hat eine Mutation dieses Lysins zu Arginin keine Auswirkung auf die Freisetzung von foamyviralen VLPs. Eine gleichzeitige Mutation des PSAP-Motives jedoch verhindert den zellulären Export von VLPs. Selbst nach einer Substitution des PSAP-Motives gegen ein PPXY-Motiv, welches eine Ubiquitinligase rekrutiert, bleiben Ubiquitinakzeptoren in Gag für das Budding von VLPs entbehrlich. Es wird daher vermutet, dass die Funktion von retroviralen L-Domänen in der Rekrutierung von Enzymen (z.B. Ubiquitinligasen) besteht, welche Komponenten der VPS Maschinerie ubiquitinieren, die wiederum die Abschnürung der Virionen von der Plasmamembran vermitteln (Zhadina et al. 2007). Ob eine Ubiquitinierung viraler Gag-Proteine eine funktionelle Notwendigkeit für die Partikelabschnürung ist oder als ein unspezifischer Nebeneffekt der Aktivität ubiquitinübertragender Enzyme angesehen werden kann, bleibt zu untersuchen. Ebenso ist unklar, welche Funktion Lysine in der Nähe von L-Domänen während des Buddings übernehmen, unabhängig davon, ob sie ubiquitiniert werden, wie für HIV-1 gezeigt, oder nicht, wie im Falle von RSV.

1.2.8. Vergleich des Lysingehaltes retroviraler Gag-Proteine

Orthoretrovirale Gag-Proteine enthalten vergleichbare Anteile an Lysinen und Argininen, welche im Mittel in etwa dem Anteil dieser As in einem durchschnittlichen eukaryontischen Gen entsprechen (Bender et al., 2003). Bei Vergleich mit der durchschnittlichen Aminosäureverteilung foamyviraler Gag-Proteine fällt auf, dass diese einen äußerst geringen Lysinanteil aufweisen (s. Tab. 3). Während SFVspm Gag vier Lysine und SFVcpz Gag zwei Lysine enthalten, ist in den Gag-Proteinen von PFV, SFVora, SFVgor sowie EFV nur ein einziger Lysinrest vorhanden. Die Gag-Proteine aller anderen FV-Isolate außer von FFV sowie SFVmar enthalten keinen Lysinrest. Eine Ausnahme stellen FFV Gag mit acht Lysinen (1,6 % der gesamten As) sowie SFVmar Gag mit sechs Lysinen (1,0 % der gesamten As) dar. Der überwiegende Anteil basischer As wird durch Arginin vertreten. Im Core-Protein der

Einleitung

Hepadnaviren, welches eine Reihe von Homologien zu FV Gag-Proteinen aufweist, sind sowohl Lysine als auch Arginine vertreten, wenngleich letztere aufgrund des Arginin-reichen C-Terminus dominieren (Datenbank NCBI, Accession-Code X85262).

Orthoretrovirus	Länge Gag (As)	Anz. Lysine	% Lysine	Anz. Arginine	% Arginine
HIV-1	492	39	7,9	28	5,7
HIV-2	521	39	7,5	36	6,9
MPMV	657	58	8,8	22	3,3
MMTV	591	61	10,3	28	4,7
MLV	538	31	5,8	50	9,3
HTLV	429	20	4,7	21	4,9
Mittel			7,5		5,8
Foamyvirus	Länge Gag (As)	Anz. Lysine	% Lysine	Anz. Arginine	% Arginine
PFV	648	1	< 0,2	64	9,9
SFVcpz	653	2	0,3	60	9,2
SFVgor	644	1	< 0,2	61	9,5
SFVora	625	1	< 0,2	60	9,6
SFVmac	647	0	0	56	8,7
SFVagm	643	0	0	57	8,9
SFVspm	624	4	0,6	49	7,9
SFVmar	613	6	1,0	48	7,8
FFV	514	8	1,6	46	8,9
BFV	544	0	0	48	8,8
EFV	559	1	< 0,2	50	8,9
Mittel			0,4		8,9
HBV core	185	3	1,6	23	12,4
Mittel eukar. Gen ¹⁾			6,0		5,2

Tab. 3a: Durchschnittliche Anteile von Lysinen und Argininen in retroviralen Gag-Proteinen. ¹⁾ Bender et al., 2003.

Im Gegensatz dazu weisen die Pol- sowie Env-Proteine von Orthoretroviren und FV ähnliche Anteile an Lysinen und Argininen auf (s. Tab. 3b).

Subfamilie	Pol		Env	
	% Lysine	% Arginine	% Lysine	% Arginine
Orthoretroviren	6,6	4,6	4,4	4,7
Foamyviren	8,1	3,5	6,1	4,5

Einleitung

Tab. 3b (vorhergehende Seite): Durchschnittliche Anteile von Lysinen und Argininen in retroviralen Pol- und Env-Proteinen

Für die Translation von Argininen stehen sechs Kodons zur Verfügung: CGG, CGA, CGC, CGU, AGG sowie AGA. Lysine werden von AAG und AAA kodiert. Eine Mutation der jeweils zweiten Base dieser Lysin-Kodons würde demnach in einer Substitution von Lysin gegen Arginin resultieren. Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die Verwendung der jeweiligen Kodons für die Translation von Argininen.

Orthoretrovirus	CGG	% CGG	CGA	% CGA	CGC	% CGC	CGU	% CGU	AGG	% AGG	AGA	% AGA
HIV-1	1	3,6	0	0	0	0	0	0	13	46,4	14	50
HIV-2	2	6,1	2	6,1	1	3,0	0	0	9	27,2	22	61,1
MPMV	2	9,1	1	4,5	2	9,1	4	18,2	2	9,1	11	50
MMTV	0	0	1	3,6	1	3,6	2	7,1	10	35,7	14	50
MLV	5	10,0	6	12,0	8	15,7	6	12,0	10	20,0	15	30,0
HTLV	7	33,3	4	19,0	5	23,8	4	20,0	1	5,0	0	0
Mittel		10,4		7,5		9,2		9,6		23,9		40,2
Foamyvirus	CGG	% CGG	CGA	% CGA	CGC	% CGC	CGU	% CGU	AGG	% AGG	AGA	% AGA
PFV	1	1,6	10	15,6	4	6,3	8	12,5	7	10,9	34	53,1
SFVcpz	2	3,3	12	20,0	4	6,7	5	8,3	7	11,7	30	50,0
SFVgor	4	6,6	13	21,3	0	0	10	16,4	9	14,8	24	39,9
SFVora	4	6,7	9	15,0	3	5,0	7	11,7	15	25,0	22	36,7
SFVmac	2	3,6	14	25,0	2	3,6	4	7,1	6	10,7	28	50,0
SFVagm	4	7,0	8	14,0	3	5,3	6	10,5	7	12,3	29	50,9
SFVspm	2	4,1	8	16,3	2	4,1	1	2,0	7	14,3	29	59,2
SFVmar	3	6,3	14	29,2	0	0	5	10,4	5	10,4	21	43,8
FFV	2	4,3	10	21,7	1	2,2	3	6,5	6	13,0	24	52,2
BFV	6	12,5	7	14,6	3	6,3	10	20,8	6	12,5	16	33,3
EFV	1	2,0	18	36,0	1	2,0	2	4,0	8	16,0	20	40,0
Mittel		5,3		20,8		3,8		10,0		13,8		46,3

Tab. 4: Verwendung von Arginin-Kodons für die Translation retroviraler Gag-Proteine

Der Anteil von AGG- und AGA-Kodons, welche über eine Einzelmutation aus Lysin-Kodons hervorgegangen sein könnten, beträgt in orthoretroviralen wie foamyviralen Gag-Proteinen etwas über 60 %. Während in Orthoretroviren dieser Basenaustausch und damit die Substitution von Lysin gegen Arginin in Gag nicht stattfand, war dies

Einleitung

bei FV offensichtlich der Fall. Im Laufe der Evolution der FV muß es somit einen positiven Selektionsdruck auf diese Mutanten gegeben haben. Dies wäre eine Erklärung für die Tatsache, dass der Gesamtanteil basischer As in orthoretroviralen und foamyviralen Gag-Proteinen vergleichbar ist, in FV Gag jedoch fast ausschließlich Arginine verwendet werden.

Mit der Ausnahme von MLV sowie HTLV weisen die Gag-Gene von Retroviren einen hohen A/T-Gehalt auf. Während der durchschnittliche A/T-Gehalt von Säugetiergenomen etwa 58 % beträgt (Vinogradov, 2007), ist der mittlere A/T-Gehalt orthoretroviraler Gag-Gene etwa 52%, derjenige foamyviraler Gag-Gene etwa 54 %. Eine Mutation von A zu G, wie sie für eine Substitution von Lysin gegen Arginin nötig ist, mußte somit gegen einen natürlichen Gradienten von G zu A-Mutationen im übrigen FV-Genom stattgefunden haben. Dies impliziert wichtige Funktionen der in den Gag-Proteinen angereicherten Arginine während des foamyviralen Replikationszyklus.

Orthoretrovirus	A/T-Gehalt %	Foamyvirus	A/T-Gehalt %
HIV-1	56	PFV	57
HIV-2	51	SFVcpz	56
MPMV	56	SFVgor	54
MMTV	57	SFVora	55
MLV	46	SFVmac	53
HTLV	44	SFVagm	54
Mittel	51,7	SFVspm	56
		SFVmar	55
		FFV	54
		BFV	49
		EFV	53
Mittel Säugergenom	58	Mittel	54,2

Tab. 5: A/T-Gehalt retroviraler *gag*-Gene

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Wie in Kap. 1.2.6. beschrieben, konnten Cartellieri et al. 2005 mittels Deletionsstudien zeigen, daß die N-terminalen 297 AAs von PFV Gag für eine Env-abhängige Freisetzung von partikelassoziiertem Gag ausreichend sind. Folglich muß ein Env-interagierendes Motiv in diesem Gag-Abschnitt lokalisiert sein. In dieser Arbeit wurde versucht, mittels eines chimären Konstruktes aus den Gag-Proteinen von MPMV und PFV ein Env-interagierendes Motiv sowie die für die Interaktion mit dem Glykoprotein essentiellen AAs zu identifizieren. Das MPMV MA-Protein enthält alle Informationen, welche für die Freisetzung von VLPs notwendig sind (Rhee und Hunter, 1987, Bryant und Ratner, 1990, Yuan et al., 1993, Stansell et al., 2007). Durch Substitution dieses N-terminalen Proteinabschnittes von MPMV Gag gegen die N-terminalen 303 AAs von PFV Gag wurden chimäre Kapside auf der Basis von MPMV Gag konstruiert, deren zellulärer Export PFV Env restringiert ist. Basierend auf diesen chimären Kapsiden wurde versucht, mittels Deletionsmutationen sowie eines Alaninscannings des PFV Gag-Abschnittes Motive und AAs zu identifizieren, die an einer Interaktion mit Env beteiligt sind. Die Anfertigung von Immunfluoreszenz- sowie elektronenmikroskopischen (EM-) Aufnahmen sollten Auskünfte über die intrazelluläre Lokalisation sowie die Morphologie chimärer Kapside geben, welche infolge einer Mutation keinen PFV Env-abhängigen zellulären Export mehr zeigten. Wie in Kap. 1.2.8. dargelegt, scheint im Laufe der foamyviralen Evolution ein positiver Selektionsdruck auf *gag*-Mutanten mit einer Lysin-zu-Arginin-Substitution vorhanden gewesen zu sein. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb der Frage nachgegangen, welche Funktionen Arginine in foamyviralen Gag-Proteinen während der Replikation übernehmen. Dazu wurde in infektiösen PFV- sowie FFV-Klonen mittels Punktmutation eine Reihe von Argininen gegen Lysine substituiert. Zusätzlich wurde das singuläre Lysin in PFV Gag gegen Arginin substituiert. Das Replikationsverhalten dieser Mutanten wurde hinsichtlich ihres Titors, ihres Nukleinsäuregehaltes, dem Zeitpunkt der reversen Transkription sowie der Env-Abhängigkeit des zellulären Exportes untersucht. Zudem wurden die mutierten Gag-Proteine hinsichtlich einer möglichen Ubiquitinierung der zusätzlichen Lysine untersucht. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Replikationsfähigkeit verschiedener Substitutionsmutanten in der Gegenwart von IFN- (Interferon-) α und γ .

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Applichem, MBI Fermentas, Hartenstein, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.2. Enzyme und Reaktionspuffer

CIAP (calf intestine alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
Pwo-Polymerase	Peqlab
Restriktionsenzyme	NEB, MBI Fermentas
Ribonuklease A	MBI Fermentas
RQ1-Dnase	Promega
Dnase I	MBI Fermentas
SP6 RNA-Polymerase	MBI Fermentas
10x Transkriptionspuffer	MBI Fermentas
M-MLV RT RNase H ⁻ , Punktmutante	Promega
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas

2.1.3. Größen- und Längenstandards

Proteingrößenstandard	
Angefärbter Proteinmarker	MBI Fermentas
DNA-Längenstandards	
Low-range Marker	MBI Fermentas
λ-HindIII Marker eigene Herstellung	
λ-PstI Marker eigene Herstellung	

Material und Methoden

2.1.4. Antibiotika

	Stammlösung	Arbeitsverdünnung
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	20 mg/ml	20 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	10 mg/ml	10 µg/ml
Neomycin (G 418)	100 mg/ml	100 µg/ml
Zeocin	100mg/ml	100 µg/ml

2.1.5. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17 supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>)U169	Invitrogen
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lacproAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIqZ</i> ΔM15]	Stratagene
<i>E.coli</i> TOP10	F-, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> ,	Invitrogen

2.1.6. Zelllinien

Stamm	Beschreibung	Referenz
HEK 293T	humane Nierenzellen, die das große T-Antigen von SV40 stabil exprimieren	ATCC: CRL-11268

Material und Methoden

BHK/LTR(PFV) <i>lacZ</i>	BHK-21-Zelllinie mit einem stabil integrierten <i>lacZ</i> -Gen unter Kontrolle des PFV-LTR Promotors, Selektion mit 1 mg/ml G418	Schmidt und Rethwilm 1995
CrFK/LTR(FFV) <i>lacZ</i>	Crandell-Feline-Kidney-Zellen mit einem stabil integrierten <i>lacZ</i> -Gen unter Kontrolle des FFV-LTR-Promotors, Selektion mit 0,4 mg/ml Zeocin	Bock <i>et al.</i> , 1998
HT1080	Humane Fibrosarkomzelllinie	ATCC: CCL-121
MRC-5	Primäre humane Lungenfibroblastenzelllinie	ECACC: PDL 31, Charge: Lot. 01/E/014

2.1.7 Antikörper

Maus- α -PFV Gag SGG1 Hybridomaüberstand (Heinkelein et al. 2002a) 1:200

Kaninchen- α -PFV Gag 122 Polyklonales Serum (Aguzzi et al., 1993) 1:200

Kaninchen- α -PFV Gag Polyklonales Serum, Baculo 1:1000

Maus- α -PFV Env SU P3E10 Hybridomaüberstand (Duda et al. 2004) 1:10

Kaninchen- α -FFV Gag 1-514 Polyklonales Serum (Roy et al., 2003) 1:1000

Kaninchen- α -MPMV p27 polyklonales Serum (Gottwein et al., 2003) 1:1000

Maus- α -VSV-G I.1 monoklonaler Antikörper (Lefrancois und Lyles, 1982) 1:100

Kommerzielle Antikörper:

Kaninchen- α -GAPDH polyklonales Serum (Sigma) 1:1000

Kaninchen- α -EGFP polyklonales Serum (Sigma) 1:3000

Kaninchen- α -HA polyklonales Serum (Sigma) 1:400

Schwein- α -Kaninchen IgG-FITC Polyklonaler Antikörper (Dako) 1:40

Ziege- α -Maus IgG-Cy3 (Dianova) 1:500

Material und Methoden

Ziege- α -Maus IgG-HRP Polyklonaler Antikörper (Dako) 1:2000

Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Polyklonaler Antikörper (Dako) 1:2000

2.1.8. Plasmide

Proviruskonstrukte:

Plasmidname	Beschreibung
pczHSRV2	Expressionsplasmid für ein CMV-Promotor getriebenes PFV Provirus (Moebes et al. 1997)
pChatul-3	Expressionsplasmid für ein CMV-Promotor getriebenes FFV Provirus (Roy et al., 2003)
pSARM4	Expressionsplasmid für ein CMV-Promotor getriebenes MPMV Provirus (Song und Hunter, 2003)

Weitere verwendete Plasmide:

Plasmidname	Beschreibung
pCIgag2	Expressionplasmid für PFV Gag, CMV Promotor getrieben (Heinkelein et al., 2002a)
pCpol2	Expressionplasmid für PFV Pol, CMV Promotor getrieben (Heinkelein et al., 1998)
pCenv1	Expressionplasmid für PFV Env, CMV Promotor getrieben (Fischer et al., 1998)
pTW01	PFV Vektor mit EGFP Marker (Wiktorowicz et al., 2009)
pco PE WT	Kodon-optimiertes Expressionplasmid für PFV Env, CMV Promotor getrieben (D. Lindemann, unveröffentlicht)
pco PE 01 Ubi-	Kodon-optimiertes Expressionplasmid für PFV Env, mit K14,15,18,34,53R-Mutation, CMV Promotor getrieben (D. Lindemann, unveröffentlicht)
pczVSV-G wt	Expressionsplasmid für VSV-G, CMV Promotor getrieben (Pietschmann et al., 1999)

Material und Methoden

pMD2.G	Expressionsplasmid für VSV-G, CMV Promotor getrieben (Addgene Plasmid Nr. 12259 / Trono, D.)
pWPXL	HIV Vektor mit EGFP Marker (Addgene Plasmid Nr. 12257 / Trono, D.)
psPAX2	HIV Gag/Pro/Pol-Expressionsplasmid, CMV Promotor getrieben (Addgene Plasmid Nr. 12260 / Trono, D.)
pBJ5	Expressionplasmid für HA-Ubiquitin-Fusionsprotein, SR α Promotor getrieben (Strack et al., 2002)
TOPO pCR $\text{\textcircled{R}}$ II	Plasmid mit T7-/ SP6-Promotor zur <i>in vitro</i> -Transkription (Invitrogen)
pEGFP-N1, pEGFP-C2	EGFP-Expressionsplasmide, CMV Promotor getrieben (BD Biosciences Clontech)
pcDNA3.1	Expressionsvektor mit SV40 ori und CMV-Promotor/Enhancer mit Zeocin bzw. Neomycin Resistenz (Invitrogen)

2.1.9. Oligonukleotide

Gegenüber der Ursprungssequenz veränderte Nukleotide sind unterstrichen.

Nr.	5'-3' Sequenz	Bemerkung
4076	aggttcctactgttgatccc	Sense-Klonierungsprimer für pDM1 sowie alle Alaninmutanten davon, bindet in pSARM4 5' vom <i>gag</i> -ORF
4079	attaatctgttcctctaattgagc	Antisense-Klonierungsprimer für pDM1, bindet in pSARM4 im <i>gag</i> -ORF
4098	aaaattccatgacaattggcg	Sequenzierprimer für den PFV <i>gag</i> ORF, sense
4099	taaaccctcatacaatgtttatg	Sequenzierprimer für den PFV <i>gag</i> ORF, sense
4147	tcctattatgt <u>ggatcc</u> cacc	Sense-Klonierungsprimer mit BamHI-Schnittstelle für pDM1 und pDM2, bindet in pSARM4 im <i>pol</i> -ORF
4148	ata <u>ctcgag</u> tcactccctggattgg	Antisense-Klonierungsprimer mit XhoI-

Material und Methoden

		Schnittstelle für pDM1 und pDM2, bindet in pSARM4 im <i>pol</i> -ORF
4149	ttactcgagcacctcccctgtgag	Sense-Klonierungsprimer mit XhoI-Schnittstelle für pDM1 und pDM2, bindet in pSARM4 5' des CTE
4150	atgggcccactgtcccgaccgc	Antisense-Klonierungsprimer mit ApaI-Schnittstelle für pDM1 und pDM2, bindet in pSARM4 3' der 3' LTR
4151	aatctcgagatgaactcaattatcattc	Sense-Klonierungsprimer mit XhoI-Schnittstelle für pDM38, bindet in pSARM4 5' vom <i>env</i> -ORF
4152	ttgggcccgccaagacatcatccggg	Antisense-Klonierungsprimer mit ApaI-Schnittstelle für pDM38, bindet in pSARM4 3' des CTE
4153	tcacctcaagggaacttc	Sequenzierprimer für pDM1 und pDM2, sense
4154	acagaatagctcaattaatcctc	Sequenzierprimer für pDM1 und pDM2, sense
4155	atggccgcatatactcttac	Sequenzierprimer für pDM1 und pDM2, sense
4156	ttaagacttatgtttaacattc	Sequenzierprimer für pDM1 und pDM2, sense
4157	aggaatagttgaaagagcccac	Sequenzierprimer für pDM1 und pDM2, sense
4158	agagagtgacatttctcactaac	Sequenzierprimer für pDM1 und pDM2, sense
4159	actctcttacaactgtttcttg	Sequenzierprimer für pDM38, sense
4160	tttgagggaattgcacaggtcg	Sequenzierprimer für pDM38, sense
4161	aaacagctcggtttttgtatgc	Sequenzierprimer für pDM38, sense
4162	aggaaaaatgtgtttctacgcc	Sequenzierprimer für pDM38, sense
4167	tggcttaattctgccccacatc	Antisenseprimer für pSARM4, mutiert Startcodon von MPMV Gag zu GTG
4168	tcggatgtgggcaagaattaagc	Senseprimer für pSARM4, mutiert Startcodon von MPMV Gag zu GTG

Material und Methoden

4175	ttgattttgtgctagctactgtccttg	Senseprimer für den MPMV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 38-41 ein
4176	accaaggacaagtagctagcacaaaaatc	Antisenseprimer für den MPMV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 38-41 ein
4180	attatgctagcatggcttcaggaagtaatg	Antisense-Klonierungsprimer für pDM1 mit NheI-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 5' von Gag
4181	tatatcttaagcgtgccaatcggtggtg	Antisense-Klonierungsprimer für pDM1 mit AflII-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4182	tatttcttaaggtaaccacacaagtaatgg	Sense-Klonierungsprimer für pDM1 mit AflII-Schnittstelle, bindet in pSARM4 im <i>gag</i> -ORF
4183	aatataggatccaaaacttcctgtgc	Antisense-Klonierungsprimer für pDM1 mit BamHI-Schnittstelle, bindet in pSARM4 im <i>pol</i> -ORF
4204	atatacttaagcattgttactggctgtaag	Antisense-Klonierungsprimer für pDM6 (Δ C132) mit AflII-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4205	atatacttaagtactgggtgctcgagaacg	Antisense-Klonierungsprimer für pDM5 (Δ C197) mit AflII-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4206	ttaaccttaagcgtgccaatc	Antisense-Klonierungsprimer für alle Alaninmutanten von pDM1, bindet in pMD1 im Übergang vom PFV <i>gag</i> -ORF zum MPMV <i>gag</i> -ORF
4207	aacattagctgctgcagccatgc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (SGS)3-5(AAA) Mutation ein
4208	tagcatggctgcagcagctaatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (SGS)3-5(AAA) Mutation ein
4209	tcatattctgcagcagcacttctg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (NVE)6-8(AAA) Mutation ein
4210	tcaggaagtgctgctgcagaatag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF,

Material und Methoden

		führt (NVE)6-8(AAA) Mutation ein
4211	tcaagtgcagctgcttcaacattac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (EYE)9-11(AAA) Mutation ein
4212	agtaatgttgaagcagctgcacttg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (EYE)9-11(AAA) Mutation ein
4213	ttcttcagcagcagcttcatattcttc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (LDV)12-14(AAA) Mutation ein
4214	tgaagaatatgaagctgctgctgaag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (LDV)12-14(AAA) Mutation ein
4215	acaacagcagctgcaacatcaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (EAL)15-17(AAA) Mutation ein
4216	acttgatgttgagctgctgttg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (EAL)15-17(AAA) Mutation ein
4217	atctcttaaagctgcagccagagc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (VVI)18-20(AAA) Mutation ein
4218	aagctctggctgcagctttaagag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (VVI)18-20(AAA) Mutation ein
4219	tggtatatttctagctgctgcaattac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (LRD)21-23(AAA) Mutation ein
4220	tgtaattgcagcagctagaaatatacc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (LRD)21-23(AAA) Mutation ein
4221	aaggatttcttggtgcagctgcatctc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (RNI)24-26(AAA) Mutation ein
4222	taagagatgcagctgcaccaagaaatc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (RNI)24-26(AAA) Mutation ein
4223	tccatgtaaaggagctgctgctatatttc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (PRN)27-29(AAA) Mutation ein
4224	agatagaaatatagcagcagctcctttac	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (PRN)27-29(AAA) Mutation ein
4225	taacttctccagctgcagcatttcttg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (PLH)30-32(AAA) Mutation ein
4226	ataccaagaaatgctgcagctggagaag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (PLH)30-32(AAA) Mutation ein
4295	ttgaagctaagtgttgaattttaag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF,

Material und Methoden

		führt L17S Mutation ein
4296	tctcttaa <u>aattacaacac</u> tagcttc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L17S Mutation ein
4297	agatggtacgtg <u>caatagcaca</u> agatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L56,58A Mutation ein
4298	tcatcatctt <u>gtgctattgc</u> acgtacc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L56,58A Mutation ein
4341	atata <u>cttaagag</u> ggtcattatcatcattttg	Antisense-Klonierungsprimer für pDM7 (Δ C65) mit AflII-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4342	tatat <u>gctagcat</u> gtaagagatagaaatatacc	Sense-Klonierungsprimer für pDM3 (Δ 2-20) mit NheI-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4343	ttat <u>accggt</u> tagggttacagctcggtg	Antisense-Klonierungsprimer für pDM4 (Δ 80-120) mit AgeI-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4344	tataa <u>accggt</u> gaccttatagtagttcttac	Sense-Klonierungsprimer für pDM4 (Δ 80-120) mit AgeI-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4345	acctatagctgctgcatgtaaagg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (GEV)33-35(AAA) Mutation ein
4346	tcctttacatg <u>cagcag</u> ctatagg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (GEV)33-35(AAA) Mutation ein
4347	ttcagtaaggcgag <u>cagctg</u> caacttc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (IGL)36-38(AAA) Mutation ein
4348	tggagaagttg <u>cagctg</u> ctgccttac	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (IGL)36-38(AAA) Mutation ein
4352	agcttcaacatcag <u>ctt</u> catattc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L12A Mutation ein
4353	agaatatgaag <u>ctgat</u> gttgaagc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L12A Mutation ein
4354	accagagcttcaacagcaagttc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt D13A Mutation ein

Material und Methoden

4355	atgaacttgctgttgaagctctg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt D13A Mutation ein
4356	acaaccagagcttcagcatcaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt V14A Mutation ein
4357	acttgatgctgaagctctgggtg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt V14A Mutation ein
4358	acaaccagagctgcaacatcaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt E15A Mutation ein
4359	acttgatgttgagctctgggtg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt E15A Mutation ein
4366	acctataacttctgcatgtaaagg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt G33A Mutation ein
4367	atcctttacatgcagaagttatag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt G33A Mutation ein
4368	acctataactgctccatgtaaagg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt E34A Mutation ein
4369	atcctttacatggagcagttatag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt E34A Mutation ein
4370	agacctatagcttctccatgtaaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt V35A Mutation ein
4371	tcctttacatggagaagctatagg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt V35A Mutation ein
4372	aggcgaagacctgcaacttctcc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt I36A Mutation ein
4373	acatggagaagttgcaggtcttc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt I36A Mutation ein
4374	aggcgaagagctataacttctcc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt G37A Mutation ein
4375	acatggagaagttatagctcttc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt G37A Mutation ein
4376	ttcagtaaggcgagcacctataac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L38A Mutation ein
4377	agaagttataggtgctcgcttac	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L38A Mutation ein

Material und Methoden

4392	acaattggcgcccaacgtg	Sense-Klonierungsprimer, bindet in pczHSRV2 an PBS
4393	tcctccttgatttaaattatcttg	Antisense-Klonierungsprimer, bindet in pczHSRV2 im <i>gag</i> -ORF
4402	atcaactatgcctcttattacatttc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt K396R Mutation ein
4403	tggaaatgtaataagaggcatagttg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt K396R Mutation ein
4404	atttcttggtatattctatctc	Sequenzierprimer für den PFV <i>gag</i> ORF, antisense
4405	accttatttattagaacccatggaac	Sequenzierprimer für den PFV <i>gag</i> ORF, sense
4423	accatcctgcagcagcggcaagacc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (RLTE)39-42(AAAA) Mutation ein
4424	aggctctgccgctgctgcaggatgg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt (RLTE)39-42(AAAA) Mutation ein
4427	accatccttcagtaagggcaagac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R39A Mutation ein
4428	aggctctgcccttactgaaggatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R39A Mutation ein
4429	accatccttcagtagcgcgaagac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L40A Mutation ein
4430	aggctcttcgcgctactgaaggatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L40A Mutation ein
4431	accatccttcagcaaggcgaagac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt T41A Mutation ein
4432	aggctcttcgccttgctgaaggatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt T41A Mutation ein
4433	accatcctgcagtaaggcgaagac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt E42A Mutation ein
4434	aggctcttcgccttactgcaggatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt E42A Mutation ein
4435	tggtatattttatcttttaaattac	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R22,24K Mutation ein

Material und Methoden

4436	tgtaattttaaaagataaaaatataacc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R22,24K Mutation ein
4437	agctaattgtttttaagagctttag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R169,172,173K Mutation ein
4438	actaaagctcttaaaaacaattagc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R169,172,173K Mutation ein
4439	agactgggatttaggttatg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R266,268K Mutation ein
4440	tcataaacctaatcccagtc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R266,268K Mutation ein
4445	aggaagaatttccttcttctttctttag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R272,274,275,276K Mutation ein
4446	tctaaagaaaagaagaaggaaattcttc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R272,274,275,276K Mutation ein
4447	ttaaattacaaccagagcttcaac	Sequenzierprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, antisense
4449	acctcatatttaggttctgtaaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R68,70K Mutation ein
4450	acctttacagaaacctaayatagagg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R68,70K Mutation ein
4453	agtacatctacgtattagtcacg	Sense-Klonierungsprimer, bindet in pChatul-3 im CMV-Promotor
4454	tactcctgccagttcatgctg	Antisense-Klonierungsprimer, bindet in pChatul-3 im <i>gag</i> -ORF
4455	aggctcctctgtaaattgacagc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R32K Mutation ein
4456	tgctgtcaaatctacaggaggacc	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R32K Mutation ein
4457	actctagtcatttatcacctgg	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R43K Mutation ein
4458	tccaggtgataatggactagag	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R43K Mutation ein
4459	tgctatcaagatatcctcttcag	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R74K Mutation ein

Material und Methoden

4460	atctga <u>a</u> gaggatcttgatag	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R74K Mutation ein
4461	aggcagttttattaaattatacgg	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R87K Mutation ein
4462	accgtataatttaataa <u>a</u> aactgcc	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R87K Mutation ein
4463	accatgttttcaggctcttggc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R97,101K Mutation ein
4464	tgcca <u>a</u> ggacctgaaa <u>a</u> catgg	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R97,101K Mutation ein
4465	tctccaggctgtaatttgccatc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R109K Mutation ein
4466	agatggca <u>a</u> attacagcctggag	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R109K Mutation ein
4467	tcgtaacaattttatctcatttttagc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R139,143K Mutation ein
4468	tgcta <u>a</u> aatgagataa <u>a</u> attgttacg	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R139,143K Mutation ein
4469	acctccaactgttaacttctgtaagg	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R151K Mutation ein
4470	agccttacaga <u>a</u> gttacaagttggag	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R151K Mutation ein
4471	tgctcctggtataggtttacc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R159K Mutation ein
4472	tgggta <u>a</u> acctataaccaggagc	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R159K Mutation ein
4473	attaccaataactgac <u>t</u> taagatg	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R182K Mutation ein
4474	taatcatctta <u>a</u> gtcagttattgg	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R182K Mutation ein
4475	tcaatagcggctgtagat <u>t</u> tcc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R201K Mutation ein
4476	tgga <u>a</u> aatctacagccgctattg	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R201K Mutation ein

Material und Methoden

4477	aggcattaactaccttcatacggg	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R220K Mutation ein
4478	accggtatgaaggtagtaatgcc	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt R220K Mutation ein
4479	tgtatcatatgcccaagtagcg	Sequenzierprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, sense
4480	acctccaactgtaacctctg	Sequenzierprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, antisense
4481	tgccctttggacttagagcctg	Sequenzierprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, sense
4486	tatata <u>agctt</u> gaaatagccctgggtgttactg	Sense-Klonierungsprimer für pDM40 mit HindIII-Schnittstelle, bindet in pChatul-3 im <i>pol</i> -ORF
4487	ttatt <u>ctcgag</u> tatcctgtgtataactagc	Antisense-Klonierungsprimer für pDM40 mit XhoI-Schnittstelle, bindet in pChatul-3 im <i>pol</i> -ORF
4488	tgaatagccctgggtgttactg	Senseprimer für die FFV real-time-PCR, bindet im <i>pol</i> -ORF
4494	accaaga <u>aattc</u> atggcttcaggaagtaatg	Senseklonierungsprimer für sämtliche pC1gag2 Mutanten mit EcoRI-Schnittstelle, bindet 5' vom PFV <i>gag</i> -ORF
4495	attaaggcctaaaattcatatacag	Antisenseklonierungsprimer für sämtliche pC1gag2 Mutanten, bindet im PFV <i>gag</i> -ORF
4496	tgttcttactgacatccacttg	Sequenzierprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, sense
4497	acagtattgttgacacgtcttc	Senseprimer für die PFV real-time-PCR, bindet im <i>pol</i> -ORF
4499	atata <u>agctt</u> acagtattgttgacacg	Sense-Klonierungsprimer für pDM39 mit HindIII-Schnittstelle, bindet in pczHSRV2 im <i>pol</i> -ORF
4500	atata <u>ctcgag</u> agtctctgttctggaac	Antisense-Klonierungsprimer für pDM39 mit XhoI-Schnittstelle, bindet in

Material und Methoden

		pczHSRV2 im <i>pol</i> -ORF
4505	taagagatactatatatcctgcttc	Antisenseprimer für die FFV real-time-PCR, bindet im <i>pol</i> -ORF
4507	agatactacatatcctgcctgtag	Antisenseprimer für die PFV real-time-PCR, bindet im <i>pol</i> -ORF
4513	taaggagaagctatcacttctgc	Antisenseprimer für die PFV Gag-Amplifikation aus Virionen-DNA, bindet im <i>pol</i> -ORF
4514	tcttttaataggtgttcaccttc	Antisenseprimer für die nested PCR zur PFV Gag-Amplifikation aus Virionen-DNA, bindet im <i>pol</i> -ORF
4515	aaggaggatataatcttcgac	Sequenzierprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, sense

2.1.10. Bioinformatik

Für die Sequenzauswertungen der retroviralen Strukturproteine sowie des HBV Core-Proteins wurde die Datenbank NCBI herangezogen. Dabei wurden nachfolgend aufgeführte Accession-Codes verwendet. Die SloEFV-Konsensussequenz wurde der Veröffentlichung von Katzourakis et al., 2009 entnommen.

Virus	Accession-Code	Virus	Accession-Code
HIV-1	AY046058.1	SFVora	AJ544579
HIV-2	NC_001722.1	SFVmac	NC_010819.1
MPMV	NC_001550.1	SFVagm	NC_010820.1
MMTV	AF228552.1	SFVspm	EU010385
MLV	AF033811	SFVmar	GU356395
HTLV	NC_001436.1	FFV	AJ564746
PFV	Y07724	BFV	AY134750.1
SFVcpz	NC_001364.1	EFV	NC_002201.1
SFVgor	HM245790	HBV	X85262

Material und Methoden

2.1.11. Kits

Big Dye ^R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
ECL TM Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
GenElute TM PCR Purification Kit	Sigma
GenElute TM Gel Extraction Kit	Sigma
NucleoBond ^R PC500	Macherey-Nagel
QIAamp ^R MinElute ^R Virus Spin Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
QuantiFast TM SYBR Green PCR Kit	Qiagen

2.1.12. Sonstige Materialien

AZT (Retrovir)	GlaxoSmithKline
Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Bovines Serumalbumin (BSA)	NEB
BrightStar TM -Plus Nylonmembran	Ambion
Desoxynukleotid-Mix (dNTPs)	MBI Fermentas
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen Corporation (Gibco)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrome AG
G418	Invitrogen Corporation (Gibco)
Hybond TM -ECL TM Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences
Penicillin	Invitrogen Corporation (Gibco)
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
Polyallomer Ultrazentrifugentubes	Beckmann
Rekombinante humane Interferone α , γ	Peptotech
Röntgenfilme X-ray Retina	XBD Fotochemische Werke GmbH
Sterilfilter (0,22 μ m, 0,45 μ m)	Schleicher & Schuell
Streptomycin	Invitrogen Corporation (Gibco)
Zeocin	Cayla

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, in kurzer Zeit große Mengen spezifischer DNA-Abschnitte herzustellen. Dies geschieht in Zyklen, welche aus drei sich wiederholenden Schritten bestehen. In einer Denaturierungsphase (1) wird zunächst die Matrizen-DNA durch eine hohe Temperatur (95°C) in Einzelstränge aufgeschmolzen. In der darauffolgenden Hybridisierungsphase (2) bindet ein Paar von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) bei geeigneter Temperatur über komplementäre Basenpaarung an die Zielsequenz. Dabei ist die gewählte Hybridisierungstemperatur abhängig vom spezifischen Schmelzpunkt, dem Grad der Basenpaarung wie auch von der Länge der Primer. In der Elongationsphase (3) synthetisiert eine thermostabile Polymerase (in dieser Arbeit Pwo-Polymerase) die Zielsequenz zwischen den Primern, wobei diese Polymerase pro Minute etwa 500 bp amplifiziert. Dieser Reaktionszyklus wird zwischen 30 und 35 Mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten Zielsequenz kommt. Durch Anfügen von Enzymschnittstellen an die Termini der Primer ist es möglich, die amplifizierten DNA-Abschnitte weiter zu klonieren. Weiterhin kann man durch Einfügen von Mutationen innerhalb der Primer und Klonierung der mutierten PCR-Produkte Mutagenesestudien durchführen. An die PCR schloß sich in dieser Arbeit die Aufreinigung des PCR-Produktes mit dem GenElute™ PCR Purification Kit (Sigma) oder im Falle unspezifischer Nebenbanden die Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel an. Nachfolgend ist exemplarisch ein PCR-Reaktionsansatz beschrieben.

200 pg Plasmid DNA

20 pmol sense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)

20 pmol antisense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)

5 µl 10 x Pwo Puffer komplett (mit MgCl₂)

1 µl dNTPs (10 mM)

2 µl Pwo-Polymerase (1U/µl)

Ad 50 µl Aqua_{dest}

Material und Methoden

Das Standardprogramm lautet wie folgt:

94°: 90 s (initiale Denaturierung)

94°: 15 s (Denaturierung)

50-65°: 45 s (Hybridisierung)

68°: 1 min/ 500 bp (Elongation)

→ 35 Zyklen

72°: 2 min (finale Elongation)

4°: ∞ (Abkühlungsphase)

Für die Einführung von Punktmutationen in eine DNA-Zielsequenz wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, bestehend aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen. In der ersten PCR wurden mittels je eines terminalen sowie eines mutagenen Primers zwei Einzelfragmente hergestellt, welche in einem Bereich von etwa 20 – 30 Nukleotiden überlappen. Der Überlappungsbereich wies die über die mutagenen Primer eingeführte Mutation auf. Anschließend erfolgte die Aufreinigung dieser beiden PCR-Fragmente mit dem GenElute™ PCR Purification Kit sowie die Ermittlung der DNA-Konzentration mittels eines Photometers bei 260nm. Nun wurden jeweils 50-100 ng PCR-Produkt als Template für eine zweite Reaktion eingesetzt, wobei während der ersten sechs Zyklen keine Primer zugesetzt wurden. Dabei kam es in der Hybridisierungsphase nicht nur zur homologen Paarung von Strang und Gegenstrang der beiden jeweiligen PCR-Fragmente, sondern auch zur Paarung von Strang und Gegenstrang im Überlappungsbereich der beiden PCR-Fragmente. Der ungepaarte Teil diente als Matrize für die DNA-Polymerase, sodaß DNA-Fragmente entstanden, die über die volle Länge beider Teilfragmente reichten:

94°C: 10 sec (Denaturierung)

50°C bis 65°C: 45 sec (Hybridisierung)

68°C: 1 min / 500 bp (Elongation)

→ 6 Zyklen

Durch anschließende Zugabe der terminalen Primer (je 20 pmol) wurde dieses DNA-Fragment im zweiten Teil der PCR exponentiell vermehrt:

Material und Methoden

94°C: 10 sec (Denaturierung)

50°C bis 65°C: 45 sec (Hybridisierung)

72°C: 1 min / 500 bp (Elongation)

→ 35 Zyklen

4° ∞ (Abkühlungsphase)

Anschließend erfolgte wiederum die Aufreinigung über das GenElute™ PCR Purification Kit.

2.2.2. Sequenzierung

MgCl₂-Puffer:

200 mM TRIS-HCl pH 9,0

5 mM MgCl₂

autoklaviert

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode von F. Sanger. In diese PCR werden neben dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt ein Primer, eine Polymerase, alle vier dNTPs sowie eine geringe Menge Didesoxynukleotide (ddNTPs), die jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, eingesetzt. Den Didesoxynukleotiden fehlt die 3'OH- Gruppe der Ribosegruppe, wodurch es nach deren Einbau zu einem Kettenabbruch des Strangsynthese kommt. Auf diese Weise werden DNA-Fragmente variabler Länge produziert, welche sich in ihren mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Basen am 3'-Ende unterscheiden. Mit einer speziellen Apparatur (z.B. ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer) werden die verschiedenen DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt, woraus sich die Basenabfolge ableiten lässt. In dieser Arbeit wurde zum Sequenzieren das Big DyeR Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet.

Der Reaktionsansatz lautete wie folgt:

0,5 µg DNA

3,3 pmol Primer

1 µl 5x mM MgCl₂-Puffer

1 µl BigDye Mix

ad 5 µl Aqua_{dest}

Material und Methoden

Thermocyclerprogramm:

95°: 20 s (Denaturierung)

50°: 15 s (Hybridisierung)

60°: 4 min (Elongation)

→ 25 Zyklen

4°: ∞ (Abkühlungsphase)

2.2.3. DNA-Agarosegelelektrophorese

Puffer und Lösungen:

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

2 M TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)

1 M 100% Essigsäure

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

6x Bromphenolblaupuffer für die Agarose-Gel-Elektrophorese:

0,25 % Natriumsalz-Bromphenolblau (BPB)

30 % Glyzerin (steril) in Aqua_{dest.}

Ethidiumbromid: 0,1 µg/ml Gel

Mittels der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld, wie in diesem Falle im Agarosegel, in Richtung Anode. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,6 – 2 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde eingewogen, in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Bromphenolblaupuffer vermischt, in die Taschen des Gels geladen und in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Kammer unter Anlegen einer Spannung von 60 – 105 mV aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren, wodurch die aufgetrennten Fragmente unter UV-Licht fluoreszieren und somit sichtbar gemacht werden können.

Material und Methoden

2.2.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des GenElute™ Gel Extraction Kits (Sigma). Mittels einer UV-Handlampe wurden die DNA-Fragmente unter schwachen UV-Licht (354 nm) sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Isolierung der DNA aus der Agarose nach Angaben des Herstellers.

2.2.5. Restriktionsverdau von DNA

Prokaryotische Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch, wobei die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym oft ein palindromischer Sequenzabschnitt ist. Durch die Spaltung entstehen entweder 5'- bzw. 3'- Überhänge (klebrige Enden) oder Enden ohne Überhang (glatte Enden). Restriktionsverdau wurden analytisch zur Überprüfung von Plasmiden anhand der resultierenden spezifischen Bandenmuster wie auch präparativ für anschließende Klonierungsschritte durchgeführt.

Typischer Restriktionsansatz:

	Analytisch	Präparativ
DNA	1 µg	5 - 10 µg
Puffer (10-fach)	2 µl	5 µl
Enzym (10 U/ µl)	0,5 µl	2 µl
	ad 20 µl Aqua _{dest}	ad 50 µl Aqua _{dest}

Die Durchführung des Restriktionsverdau (Pufferart und -menge, Enzymmenge, Inkubations-Temperatur und Zeit (1h bis über Nacht) erfolgte gemäß Herstellerangaben.

2.2.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Eine Religation linearisierter Plasmide kann die Effizienz der Ligation mit Fremd-DNA-Fragmenten erheblich verringern. Um dies zu verhindern, wurden die 5'-Enden

Material und Methoden

des Plasmids nach dem präparativen Restriktionsverdau mit Hilfe des Enzyms Alkalische Kälberdarmphosphatase (Calf intestine alkaline phosphatase/CIAP) dephosphoriliert. Dabei wurde dem Ansatz 1 µl CIAP (10 U/µl) beigefügt und dieser bei 37°C für 1h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der CIAP durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 5 mM) und Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten.

2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Insertion von Fremd-DNA-Molekülen (Inserts) in einen linearisierten Vektor erfolgt durch sog. Ligation. Dabei katalysiert die T4-DNA-Ligase in der Anwesenheit von ATP die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5´Phosphatende eines DNA-Moleküles (in diesem Falle des Inserts) mit dem 3´Hydroxyende des anderen (in diesem Falle des dephosphorylierten Vektors). Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ligation sowohl glatter als auch klebriger komplementärer Enden. Nach einem DNA-Ausbeutegel wurde die Menge von Vektor und Insert im Ligationsansatz so gewählt, dass das molare Verhältnis etwa 1:2 betrug.

Ligationsansatz:

DNA	100–500 ng
T4 DNA-Ligasepuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl (5 Weiss Units)
ad 20 µl Aqua _{dest}	

2.2.8. Verdau von 3'- Überhängen mit der T4-Polymerase

Neben ihrer 5´→3´ Polymeraseaktivität besitzt die T4-DNA-Polymerase auch eine 3´→5´ Exonukleaseaktivität und kann deshalb auch für die Glättung von 3´-Überhängen eingesetzt werden. Dazu wurde 1 U des Enzyms zusammen mit 0,1 mM dNTP-Mix, 1x Reaktionspuffer und 1 – 2 µg DNA für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 10 min inaktiviert und die DNA über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

2.2.9. Klenow-Reaktion

Doppelsträngige DNA mit 5'-Überhängen, welche infolge eines Restriktionsverdaus entstanden sind, können mittels des Klenow-Fragmentes aufgefüllt werden. Dieses Enzym, welches die große Untereinheit der DNA-Polymerase I von *E.coli* darstellt, besitzt sowohl eine 5'→3' Polymeraseaktivität als auch eine 3'→5' Exonukleaseaktivität. Für das Auffüllen von 5'-Überhängen wurden 2 U des Enzyms zusammen mit 0,05 mM dNTP-Mix, 1x Reaktionspuffer und 1 – 2 µg DNA für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 75°C für 10 min inaktiviert und die DNA über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

2.2.10 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Transformationspuffer 1:

30 mM Kaliumacetat

100 mM RbCl₂ 10 mM CaCl₂

50 mM MnCl₂ 15% Glycerin

Mit 10% Essigsäure auf pH 5,8 einstellen

Transformationspuffer 2:

10 mM MOPS

100 mM RbCl₂

75 mM CaCl₂

15% Glycerin

Mit 1 M KOH auf pH 6,5 einstellen und 0,2 µm steril filtrieren.

Kompetente Bakterien besitzen die Fähigkeit, Plasmid-DNA aufzunehmen. Um Bakterien chemisch kompetent zu machen, wurden aus einer bei –80°C in Glycerin gelagerten Stammkultur 2 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert (Bakterie nschüttler, 180 rpm). Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit je 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 inkubiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde die Kultur bei 4°C und 2500 rpm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 40 ml

Material und Methoden

Transformationspuffer I resuspendiert. Nach abermaliger Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 4 ml Transformationspuffer II aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert, zu je 300 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.11. Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien mit DNA

Lösungen:

LB-Medium (flüssig), autoklaviert:

GIBCO BRL[®] LB Broth Base (Lennox L Broth Base) 100 g/l

Glucose 5 g/l

NaCl 25 g/l

Ampicillin 100 µg/ml

Agar-Platten:

LB-Medium (fest), autoklaviert:

GIBCO BRL[®] LB Broth Base (Lennox L Broth Base) 20 g/l

Agar 20 g/l

NaCl 5 g/l

Ampicillin 100 µg/ml

Unter Transformation wird in der Molekularbiologie das Einbringen von Fremd-DNA, in diesem Falle Plasmid-DNA, in Bakterien oder Hefezellen verstanden. Diese wird in den Bakterien vermehrt und anschließend durch geeignete Methoden in großen Mengen wieder isoliert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte durch Hitzeschock bei 42°, wobei die bakterielle Zellwand kurzzeitig durchlässig für die präzipitierte DNA wurde.

Für die Transformation wurden 10 µl Ligationsansatz zu 100 µl *E. coli*-Kultur pipettiert und dieser Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Nach Zugabe von 400 µl 1x LB-Medium erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C und 180 rpm. Danach wurde die Kultur 3 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, 400 µl Überstand abgenommen und das Pellet im Restüberstand resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.2.12. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels der TENS-Methode

Lösungen:

TENS-Lösung:

10 mM TRIS-HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

0,1 N NaOH

1,0 % SDS

Natriumazetat-Lösung :

3 M pH 5,2

TE-Puffer:

10 mM TRIS-HCl pH 8,0

0,5 mM EDTA

100 µg/ml RNase A

Mittels DNA-Minipräparationen ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit eine Vielzahl von Bakterienklonen auf die Anwesenheit des gewünschten Plasmides zu analysieren. Eine Methode dafür ist die sog. TENS-Methode, welche auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellwände basiert. Dazu wurden 2 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, mit einer Einzelkolonie einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde im Restüberstand resuspendiert, mit 300 µl TENS-Lösung versetzt und mehrmalig geschwenkt. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl Natriumazetat-Lösung (pH 5,2) und abermaliges Schwenken. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation 10 min bei 14000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml eiskaltem absolutem Ethanol präzipitiert.

Nach Zentrifugation 10 min bei 14000 rpm und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, der Ethanol abgesaugt und das

Material und Methoden

Pellet für 30 min bei 37°C getrocknet. Nach Aufnahme des Pellets in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) wurde ein analytischer Restriktionsverdau der Plasmid-DNA durchgeführt.

2.2.13. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolation großer Mengen Plasmid-DNA wurde eine DNA-Maxipräparation durchgeführt. Dafür wurden 150 ml 1 x LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Einzelkolonie einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur bei 4°C und 5000 rpm 15 min abzentrifugiert. Die Plasmid-Gewinnung erfolgte mit dem Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500 von Macherey-Nagel nach dem Protokoll des Herstellers. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde je nach Größe des Pellets in 100-400 µl Aqua_{dest} aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank bei 2-8°C aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die Vermessung mit einem Photometer bei 260 nm und die Einstellung auf eine Konzentration von 1 µg/µl DNA mit Aqua_{dest}.

2.2.14. Spektrometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm im Photometer der Firma Eppendorf. Die zu vermessende DNA wurde in Aqua_{dest} im Verhältnis 1:100 verdünnt, wobei Aqua_{dest} als Referenzprobe verwendet wurde. Die Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gab Auskunft über eine eventuelle Verunreinigung der DNA-Probe. Optimal war ein Wert zwischen 1,7 und 2. Lag der Wert unter 1,7, so deutete dies auf eine Kontaminationen mit Proteinen hin, lag der Wert über 2, auf eine RNA-Kontamination. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Aqua_{dest} verdünnt und so auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

2.2.15. Phenol-Chloroform Extraktion von DNA

Wässrige DNA-Lösungen wurden zur Entfernung von Proteinverunreinigungen einer Extraktion mit Phenol und Chloroform unterworfen. Die Proteine sammelten sich dabei in der organischen Phase und der Interphase an, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verblieben.

Die Extraktion wird wie folgt ausgeführt:

- Zugabe von einem Volumen Phenol, vortexen.
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14 000 rpm).
- Obere wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- Zugabe von einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), vortexen.
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14 000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- Zugabe von einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), vortexen.
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14 000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.

Durch eine anschließende Alkoholfällung wurde die DNA präzipitiert und eventuelle Phenolreste aus der Lösung entfernt.

2.2.16. Alkohol-Präzipitation

Zum Entsalzen von DNA-Lösungen wurde die Methode der Ethanol-Präzipitation verwendet. Durch die Zugabe von Ethanol wird der DNA die Hydrathülle entzogen, woraufhin diese aggregiert und durch Zentrifugation pelletiert werden kann. Im Gegensatz dazu bleiben Salze und andere Moleküle wie Nukleotide oder niedermolekulare Oligonukleotide in Lösung. Ebenso können mittels dieser Methode Reste organischer Verbindungen wie Phenol (s. Kap. 2.2.15.) entfernt werden.

Das Protokoll lautete wie folgt:

- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2-5,4)
- Zugabe von 6/10 Volumen Isopropanol
- Mischen und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 15 min Zentrifugation (13000 rpm)
- Dekantierung des Überstandes
- Zugabe von 1 ml 70 %igem Ethanol
- Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 15 min (13000 rpm) und Absaugen des Überstands

Danach wurde das Pellet für ca. 15 min bei 37°C getrocknet und in 20 µl sterilem Aqua_{dest} aufgenommen.

2.2.17. Herstellung einer RNA-Sonde

Zur relativen Quantifizierung des DNA- und RNA-Gehaltes von Virusüberständen wird sowohl ein Plasmid als Sonden-DNA als auch Sonden-RNA, welche durch in-vitro-Transkription der Sonden-DNA gewonnen wird, als externer Standard benötigt. Auf die Natur der Sonden-DNA wird im Ergebnisteil dieser Arbeit genauer eingegangen werden. Zur Herstellung der RNA-Sonde wurde die Sonden-DNA über Nacht bei 37°C linearisiert:

10 µg DNA
2,5 µl Enzym (10 U/µl)
5 µl Puffer (10 fach)
ad 50 µl mit RNase-freiem H₂O

Nach Aufreinigung der linearisierten DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (s. Kap. 2.2.15.) folgte die in-vitro-Transkription:

1 µl (1-2 µg) linearisierte Sonden-DNA
1 µl 10x Transkriptionspuffer
RNase Inhibitor 20 U
je 0,2 µl CTP, UTP, GTP, ATP (100mM)
0,5 µl SP6 RNA-Polymerase
ad 10 µl mit RNase-freiem H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 0,5 µl (1 U/µl) RQ-DNase die Sonden-DNA verdaut (15 min, 37°C). Nach Zugabe von 20 µl Fällmix sowie 75 µl 100 % Ethanol wurde der Ansatz für 20-25 min bei 14000 rpm zentrifugiert und so die Sonden-RNA präzipitiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das RNA-Pellet für etwa 15 min bei 37°C getrocknet, in 50 µl RNase-freiem H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.18. Präparation von DNA und RNA aus Virusüberständen

Jeweils 10 ml zellfreier Virusüberstand zur DNA- sowie RNA-Quantifizierung wurden durch Ultrazentrifugation über ein 20 % Sucrosekissen konzentriert (s. Kap. 2.4.4.). Die Sedimente wurden in jeweils 200 µl PBS gelöst und die Nukleinsäuren mit Hilfe des QIAamp^R MinElute^R Virus Spin Kits (Quiagen) isoliert. Für die DNA-Bestimmung wurden die Eluate anschließend bei 37°C für 1 Stunde mit 0,2 mg/ml RNase A verdaut. Für die RNA-Bestimmung wurden die Eluate bei 37°C für 1 Stunde mit 1 U/50 µl RQ-DNase verdaut. Die Inaktivierung der RQ-DNase erfolgte durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C unter Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA.

2.2.19. cDNA-Synthese

Die Synthese von copy DNA (cDNA) aus isolierter RNA erfolgte mithilfe der M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reversen Transkriptase (RT), RNase H⁻, Punktmutante. Diese RT besitzt keine RNase H-Aktivität mehr, was die Synthese längerer Transkripte ermöglicht, da das RNA-Template durch die Rase H nicht mehr abgebaut werden muß. In einem ersten Schritt erfolgte die Hybridisierung eines spezifischen Antisense-Primers mit dem RNA-Template. Anschließend katalysierte die RT die Elongation des Primers und damit die cDNA-Synthese. Die cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C aufbewahrt.

Reaktionsprotokoll

1 µl RNA-Template

1 µl Antisense-Primer (2 pmol/µl Stammlösung)

ad 12 µl RNase-freies H₂O

70°C: 5 min (Hybridisierung)

auf Eis: 5 min

Zugabe von

5 µl 5 x Reaktionspuffer

1,25 µl 10mM dATP

1,25 µl 10mM dCTP

1,25 µl 10mM dGTP

1,25 µl 10mM dTTP

1 µl M-MLV RT (100 U)

54°C: 60 min (Elongation)

70°C: 15 min (Inaktivierung der Reaktion)

2.2.20. Quantitative real-time PCR

Die Bestimmung des DNA- und RNA-Gehaltes von Virusüberständen wurde mittels quantitativer real-time PCR durchgeführt. Diese sehr sensitive Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren beruht auf der Interkalalierung von Fluoreszenz-Farbstoffen, in diesem Fall SYBRGreen, in doppelsträngige DNA. Die Konzentration an doppelsträngiger DNA und somit die Menge an eingelagertem SYBRGreen nimmt dabei mit jedem Zyklus logarithmisch zu. Wird der Farbstoff durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, kommt es zur Emission von Fluoreszenz, welche vom real-time-Cycler (iCycler iQTM, Biorad) gemessen wird. Je höher der Nukleinsäuregehalt einer Probe ist, desto früher wird ein bestimmter Schwellenwert der Fluoreszenz überschritten. Zur Quantifizierung wurden dabei Verdünnungsreihen einer DNA- bzw. RNA-Sonde (nach reverser Transkription) als externe Standards verwendet. Zuvor wurden die RNA-Proben in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 2.2.19.). Die für die PCR verwendeten Primer amplifizierten einen kurzen Abschnitt (maximal 200 bp) der zu quantifizierenden Nukleinsäure (in dieser Arbeit im Bereich des *pol*-Gens von PFV bzw. FFV). Für jeden Ansatz wurde 1 µl der DNA-Extraktion bzw. 1 µl der Präparation aus der cDNA-Synthese eingesetzt. Eine an die PCR anschließende Schmelzpunktanalyse wurde zur Überprüfung der Spezifität der Amplifikate eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels der iCycler iQTM Optical System Software Version 3.1, Biorad.

Reaktionsansatz

10 µl 2 x SybrGreen Mastermix
1 µl sense-Primer (10 pm/µl Stammlösung)
1 µl antisense-Primer (10 pm/µl Stammlösung)
1 µl DNA bzw. cDNA
ad 20 µl Rnase-freies H₂O

PCR-Programm

95°C: 5 min (initiale Denaturierung, Aktivierung der HotStarTaq *Plus* DNA
Polymersase)

95°C: 10 s (Denaturierung)

60°C: 30 s (Hybridisierung und Elongation)

→ 40 Zyklen

95°C: 1 min

52°C: 1 min

Schmelzpunktanalyse:

52°C: 10 s

→ 86 Zyklen (Temperaturerhöhung nach jedem Zyklus um 0,5°C)

15°C: ∞ (Abkühlungsphase)

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung adhärenter Zellen

Zellkulturmedien:

293T, BHK/LTR(PFV)/*lacZ*, MRC-5:

MEM: Hausmedium (9,6 g/l Invitrogen #41500-083, 2,2 g/l NaHCO₃)

10% Fötale Kälberserum (FCS)

0,03% Glutamat

10 µg/ml PenicillinG

10 µg/ml Streptomycin

Selektion der BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen mit 1 mg/ml G418

Material und Methoden

CrFK/LTR(FFV)*lacZ*, HT1080:

DMEM: GIBCO™ Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, Natriumpyruvat

4,5 g/l Glucose und Pyridoxin

10% Fötale Kälberserum (FCS)

0,03% Glutamat

10 µg/ml PenicillinG

10 µg/ml Streptomycin

Selektion der CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen mit 0,4 mg/ml Zeocin

ATV:

137 mM NaCl

5,4 mM KCl

5 mM D-Glucose

70 mM NaHCO₃

500 mg/ml Trypsin

Einfriermedium:

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

90 % Fötale Kälberserum (FCS)

Die adhärent wachsenden permanenten Zelllinien (293T, HT1080, BHK/LTR(PFV)*lacZ*, CrFK/LTR(FFV)*lacZ*) sowie die adhärent wachsende primäre Zelllinie MRC-5 wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 25 cm² oder 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80%-100% kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert. Zum Passagieren wurde zunächst der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit ATV gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit ATV abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und ein Teil nach 1:10-Verdünnung (MRC-5: 1:2-Verdünnung) mit frischem Medium weiterkultiviert.

2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden die Zellen zuerst mit ATV abgelöst und 3 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen

Material und Methoden

und nochmals 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Danach wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und nach 1-3 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen von Zellen erfolgte im Gegensatz zum Einfrieren schnell bei 37°C, da DMSO toxisch auf Zellen wirkt. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet mit frischem Medium gewaschen, um Reste von DMSO zu entfernen und nochmals 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in einer kleinen Zellkulturflasche wie oben beschrieben kultiviert.

2.3.3. Transfektion

Lösungen:

Polyethylenimin (PEI) Stocklösung:

100mg/ml PEI (Polyscience)

Sterilfiltration mit 0,2 µm Filter, Lagerung bei -20 °C

Natriumbutyrat (50 x):

500 mM Na-Butyrat in PBS

Sterilfiltration mit 0,2 µm Filter, Lagerung bei 4 °C

Als Transfektion wird die Aufnahme fremder Nukleinsäuren wie Plasmid-DNA von eukaryotischen Zellen bezeichnet. Das Einbringen der Fremd-DNA ist mit Hilfe verschiedener Reagenzien möglich, in dieser Arbeit wurde Polyethyleneimin (PEI) verwendet. Es handelte sich dabei jedoch nur um eine transiente Expression der Fremdgene, da die in den eukaryotischen Zellen eingebrachte Fremd-DNA im Laufe der Zellteilungen verloren ging.

Polyethyleneimin ist ein kationisches Polymer, welches Nukleinsäure-bindende und -kondensierende Eigenschaften besitzt. DNA-Polykation-Komplexe werden effizient von verschiedenen Zellarten aufgenommen. Der so genannte „Protonsponge-Effekt“ des Polykations wirkt einer intrazellulären Degradierung entgegen, sodaß ein effizienter Gentransfer stattfinden kann (Boussif et al., 1995; Kircheis et al., 1997). Im

Material und Methoden

folgenden Schema ist der Ablauf einer PEI-Transfektion dargestellt. Am ersten Tag wurden 293T-Zellen in 6- oder 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Zum Nachweis der Infektiösität extrahierter Virus-DNA (Kap. 3.2.6.) wurden BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen in 12-Loch-Platten ausgesät. 24 h später wurden die DNA- und PEI-Lösungen angesetzt, miteinander vermischt und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Mediumwechsel der Zellen wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen getropft.

Am Morgen nach der Transfektion wurde dem Medium 10 mM Natriumbutyrat zugesetzt, nach 6 bis 8 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die für die Transfektion verwendeten Plasmide besitzen einen Promoter des Cytomegalovirus (CMV), eines Herpesvirus, welcher die initiale Genexpression steuert. Danach übernimmt das Virus die Steuerung seiner eigenen Genexpression. Durch die Zugabe von Natriumbutyrat wird die Aktivität dieses Promotors verstärkt, was zu einer erhöhten Expression der Gene führt, welche unter der Kontrolle dieses Promotors stehen (Soneoka et al. 1995). Die Aufarbeitung des Überstandes und der Zelllysate erfolgte 48 h nach Transfektion.

Transfektionsschema

Arbeitsschritt	12-Loch-Platte	6 cm-Zellkulturschale	10 cm-Zellkulturschale
Ausgesäte Zellzahl	4×10^4 BHK/LTR(PFV)/ <i>lacZ</i>	2×10^6 293T	6×10^6 293T
Gesamt-DNA-Menge	< 1 µg	6 µg	16 µg
DNA-Lösung mit MEM pur	499 µl	250 µl	1000 µl
PEI-Menge	9 µl	18 µl	45 µl
PEI-Lösung mit MEM pur	491 µl	250 µl	1000 µl
Mediumwechsel	1 ml MEM 20% FCS	2,5 ml MEM 12% FCS	4 ml MEM 15% FCS

2.3.4. Herstellung von Zellysaten

Lösungen:

RIPA-Puffer:

20 mM TRIS pH 7,4

0,3 M NaCl

1 % Na-Desoxycholat

1 % Triton X-100

0,1 % SDS

Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Genexpression in den transfizierten 293T-Zellen wurden denaturierende Gesamtzellextrakte hergestellt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend mit 700 µl (6 cm-Kulturschale) bzw. 1 ml (10 cm-Zellkulturschale) eiskaltem RIPA-Puffer versetzt und für 10-15 Minuten unter mehrmaligem Schwenken auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 700 µl Zellysat auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen) gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 600 µl Durchfluß wurden mit 600 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proteine durch 10 minütiges Kochen der Proben bei 100°C denaturiert und bis zur proteinbiochemischen Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese bei -80°C eingefroren.

2.3.5. Indirekte Immunfluoreszenz

Lösungen:

Fixierlösung:

4% Paraformaldehyd in PBS

Perforationslösung:

0,1% Triton X-100 in PBS

Blocklösung:

3% BSA (NEB) in PBS

Material und Methoden

Einbettmedium:

ImmunoSelect Antifading Mounting Medium DAPI (Dianova)

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine Methode zum optischen Nachweis von Proteinen *in situ* in Zellkulturen. Nach Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgt die Inkubation mit einem primären Antikörper, welcher an das nachzuweisende Protein bindet. Dieser wird von einem sekundären Antikörper erkannt, an den wiederum ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dieser emittiert nach Anregung bei einer bestimmten Wellenlänge Fluoreszenz einer anderen spezifischen Wellenlänge.

Dazu wurden in einer 6 cm-Schale sterile Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet und 10 min inkubiert. Dies ermöglichte den ausgesäten Zellen das Anwachsen. Nach der Beschichtung wurden die Schalen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgten Aussaat, Transfektion, Induktion und Mediumwechsel wie in Kap. 2.3.3 beschrieben. Im Zeitraum von 36 bis 48 h nach Transfektion wurden die Deckgläschen aus den 6 cm-Schalen herausgenommen, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Fixierlösung für 5 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellmembranen mit der Perforationslösung permeabilisiert. Dem folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS und eine 30 minütige Inkubation mit der Blocklösung zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen. Nach einem Waschschrift mit PBS folgte eine zweistündige Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung in 1 % BSA in PBS) bei Raumtemperatur. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 min und anschließend die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung in PBS) für eine Stunde bei Dunkelheit. Anschließend wurden die Deckgläschen nochmals dreimal mit PBS gewaschen und in der Dunkelheit getrocknet. Zum Schluß wurden die Deckgläschen in Einbettmedium auf Objektträger geklebt und mit Nagellack umrundet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Aufbewahrung bis zur Fluoreszenzmikroskopie erfolgte im Kühlschrank, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzmarkers zu verhindern. Für die Bildanalyse stand ein Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, System LSM 510 Meta, Programm 3.2 zur Aufnahme, Zeiss) zur Verfügung.

2.3.6. Fixierung transfizierter Zellen für die elektronenmikroskopische Analyse

Fixierlösung:

2,5 % Glutaraldehyd (EM-grade)

50 mM Na-Cacodylat

1 mM KCl

0,1 mM MgCl₂

Waschlösung: 50 mM Na-Cacodylat

Elektronenmikroskopische Bilder transfizierter Zellkulturen wurden in dieser Arbeit für den Nachweis viraler Kapside oder partikulärer Strukturen angefertigt. Die Aufarbeitung der Proben sowie die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Zentgraf und seiner Arbeitsgruppe am DKFZ in Heidelberg übernommen. Die initialen Schritte wurden vom Autor selbst vorgenommen: 293T-Zellen wurden in 10cm-Schalen gemäß dem Standardprotokoll (s. Kap. 2.3.3.) transfiziert und die Expression der transfizierten Konstrukte durch die Zugabe von Natriumbutyrat 24 h nach Transfektion stimuliert. Die Fixierung erfolgte 48 h nach Transfektion. Nach Abnahme des Mediums von den Zellen sowie einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Fixierung durch Zugabe von 3 ml einer 2,5 % Glutaraldehydlösung in 50 mM Cacodylatpuffer für 20 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und die Suspension in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 1400 rpm pelletiert, die Glutaraldehydlösung abgezogen und das Zellpellet 3 – 4mal im Abstand von 5 min mit 50 mM Cacodylat-Puffer gewaschen. Waren keine Spuren des Glutaraldehyd mehr vorhanden (erkennbar am fehlenden Geruch), wurde das Röhrchen mit Cacodylat-Puffer aufgefüllt und versandfertig gemacht.

2.3.7. Histochemische β -Galactosidase-Färbung

Lösungen:

lacZ-Fixierlösung:

0,5 % Glutaraldehyd in PBS

Material und Methoden

lacZ-Färbelösung

4 mM K₃Fe(CN)₆ (400 mM Stammlösung, bei 4°C gelagert)

4 mM K₄Fe(CN)₆ (400 mM Stammlösung, bei 4°C gelagert)

2 mM MgCl₂ (200 mM Stammlösung, bei 4°C gelagert)

0,4 mg/ml X-Gal (400 mg/ml Stammlösung, bei -20°C gelagert)

Mit 1x PBS auffüllen

Mit der histochemischen β -Galactosidase-Färbung erfolgte der Nachweis der Expression des β -Galactosidase-Markergens in Zellkulturen. Dazu wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit der *lacZ*-Fixierlösung für 30 min bei 37°C fixiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen, da Reste der Fixierlösung den nachfolgenden Färbeprozess inhibieren konnten. Zur Färbung wurden die Zellen mit *lacZ*-Färbelösung für mindestens 7 h bei 37°C inkubiert. Dabei wurde das in der Färbelösung enthaltene Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactosid) von der β -Galactosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Blau gefärbte Zellen wurden am Mikroskop ausgezählt (siehe Kap. 2.4.3.).

2.4. Virologische Methoden

2.4.1. Vektorsysteme für die Analyse von PFV Gag

Zur Freisetzung infektiöser PFV-Partikel wurde zum einen das replikationskompetente PFV Provirus pczHSRV2 bzw. Mutanten dieses Konstruktes verwendet. Auf diesem Plasmid sind alle für die Replikation notwendigen Gene einschließlich des foamyviralen Transaktivators Tas kodiert, die primäre Proteinexpression wird von einem CMV-Promotor getrieben (Moebes et al. 1997). Zum anderen wurde das 4-Vektorsystem verwendet, bei dem die drei Strukturproteine Gag, Pol und Env sowie die verpackbare genomische RNA als Vektor von vier separaten Plasmiden kodiert werden (Heinkelein et al., 2002a). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Vektor pTW01 sind die Struktur- und Nicht-Strukturgene weitestgehend deletiert worden und durch ein *egfp*-Markergen unter Kontrolle des Promotors des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) ersetzt worden. Somit ist eine Expression viraler Proteine vom Vektorkonstrukt unterbunden. Erhalten

geblieben sind die für die Verpackung des Genoms in das Viruspartikel sowie die für Reverse Transkription und Integration des viralen Genoms notwendigen Sequenzabschnitte (Wiktorowicz et al., 2009). Viruspartikel, welche mit diesem System generiert werden, sind nur zu einem Replikationszyklus fähig. Das PFV-Vektorsystem bestand aus den Verpackungsplasmiden pC1gag2, pCpol2, pCenv1 sowie dem Vektor pTW01.

Zur Freisetzung infektiöser FFV-Partikel wurde das replikationskompetente FFV Provirus pChatul-3 (Roy et al., 2003) bzw. Mutanten dieses Konstruktes verwendet.

2.4.2. Herstellung virushaltiger Überstände

Nach Transfektion von 293T Zellen wurden 48 h später zellfreie Virusüberstände geerntet. Dazu wurde das Medium mit einer sterilen Spritze abgenommen und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Die Virusüberstände wurden sofort für eine Partikelpräparation ultrazentrifugiert, für eine Infektion von Zielzellen verwendet oder für eine spätere Verwendung aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.3. Quantitative Bestimmung des Virustiters

Die Bestimmung des extrazellulären Virustiters erfolgte in dieser Arbeit durch die Titration replikationskompetenter Viruspartikel auf Indikatorzellen („Blue cell assay“). Zur Bestimmung des Virustiters nach Transfektion mit proviralen PFV-bzw. FFV-Konstrukten wurden BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen (Schmidt und Rethwilm 1995) bzw. CrFK/LTR(FFV)/*lacZ*-Zellen (Bock et al., 1998) als Indikatorzellen verwendet. Diese Zellen enthalten ein in das Zellgenom stabil integriertes *lacZ*-Reportergen unter der Kontrolle des PFV bzw. FFV LTR-Promotors. Da diese Promotoren nur in der Gegenwart des viralen Transaktivators Tas aktiv sind (Keller et al., 1991, Baunach et al., 1993, Löchelt, 2003), liegt das Reportergen stumm in der Zelle vor. Nach einer erfolgreichen Infektion der Indikatorzellen durch PFV bzw. FFV kommt es zur Expression von Tas von dem internen Promotor des integrierten Provirus. Dies induziert die Expression des *lacZ*-Reportergens. Diese Expression lässt sich wiederum über die histochemische β-Galactosidase Färbung nachweisen (siehe Kap. 2.3.7.). Nach der Färbung können die infizierten Zellen ausgezählt werden und über

eine Verdünnungsreihe der Virustiter bestimmt werden. Am Vortag der Infektion wurden 2×10^4 BHK/LTR(PFV)/*lacZ*- bzw. CrFK/LTR (FFV)/*lacZ*- Indikatorzellen pro Loch in einer 12-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden zellfreie virushaltige Überstände gewonnen (s. Kap. 2.4.2.). Die Ansätze wurden in MEM bzw. DMEM komplett verdünnt und in einer logarithmischen Verdünnungsreihe (in der Regel zwischen 10^{-3} und 10^{-7} , Doppelbestimmung) auf die Zielzellen gegeben. Die Verdünnungsreihe ist als Endpunkttitration angelegt. Die Zielzellen wurden drei Tage nach Infektion angefärbt und die blauen Infektionsherde ausgezählt. Anschließend konnte die Anzahl infektiöser Einheiten pro ml Infektionsmedium (ffu = focus forming units) über die Verdünnungsreihe rechnerisch bestimmt werden. Dazu wurde die Anzahl der Foci in den beiden Wells mit der größten Verdünnung, bei der noch Foci auftraten, gezählt und mit dem Faktor 10 multipliziert. Ebenso wurde die Anzahl der Foci in den beiden Wells mit der zweitgrößten Verdünnung, bei der noch Foci auftraten, gezählt. Die so ermittelten Werte wurden addiert, durch vier geteilt und mit dem Faktor der zweitgrößten Verdünnung, bei der noch Foci auftraten, multipliziert.

2.4.4. Viruspartikelpräparation aus Zellkulturüberständen

Zum biochemischen Nachweis partikelassoziiertes Virusproteins im Überstand transfizierter Zellkulturen sowie zur Nukleinsäureextraktion erfolgte eine Aufkonzentration des partikulären Materials aus dem Überstand. Zunächst wurde der Überstand zur Entfernung von abgelösten Zellen und groben Zelltrümmern wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben durch einen $0,45 \mu\text{m}$ -Filter filtriert. Der filtrierte Überstand wurde anschließend vorsichtig auf ein 20%iges Saccharosekissen (6 ml) in einem Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Zentrifugenröhrchen 38,5 ml, Beckmann) geschichtet. Die Sedimentation des partikulären Materials durch das Saccharosekissen erfolgte im Surespin 630- (Sorvall) sowie im SW-28-Rotor (Beckmann Coulter) bei 27000 rpm und 4°C für 2 h (Disco very 90 SE Ultrazentrifuge, Beckman Coulter). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das Saccharosekissen abgegossen. Das Pellet wurde in $50 \mu\text{l}$ PBS/2fach PPP 1:1 resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert, nochmals resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Denaturierung durch 10 minütiges Aufkochen bei 100°C . Bis zur proteinbiochemischen Analyse wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.4.5. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

FACS-Puffer:

0,1 % Rinderserumalbumin (BSA)

0,02 % Natriumazid

in PBS

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Dadurch können Zellen z.B. anhand ihrer Größe, Granularität oder Markergenexpression aufgeteilt und gezählt werden. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Das Emissionsspektrum wird von einem Durchflusszytometer (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS, in der vorliegenden Arbeit FACSCalibur, Becton & Dickinson) detektiert. In dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse für den Nachweis der Expression des Markergens *enhanced green fluorescent protein (egfp)* als Indikator der Transduktionseffizienz des Vektors pTW01 auf HT1080-Zellen verwendet. Zur Analyse wurden die transduzierten HT1080-Zellen zuerst mit ATV gewaschen und abgelöst. Anschließend wurden sie in FACS-Rörchen mit 3 ml vorgelegtem FACS-Puffer überführt und für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente wurden abhängig von ihrer Größe in 100-300 µl FACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Danach erfolgte die Messung am Durchflusszytometer und die Auswertung mit dem *CellQuest* Programm (Becton & Dickinson).

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. SDS-Polyacrylamidgel-Ektrophorese (SDS-PAGE)

Gele für Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)-Page (für Western Blot):

Tricingel-Puffer:

3 M TRIS

0,3 % SDS Einstellen des pH-Wertes auf pH 8,45 mit konzentrierter Salzsäure

Material und Methoden

Trenngel (8 %) (20 ml):

6 ml Aquadest

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

6,6 ml Tricingel-Puffer

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

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

0,02 ml TEMED

Trenngel (10 %) (20 ml):

4,6 ml Aquadest

6,6 ml Acryl-Bisacrylamid-Lösung (PAA30)

6,6 ml Tricingel-Puffer

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

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

0,02 ml TEMED

Trenngel (15 %) (20 ml):

3,6 ml Aquadest

9,9 ml Acryl-Bisacrylamid-Lösung (PAA30)

6,6 ml Tricingel-Puffer

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

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

0,02 ml TEMED

Sammelgel (4 %) (20 ml):

12,3 ml A. dest.

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

5,0 ml Tricingel-Puffer

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

0,02 ml TEMED

Kathodenpuffer (5 x):

0,5 M TRIS (pH 8,25)

Material und Methoden

0,5 M Tricin

0,5 % SDS

Anodenpuffer (10 x):

2,0 M TRIS Einstellen des pH-Wertes auf pH 8,9

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die diskontinuierliche denaturierende Elektrophorese in vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gelen verwendet. Hierbei werden die aufzutrennenden Proteine durch SDS und β -Merkaptoethanol denaturiert. Der dabei entstehende SDS-Proteinkomplex weist im Vergleich zur Nettoladung der Proteine eine weit größere negative Ladung auf. Dies führt zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulgewicht. Acrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid, welches durch Bisacrylamid quervernetzt wird. Die für diese Radikalkettenreaktion nötigen Radikale werden von Ammoniumperoxodisulfat generiert (APS), TEMED (N-N-N'-N'-Tetramethyldiamin) stabilisiert diese (Berg, Tymoczko, Stryer 2003). In dieser Arbeit wurde, je nach erwarteter Größe der aufzutrennenden Proteine, 8 %, 10% bzw. 15% Trenngel mit einem 4 % Sammelgel überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte in einem Zweikammersystem: die obere Kammer der Gelapparatur wurde mit 1x Kathodenpuffer, die untere mit 1x Anodenpuffer gefüllt. Die Sammeltaschen wurden zur Entfernung von Gelresten mit 1x Kathodenpuffer gespült und anschließend werden je 50 μ l der Proben sowie 10 μ l PageRuler Marker (Fermentas) als Größenstandard aufgetragen. Die Proteine wurden über Nacht bei 15-30 mA je Gel aufgetrennt.

2.5.2. Western Blot

Puffer

10 x Blotpuffer:

0.025 M TRIS

0.192 M Glycin

5 % (v/v) Methanol

Waschpuffer, pH 7,5:

0.25 % (v/v) Tween20 in PBS

Material und Methoden

Blocklösung, pH 7,5:

4 % Magermilchpulver in PBS

ECL-LösungA:

2,5 mM Luminol

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

ECL-LösungB:

5,4 mM H₂O₂ in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5); frisch angesetzt

Nach der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel werden die Proteine durch elektrischen Strom auf eine Trägermembran wie Nylon oder Nitrocellulose transferiert und immobilisiert. Dieses Verfahren wird Western-Blotting genannt (Berg, Tymoczko, Stryer 2003). Die Detektion der immobilisierten Proteine erfolgt mittels eines primären, für das jeweilige Protein spezifischen Antikörpers. Ein sekundärer Antikörper, welcher mit einem Enzym wie einer alkalischen Phosphatase oder der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, erkennt den konstanten Bereich des Primärantikörpers. Mit Hilfe des an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms lässt sich das jeweilige Protein detektieren. In dieser Arbeit wurde ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, welcher mittels zweier ECL-Lösungen detektiert wurde. Das durch die Peroxidase oxidierte Luminol emittiert Licht, welches nach Entwicklung eines Röntgenfilms eine Schwarzfärbung hinterlässt. In dieser Arbeit wurde das „semidry“-Blottingverfahren verwendet. Vor dem Blotting wurden die Nitrocellulosemembran (HYBOND™ ECL™; Amersham Biosciences) und die Whatmanfilterpapiere 10 min in Western Blot-Puffer eingeweicht. Anschließend wurden 3 Lagen Whatmanfilterpapier, die Nitrocellulosemembran, darauf das Trenngel und erneut 2 Lagen Whatmanfilterpapier luftblasenfrei auf die Anodenplatte gestapelt. Darauf wurde die Kathodenplatte gesetzt und 90 min bei 150 mA (im Falle eines 15%-igen Trenngeles 200 mA) geblottet. Dabei kam es zum Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran. Anschließend wurde die Apparatur abgebaut, die Membran kurz mit PBS gespült und für 30 min in 4% Milchpulver/PBS (Blocklösung) inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen geblockt. Danach wurde die Membran entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem

Material und Methoden

primären Antikörper (verdünnt in 4% Milchpulver/PBS) inkubiert. Zur Entfernung nicht oder unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran nach dieser Inkubation dreimal jeweils 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper (1:2000 in 4% Milchpulver/PBS verdünnt) inkubiert. Nach dieser Inkubation folgten fünf Waschschrte für jeweils 5 min. Für die nachfolgende ECL-Reaktion wurden die ECL-Lösungen A und B 1:1 gemischt, auf die Membran aufgetragen und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Detektion der Lichtemission erfolgte durch Exposition von Röntgenfilmen (X-ray Retina XBD Fotochemische Werke GmbH).

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation eines Env-interagierenden Motivs in PFV Gag

3.1.1. Klonierung eines PFV/MPMV-Hybridplasmids

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte versucht werden, mittels eines chimären Konstruktes aus den Gag-Proteinen von MPMV und PFV ein PFV Env-interagierendes Motiv zu identifizieren. Dafür wurde ein retroviraler Vektor auf der Basis von MPMV kloniert, welcher für die MPMV Strukturproteine Gag, Pro/Pol und Env codiert. MPMV gehört zu den einfachen Retroviren, deren Genom für keine akzessorischen Proteine kodiert. Die Protease wird als Gag-Pro-Vorläuferprotein synthetisiert, was durch eine ribosomale Leserasterverschiebung bewerkstelligt wird. Durch eine zweite ribosomale Leserasterverschiebung werden die Reverse Transkriptase und Integrase als Gag-Pro-Pol-Vorläuferprotein translatiert. Dementsprechend entstehen während der Gag-Translation drei verschiedene Polyproteine, und zwar $pr78^{\text{Gag}}$, $pr95^{\text{Gag-Pro}}$ und $pr180^{\text{Gag-Pro-Pol}}$, welche in abnehmender Menge in unreifen MPMV-Partikeln enthalten sind (Parker und Hunter, 2001). Im Gegensatz zu den Gag-Proteinen anderer Orthoretroviren wird MPMV Gag nicht nur in MA, CA und NC gespalten, sondern zu sechs Untereinheiten prozessiert. Dies sind, vom N- zum C-Terminus: Matrixprotein (MA, p10), Phosphoprotein pp24/16, p12, Kapsidprotein (CA, p27), Nukleokapsidprotein (NC, p14) und p4. In Abb. 6 ist die Organisation des MPMV Gag-Proteins mit Motiven der einzelnen Untereinheiten dargestellt.

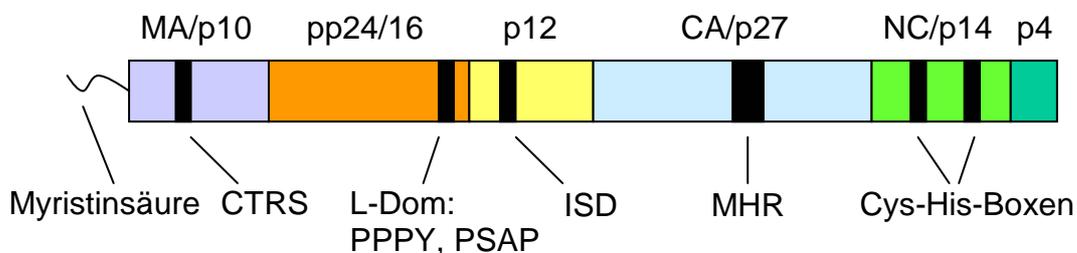


Abb. 6: Organisation des MPMV Gag-Proteins $pr78$; CTRS: cytoplasmic targeting/ retention signal; ISD: internal scaffold domain, vermittelt Gag-Gag-Interaktion, benötigt für Assembly; MHR: major homology region (verändert nach Sakalian und Hunter, 1999)

Ergebnisse

Der zu klonierende Vektor enthält außerdem das für die Inkorporation der beiden Kopien der genomischen RNA benötigte Verpackungssignal Ψ . Dieses besteht im Falle von MPMV aus zwei verschiedenen Sequenzabschnitten. Zum einen bilden die ersten 15 bp 5' der PBS innerhalb der 5' untranslatierten Region (5'UTR) ein primäres Verpackungssignal. Eine effiziente Verpackung der genomischen RNA hängt jedoch von einer zweiten Determinante ab, welche sich über die letzten 23 bp der 5'UTR bis über die ersten 100 bp des *gag*-ORFs erstreckt (Schmidt et al., 2003). Desweiteren enthält der Vektor das konstitutive Transportelement (constitutive transport element, CTE). Dieses erstreckt sich 3' des *env*-ORFS bis in die U3-Region der 3'-LTR hinein und dient dem nukleären Export der viralen gespleißten mRNAs (Rizvi et al., 1996, Rizvi et al., 1997).

Für die Expression chimärer Gag-Proteine wurde das MA-Protein von MPMV Gag gegen die N-terminalen 303 As von PFV Gag substituiert. Wie bereits erwähnt, wird der N-Terminus von MPMV Gag kotranslational mit Myristinsäure, einer C14-Fettsäure, modifiziert (Rhee und Hunter, 1987, Bryant und Ratner, 1990). Zudem dient eine Domäne mit basischen Aminosäuren im N-terminalen Bereich von MA als Transport- und Membranverankerungssignal (Yuan et al., 1993, Stansell et al., 2007). Dies ermöglicht MPMV Kapsiden, in Abwesenheit des homologen Env-Proteins in Form von VLPs aus Zellen freigesetzt zu werden. Durch Substitution dieses N-terminalen MA-Proteins von MPMV Gag gegen die N-terminalen 303 As von PFV Gag sollten chimäre Kapside auf der Basis von MPMV Gag konstruiert werden, deren zellulärer Export PFV Env restringiert ist. Diese sollten anschließend verwendet werden, um durch Einführen verschiedener Deletionen eine grobe Eingrenzung eines Env-interagierenden Motives zu erreichen. Anschließend wurde ein Alaninscanning im N-terminalen Bereich von PFV Gag durchgeführt, in welchem alle As bis zum Beginn des CTRS zu Alanin mutiert wurden. Damit sollten As identifiziert werden, die für eine Verpackung der Kapside mit dem PFV Glykoprotein essentiell sind. Alaninmutanten, welche keinen PFV Env-abhängigen zellulären Export mehr zeigten, sollten durch die Anfertigung von Immunfluoreszenz- sowie elektronenmikroskopischen (EM-) Aufnahmen hinsichtlich ihrer intrazellulären Lokalisation sowie ihrer Kapsidmorphologie untersucht werden.

Für die Konstruktion des Hybridvektors diente der kommerzielle Expressionsvektor pcDNA3.1 zeo als Basis. Die infektiösen Klone pSARM4 (MPMV, Song und Hunter, 2003) sowie pczHSRV2 (PFV, Moebes et al. 1997) dienten der Gewinnung viraler

Ergebnisse

Sequenzabschnitte mittels präparativen Verdaus oder PCR. Sämtliche Klonierungsprodukte wurden durch analytischen Probeverdaus, PCR-Produkte mittels Sequenzierung auf ihre Korrektheit hin überprüft. Wie bereits erwähnt, werden die ersten 100 bp des MPMV *gag*-ORFs für eine effiziente Verpackung der viralen genomischen RNAs benötigt. Dementsprechend mußte dieser Sequenzabschnitt zwar im Hybridplasmid enthalten sein, ohne jedoch in eine MA-Proteinsequenz translatiert zu werden. Der erste Klonierungsschritt bestand also darin, das ATG-Startkodon des MPMV *gag*-ORFs zu GTG zu mutieren. Durch die Substitution des Adenins gegen ein Guanin blieb die Struktur der Haarnadelschleife, welche die RNA in diesem Bereich ausbildet, unverändert (Mustafa et al., 2003). Dies wurde mittels PCR unter Verwendung des mutagenen Primerpaars 4167/4168 sowie der terminalen Primern 4076/4079 bewerkstelligt. Als nächstes wurden in einer PCR mit dem mutagenen Primerpaar 4175/4176 sowie den terminalen Primern 4076/4079 die bp 114-119 des MPMV *gag*-ORF zu einer NheI-Restriktionsschnittstelle mutiert. Diese diente in einem späteren Schritt als 5'-Klonierungsschnittstelle für den N-terminalen PFV Gag-Abschnitt. Anschließend wurde eine 3-Fragment-Ligation durchgeführt. Dabei wurden präparative Verdaus des Expressionsvektors pcDNA3.1 zeo sowohl mit BclI/MlI als auch mit MlI/BamHI durchgeführt. Die beiden daraus resultierenden Fragmente wurden mit einem dritten Fragment ligiert, welches mittels präparativen Verdaus von pSARM4 mit BclI/BamHI gewonnen wurde. Dadurch wurde ein 2,5 kb lange Abschnitt des MPMV-Genoms, welcher sich von der 5' RU5-Region über die 5'UTR sowie den gesamten *gag*-ORF bis in den 5'-Bereich des *pro*-ORFs erstreckt, in den Expressionsvektor kloniert (→ Zwischenvektor 1). Im folgenden Schritt wurde mittels PCR und dem Primerpaar 4149/4150 ein etwa 600 bp langes Fragment aus pSARM4 amplifiziert, an welches über die Primer eine terminale XhoI- (5') bzw. ApaI- (3') Schnittstelle angefügt wurden. Dieses Fragment erstreckt sich über das CTE sowie die gesamte 3'-LTR von MPMV. Ein weiterer etwa 1500 bp langer Abschnitt, welcher den 3'-Bereich des *pol*-ORFs umfasst, wurde in einer PCR mit dem Primerpaar 4147/4148 aus pSARM4 amplifiziert. Über die Primer wurde eine terminale BamHI- (5') bzw. XhoI- (3') Schnittstelle an das PCR-Produkt angefügt. Diese beiden Amplifikate wurden jeweils in den pcDNA3.1 zeo-Vektor zwischenkloniert. Als nächstes folgte eine weitere 3-Fragment-Ligation. Die beiden letzteren PCR-Produkte wurden durch präparative Verdaus mit XhoI/PmeI bzw. BamHI/XhoI aus dem jeweiligen pcDNA3.1 zeo-Vektor herausgeschnitten und mit

Ergebnisse

den Zwischenvektor 1 ligiert, welcher zuvor mit BamHI/PmeI verdaut wurde (→ Zwischenvektor 2). Anschließend wurde in einer PCR mit dem Primerpaar 4180/4181 aus pczHSRV2 ein etwa 900 bp langer Abschnitt amplifiziert, welcher die N-terminalen 303 As des PFV Gag-Proteins codiert. Über die Primer wurde eine NheI- (5') bzw. AflII- (3') Schnittstelle angefügt. Dieses PCR-Produkt wurde in den pcDNA3.1 zeo-Vektor zwischenkloniert. Ebenso wurde in einer PCR mit dem Primerpaar 4182/4183 aus pSARM4 ein etwa 2000 bp langes Fragment amplifiziert, welches den gesamten *gag*-ORF ab As-Kodon V95 sowie den 5'-Bereich des *pro*-ORFs von MPMV umfaßt. Über die Primer wurde eine AflII- (5') bzw. BamHI- (3') Schnittstelle angefügt. Für eine Spaltung des Gag-Vorläuferproteins zwischen der MA- und der pp24/16-Untereinheit benötigt die virale Protease die sechs C-terminalen As von MA als Teil der Erkennungssequenz (Rhee und Hunter, 1990). Dementsprechend wurden die 18 bp am 3'-Ende der MA-Protein-kodierenden Sequenz des *gag*-ORFs mitamplifiziert. Die beiden letzteren PCR-Produkte wurden durch präparative Verdauung mit NheI/AflII bzw. AflII/BamHI aus dem jeweiligen pcDNA3.1 zeo-Vektor herausgeschnitten und mit dem Zwischenvektor 2 ligiert, welcher zuvor mit NheI/BamHI verdaut wurde (→ Zwischenvektor 3). Der letzte Schritt bestand in der Gewinnung eines etwa 1500 bp langen Fragmentes aus pSARM4 mittels präparativen BamHI-Verdauung. Dieses umfaßt den 3'-Bereich des *pro*-ORFs sowie den 5'-Bereich des *pol*-ORFs. Durch Ligation dieses Fragmentes mit dem Zwischenvektor 3, welcher zuvor ebenfalls mit BamHI verdaut wurde, entstand das PFV/MPMV-Hybridplasmid (pDM1).

Parallel zu diesem wurde ein MPMV-WT-Plasmid (pDM2) konstruiert, welches in den folgenden Versuchen als Positivkontrolle diente. Der Ablauf dieser Klonierung verlief analog zu der des Hybridplasmides, mit dem Unterschied, daß das WT-Plasmid den gesamten MPMV *gag*-ORF enthielt und somit weniger Klonierungsschritte notwendig waren. Außerdem wurde ein Expressionsplasmid für MPMV Env hergestellt (pDM38). Dafür wurden der gesamte *env*-ORF sowie das CTE (etwa 2000 bp) aus pSARM4 mittels PCR unter Verwendung der Primer 4151/4152 amplifiziert. Über die Primer wurde eine XhoI- (5') bzw. ApaI- (3') Schnittstelle angefügt. Dieses PCR-Produkt wurde mit XhoI/ApaI verdaut und mit dem XhoI/ApaI verdauten pcDNA3.1 zeo-Vektor ligiert. In Abb. 7 ist eine Übersicht über diese Konstrukte mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen dargestellt.

Ergebnisse

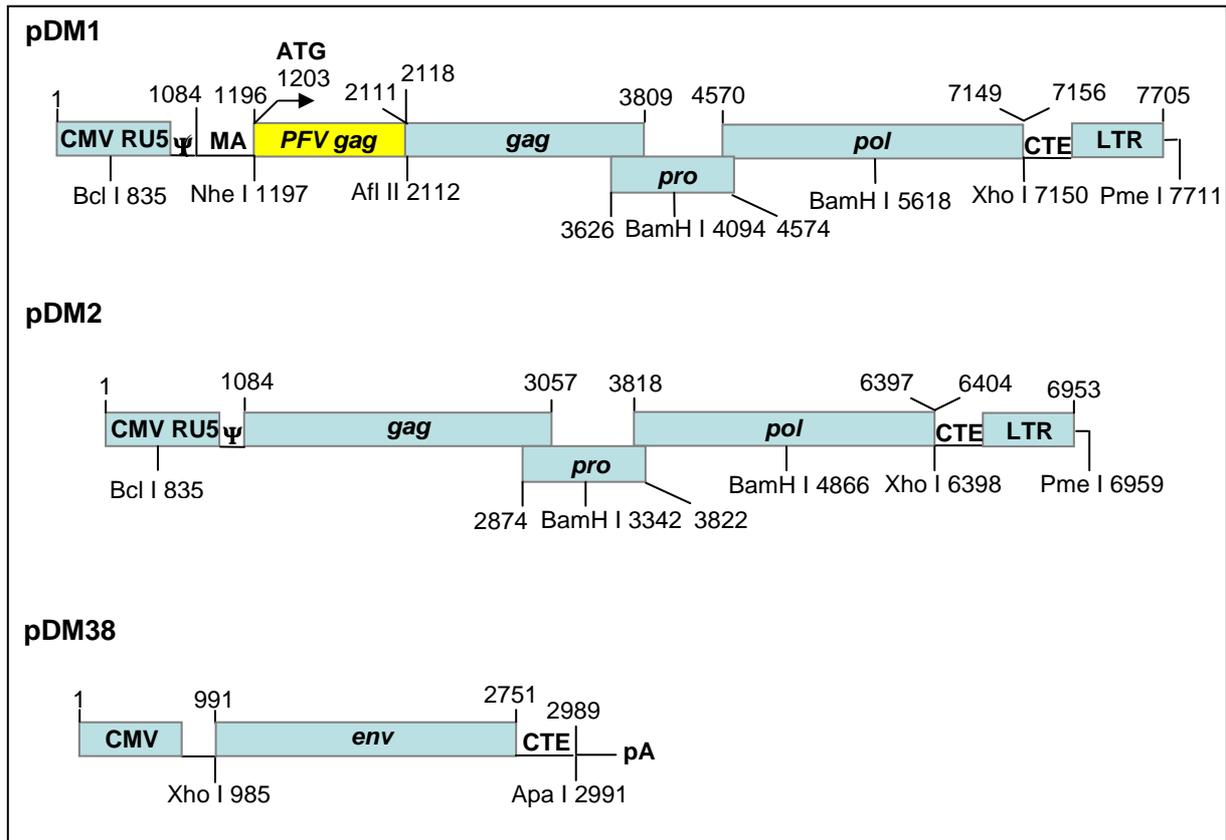


Abb. 7: Übersicht über das PFV/MPMV-Hybridplasmid (pDM1), das MPMV-WT-Plasmid (pDM2) sowie das Expressionsplasmid für MPMV Env (pDM38) mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen

3.1.2. Überprüfung der Funktionalität der Konstrukte

Als erstes wurde die Funktionalität der Konstrukte überprüft sowie der Frage nachgegangen, ob der zelluläre Export der chimären PFV/MPMV-Kapside von der Anwesenheit des PFV Glykoproteins abhängig ist. Dies geschah mittels Western Blot- (WB) Analyse. Dazu wurden 293T-Zellen in 10cm-Schalen entweder mit dem Hybridplasmid pDM1 oder mit dem MPMV-WT-Plasmid pDM2 (jeweils 8 μ g) zusammen mit Expressionsplasmiden für PFV Env (pCenv1), MPMV Env (pDM38), für das Glykoprotein des vesikulären Stomatits-Virus (pczVSV-G wt) oder mit pcDNA3.1 (leerer Kontrollvektor, kodiert für keine viralen Proteine) (jeweils 8 μ g) kotransfiziert. 48 h nach Transfektion (n.T.) wurden zellfreie Virusüberstände geerntet und Viruspartikel durch Ultrazentrifugation präpariert. Zur Kontrolle der zellulären Expression der Konstrukte pDM1 und pDM2 wurden Zellysate hergestellt. Die Viruspartikelpräparationen sowie die Zellysate wurden durch Kochen in SDS-Probenpuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das CA-Protein der MPMV- bzw. chimären PFV/MPMV-Kapside

Ergebnisse

in einer WB-Analyse mit einem polyklonalen Kaninchen- α -MPMV p27 Antiserum (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. T. Ruml), 1:1000 verdünnt, detektiert. Die Detektion des primären Ak erfolgte mit einem polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako), 1:2000 verdünnt.

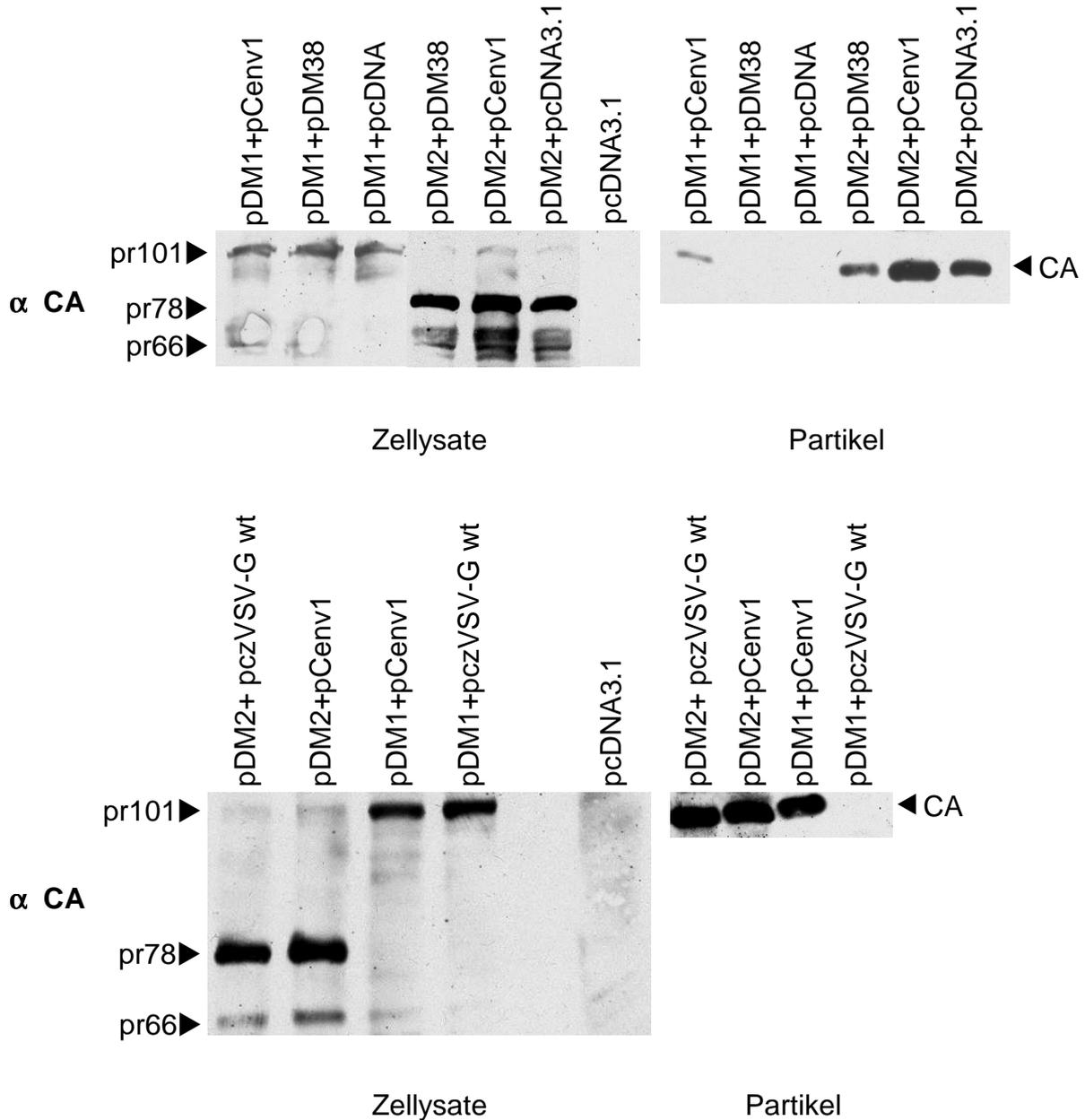


Abb. 8: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung chimärer Gag-Proteine von pDM1 bzw. MPMV Gag von pDM2; 293T-Zellen wurden mit pDM1 oder pDM2 zusammen mit Expressionsvektoren für PFV Env, MPMV Env, VSV-G bzw. mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1) transfiziert. Zelllysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des CA-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -MPMV p27 Antiserum 1:1000 verdünnt und einem sekundären polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako) 1:2000 verdünnt

Ergebnisse

Wie Abb. 8 zeigt, fand eine zelluläre Gag-Expression von pDM1 sowie pDM2 statt. Die chimären Gag-Vorläufermoleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 101 kDA wurden ebenso detektiert wie die MPMV WT Gag-Vorläufermoleküle (pr78) mit einem Molekulargewicht von 78 kDA. Zusätzlich war eine Bande mit einem geringeren Molekulargewicht zu erkennen. Diese könnte partiell prozessiertem Gag entsprechen, von dessen N-Terminus der PFV Gag-Anteil (im Falle der Gag-Chimären) bzw. der MA-Anteil (im Falle der MPMV WT-Gag-Moleküle) durch die virale Protease entfernt wurde. Die berechnete Masse dieser teilweise prozessierten Gag-Moleküle beträgt etwa 66 kDA. Es schien dabei eine stärkere Gag-Expression von pDM2 als von pDM1 stattzufinden. Aus dem WB der Partikelpräparationen geht hervor, daß MPMV WT-Kapside durch das homologe Glykoprotein zellulär exportiert wurden. Ebenso fand eine Gag-Freisetzung in der Anwesenheit des PFV Env-Proteins statt. In der Abwesenheit von Env-Protein fand eine Freisetzung von Gag in Form von VLPs statt. Im Gegensatz dazu war der zelluläre Export der chimären Gag-Moleküle PFV Env restringiert. Wurde das MPMV Glykoprotein koexprimiert oder war kein Env-Protein in der Zelle vorhanden, so war kein CA-Protein im Überstand detektierbar. Wie in Kap. 1.2.3.3. erläutert, können orthoretrovirale Kapside mit heterologem Env pseudotypisiert werden (Friedmann et al., 1995, Swanstrom und Wills, 1997). Abb. 8 ist zu entnehmen, daß MPMV-WT-Kapside mit dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisiert werden konnten. Im Falle der chimären Kapside war dies jedoch nicht möglich. Damit konnte die Funktionalität der Konstrukte pDM1 und pDM2 bestätigt werden und pDM1 für Mutagenesestudien verwendet werden. Dabei sollte als erstes durch Einführen verschiedener Deletionen eine grobe Eingrenzung eines Env-interagierenden Motives vorgenommen werden.

3.1.3. Analyse des PFV Env-spezifischen Exportes von *gag*-Deletionsmutanten

Die As 9-18 des PFV Gag-Proteins bilden vermutlich ein cc-Motiv aus (Cartellieri et al., 2005). Dieser Proteinabschnitt wurde in der N-terminalen Deletionsmutante pDM3 (Δ 2-20) deletiert. Mittels PCR und unter Verwendung der Primer 4342/4206 wurden die As 21-303 des PFV *gag*-ORFs aus pczHSRV2 amplifiziert, das Amplifikat mit NheI/AfIII (NheI-Schnittstelle über den Primer 4342 eingeführt) verdaut und mit dem NheI/AfIII verdauten Vektor pDM1 ligiert.

Ergebnisse

Desweiteren wurde eine interne Deletion des PFV *gag*-ORFs zwischen den As 80-120 vorgenommen. Dazu wurden in einer ersten PCR unter Verwendung der Primer 4076/4343 die As 1-79 des PFV *gag* ORFs aus pDM1 amplifiziert und das Amplifikat mit KasI/Agel (Agel-Schnittstelle über den Primer 4343 eingeführt) verdaut. In einer zweiten PCR unter Verwendung der Primer 4344/4206 wurden die As 121-303 des PFV *gag* ORFs aus pczHSRV2 amplifiziert und das Amplifikat mit Agel/AfIII (Agel-Schnittstelle über den Primer 4344 eingeführt) verdaut. In einer 3-Fragment-Ligation wurden diese beiden PCR-Produkte mit dem KasI/AfIII verdauten Vektor pDM1 ligiert und somit die Deletionsmutante pDM4 (Δ 80-120) erhalten.

Wilk et al., 2001 konnten eine spezifische Interaktion der N-terminalen FFV Gag-Domäne (As 1-154) mit Peptidabschnitten des FFV Env LP zeigen. In einem Proteinalignment der Gag-Proteine von PFV und FFV entsprechen die N-terminalen 154 As von FFV Gag den N-terminalen 197 As von PFV Gag. Dementsprechend wurden in einer PCR unter Verwendung der Primer 4076/4205 die N-terminalen 197 As des PFV *gag*-ORFs aus pDM1 amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit KasI/AfIII (AfIII-Schnittstelle über den Primer 4205 eingeführt) verdaut und mit dem KasI/AfIII verdauten Vektor pDM1 ligiert. Dies lieferte die Deletionsmutante pDM5 (Δ C197). In einem nächsten Schritt wurde eine weitere Deletion zweier cc-Motive (As 130-150, 160-180) vorgenommen. Unter Verwendung der Primer 4076/4204 wurden in einer PCR aus pDM1 die N-terminalen 132 As des PFV *gag*-ORFs amplifiziert, das Amplifikat mit KasI/AfIII (AfIII-Schnittstelle über den Primer 4204 eingeführt) verdaut und mit dem KasI/AfIII verdauten Vektor pDM1 ligiert. Die entsprechende Deletionsmutante wurde pDM6 (Δ C132) genannt. In einem letzten Schritt wurde der PFV Gag-Anteil des chimären Proteins bis zur As 65 deletiert. Diese Deletionsmutante enthält noch die α -Helix am N-Terminus sowie das CTRS, welches für die Lokalisation des Kapsidzusammenbaus am MTOC verantwortlich ist. Unter Verwendung der Primer 4076/4341 wurde dieser Abschnitt des *gag*-ORF in einer PCR aus pDM1 amplifiziert, das Amplifikat mit KasI/AfIII (AfIII-Schnittstelle über den Primer 4341 eingeführt) verdaut und mit dem KasI/AfIII verdauten Vektor pDM1 ligiert. Diese Deletionsmutante wurde pDM7 (Δ C65) genannt. In den Deletionsmutanten pDM5, pDM6 sowie pDM7 wurde das PSAP-Motiv, welches zur Freisetzung von PFV Gag benötigt wird, deletiert. Zwei als L-Domänen fungierende PPPY- und PSAP-Motive innerhalb der pp24/16-Untereinheit von MPMV Gag komplementierten dieses jedoch (Yasuda und Hunter, 1998, Gottwein et al., 2003),

Ergebnisse

sodaß ein Late-Budding-Defekt infolge fehlender L-Domänen-Funktion nicht wahrscheinlich erschien.

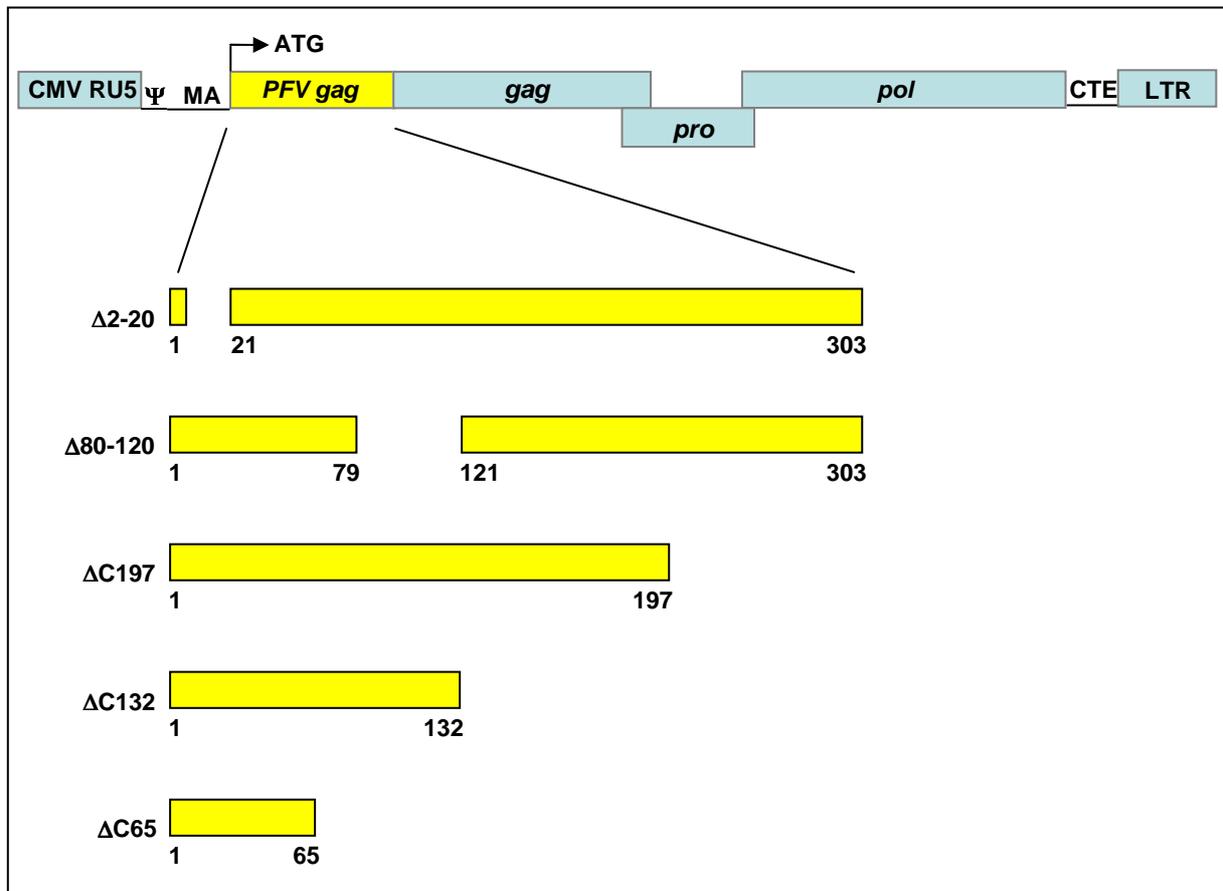


Abb. 9: Übersicht über die im PFV gag-ORF eingeführten Deletionen

293T-Zellen wurden in 10cm-Schalen mit pDM1 oder den jeweiligen Deletionsmutanten (jeweils 8 µg) zusammen mit 8 µg pCenv1 kotransfiziert. 48 h nach n.T. wurden zellfreie Virusüberstände geerntet und Viruspartikel durch Ultrazentrifugation präpariert. Zur Kontrolle der zellulären Expression der verschiedenen Gag-Konstrukte wurden Zellysate hergestellt. Die Partikelpräparationen sowie die Zellysate wurden nach Denaturierung mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und das CA-Protein der Gag-Chimären in einer WB-Analyse mit einem polyklonalen α-CA-Antiserum (1:1000) detektiert. Die Detektion des primären Ak erfolgte mit einem polyklonalen Ziege-α-Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000).

Ergebnisse

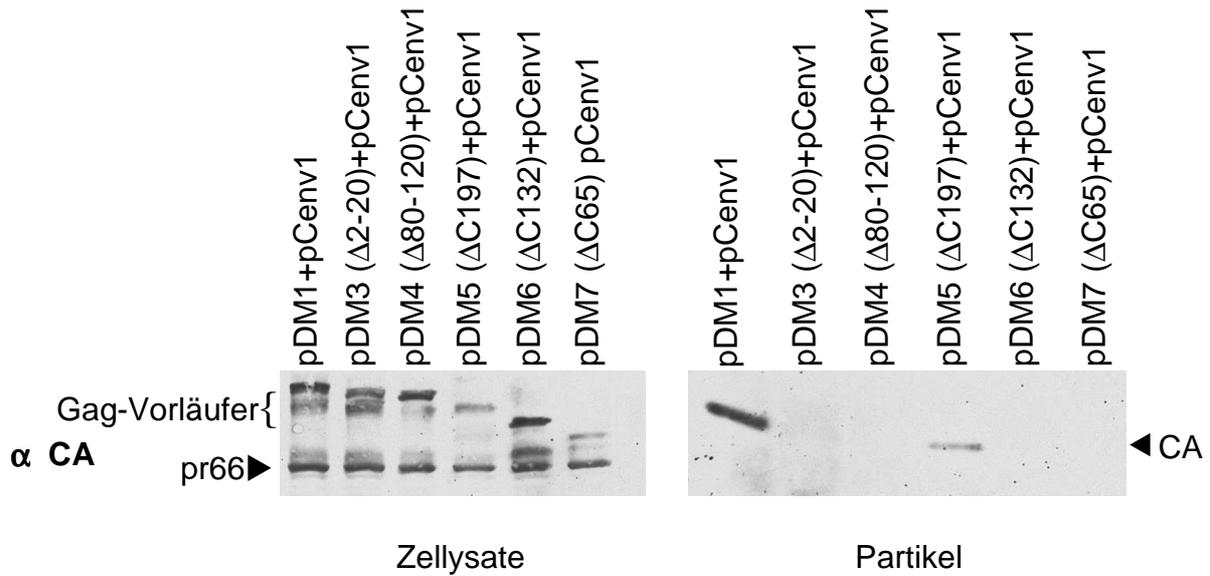


Abb. 10: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV *gag*-Deletionsmutanten; 293T-Zellen wurden mit pDM1 oder den verschiedenen Deletionsmutanten zusammen mit dem PFV Env-Expressionsvektor pCenv1 transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des CA-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -MPMV p27 Antiserum 1:1000 verdünnt und einem sekundären polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako) 1:2000 verdünnt

Im WB der Zellysate waren die Hybrid-Gag-Vorläufermoleküle zu erkennen, die je nach Ausmaß der Deletion unterschiedliche Molekülmassen aufwiesen. Ebenso war partiell prozessiertes Gag mit einem Molekulgewicht von etwa 66 kDA zu erkennen. Aus dem WB der Partikelpräparationen geht hervor, daß die N-terminalen 197 As von PFV Gag ausreichend waren, um PFV Env-abhängig aus der Zelle exportiert zu werden. wenngleich die CA-Bande eine schwächere Intensität aufwies als im Falle der Gag-Chimären ohne Deletion. Weitergehende C-terminale Deletionen im PFV Gag-Anteil der chimären Gag-Proteine verhinderten jedoch die Freisetzung von Gag. Ebenso führte die Deletion der N-terminalen 20 As in pDM3 (Δ 2-20) zu einem Verlust der Env-abhängigen Gag-Freisetzung. Auch die interne Deletion in pDM4 (Δ 80-120) führte dazu, daß kein CA-Protein mehr in den Partikelpräparationen detektierbar war.

3.1.4. Analyse des PFV Env-spezifischen Exportes von *gag*-Alaninmutanten

Zusätzlich zu den Deletionsstudien wurde ein Alaninscreening beginnend vom N-Terminus bis zum Beginn des CTRS in PFV Gag durchgeführt. Dabei wurden zuerst Blöcke von je drei aufeinanderfolgenden As zu Alanin mutiert. In den Fällen, in denen dies eine PFV Env-abhängigen Gag-Freisetzung verhinderte, wurden die

Ergebnisse

betreffenden As jeweils einzeln zu Alanin mutiert. Sämtliche Alaninmutanten wurden mittels PCR unter Verwendung der terminalen Primer 4076/4206 hergestellt. Über spezifische mutagene Primerpaare wurden die jeweiligen Alaninsubstitutionen eingeführt (Übersicht in Kap. 2.1.9. Oligonukleotide). Die Amplifikate wurden mit KasI/AfIII verdaut und mit dem KasI/AfIII verdauten Vektor pDM1 ligiert.

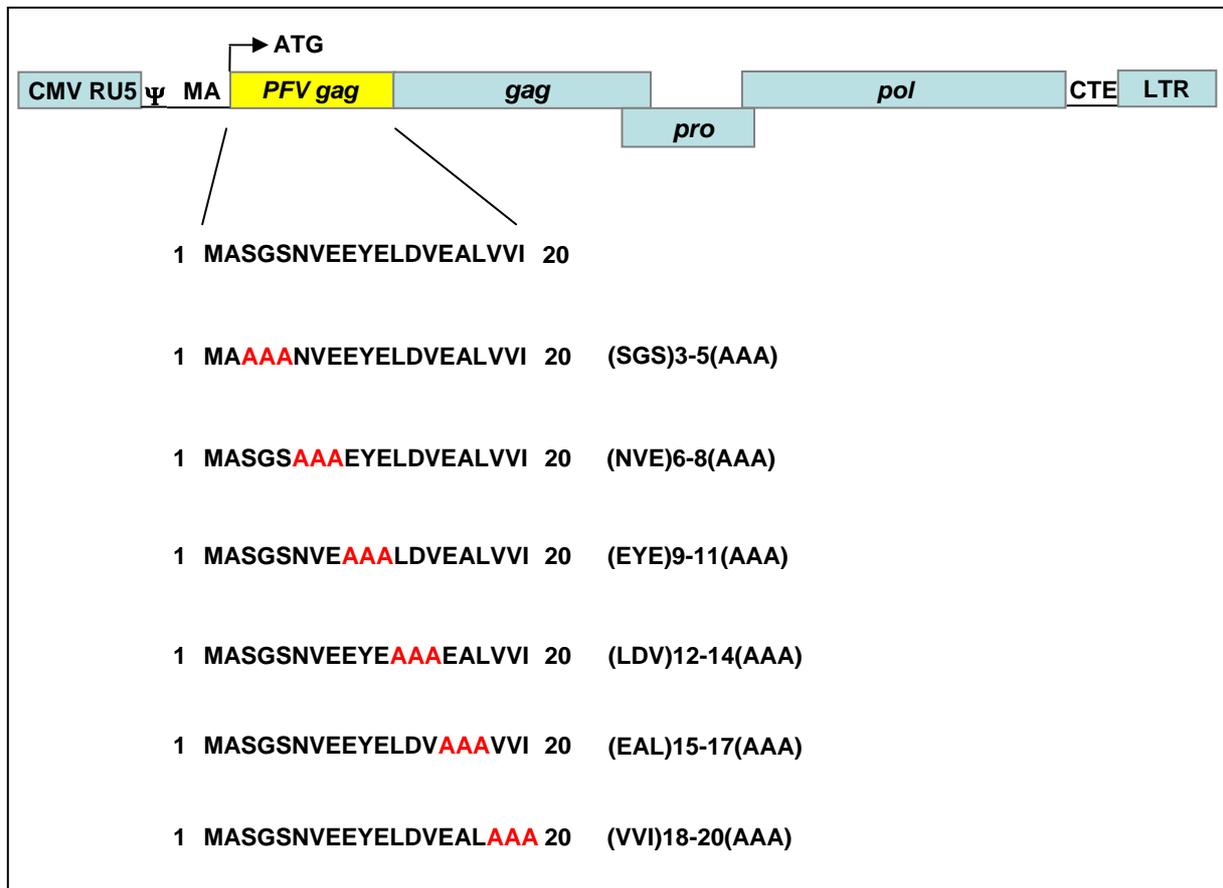


Abb. 11: Übersicht über die im PFV gag-ORF eingeführten Alaninsubstitutionen zwischen den As 1-20

293T-Zellen wurden in 10 cm-Schalen mit pDM1 oder den jeweiligen Alaninmutanten (jeweils 8 μ g) zusammen mit 8 μ g pCenv1 kotransfiziert. 48 h nach n.T. wurden zellfreie Virusüberstände geerntet und Viruspartikel durch Ultrazentrifugation präpariert. Zur Kontrolle der zellulären Gag-Expression wurden Zellysate hergestellt. Das CA-Protein der Gag-Chimären wurde in einer WB-Analyse mit einem polyklonalen Kaninchen- α -MPMV p27 Antiserum (1:1000) detektiert. Die Detektion des primären Ak erfolgte mit einem polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000).

Ergebnisse

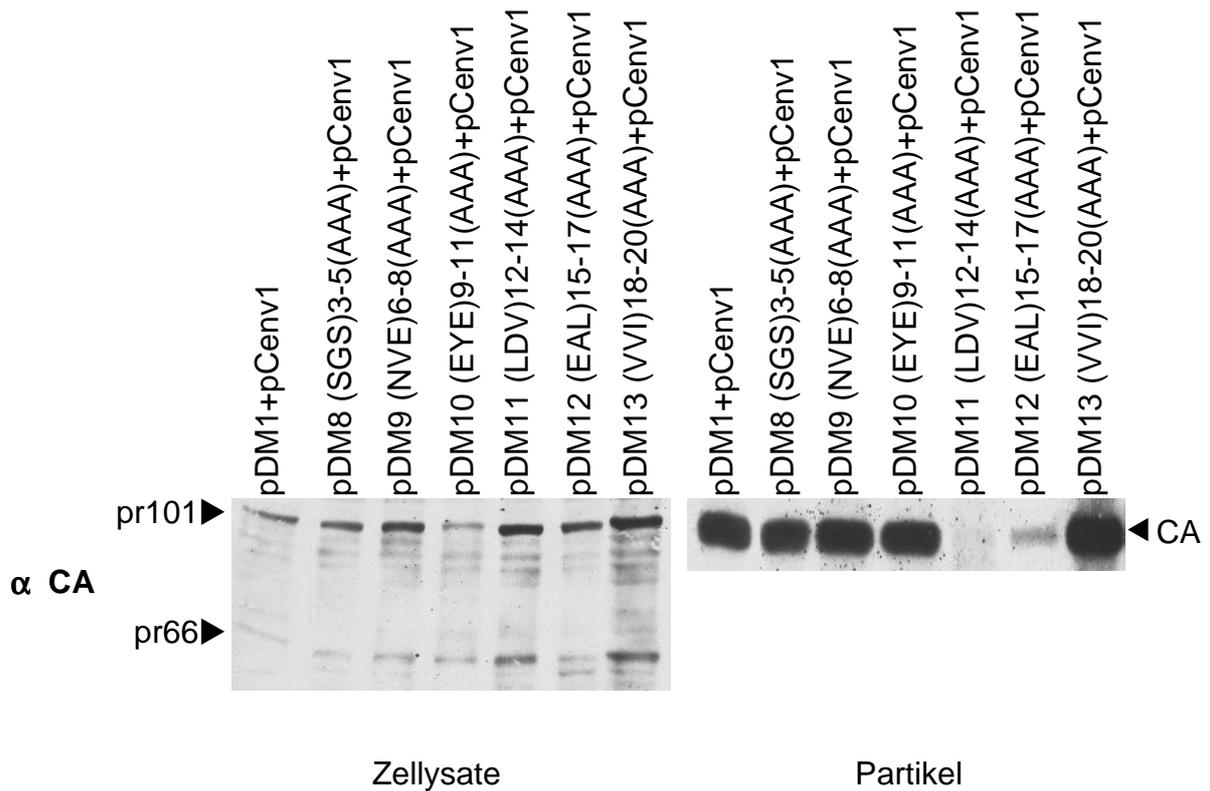


Abb. 12: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV *gag*-Alaninmutanten; 293T-Zellen wurden mit pDM1 oder den verschiedenen Alaninmutanten zusammen mit dem PFV Env-Expressionsvektor pCenv1 transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des CA-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -MPMV p27 Antiserum 1:1000 verdünnt und einem sekundären polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako) 1:2000 verdünnt

Wie dem WB der Partikelpräparationen zu entnehmen ist, verhinderte der Austausch der As 12-14 in pDM11 (LDV)12-14(AAA) eine PFV Env-abhängige Gag-Freisetzung. Auch die Mutante pDM12 (EAL)15-17(AAA) zeigte nur noch einen sehr geringen Gag-Export. Alle übrigen Mutanten zeigten eine mit pDM1 vergleichbare Freisetzung von Gag. Demzufolge wurden die As 12-17 in einem späteren Schritt jeweils einzeln zu Alanin mutiert. Im WB der Zellysate waren geringe Unterschiede in den Intensitäten der CA-Banden festzustellen, die jedoch die Aussagekraft des WB der Partikelpräparationen nicht minderten.

Ergebnisse

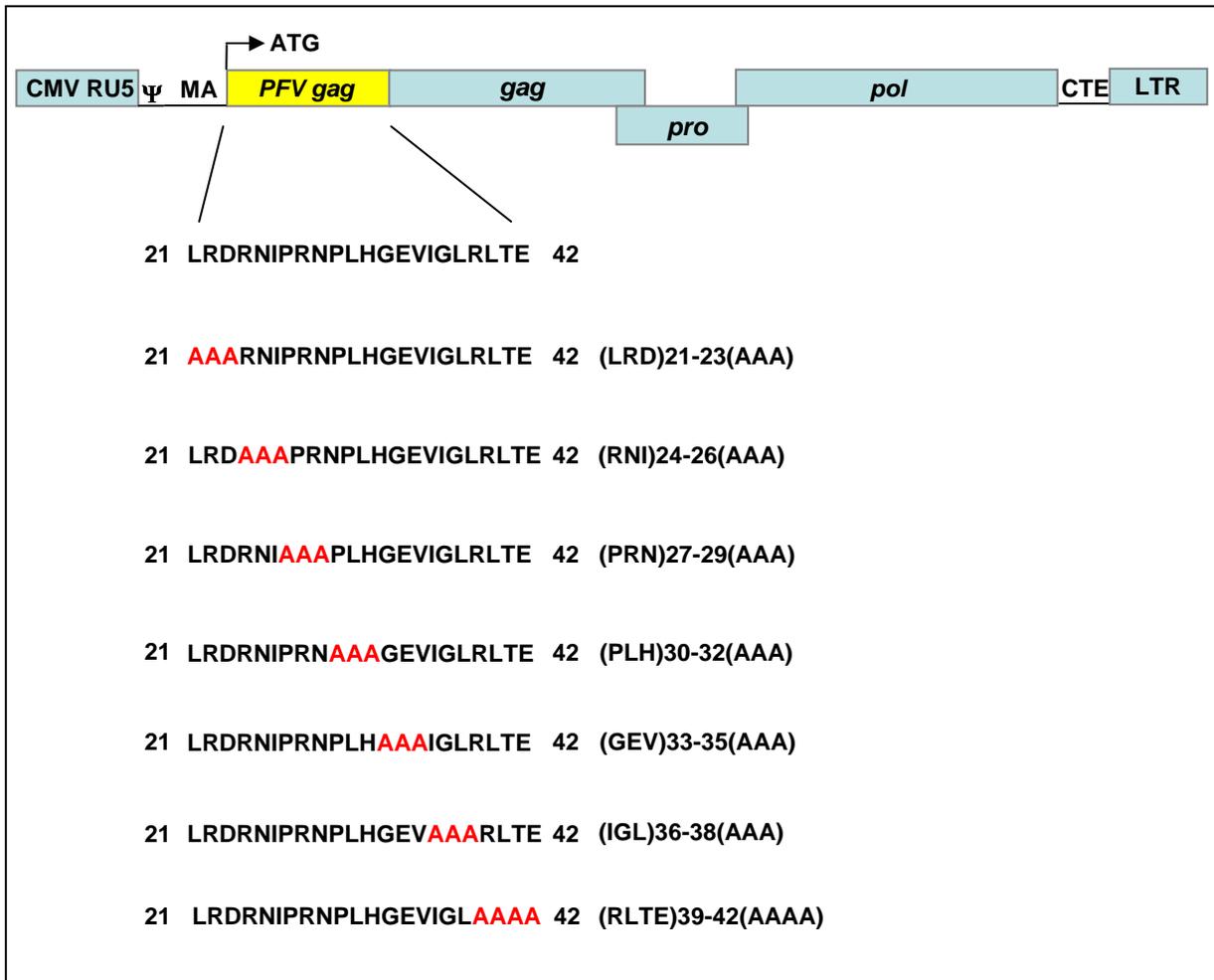
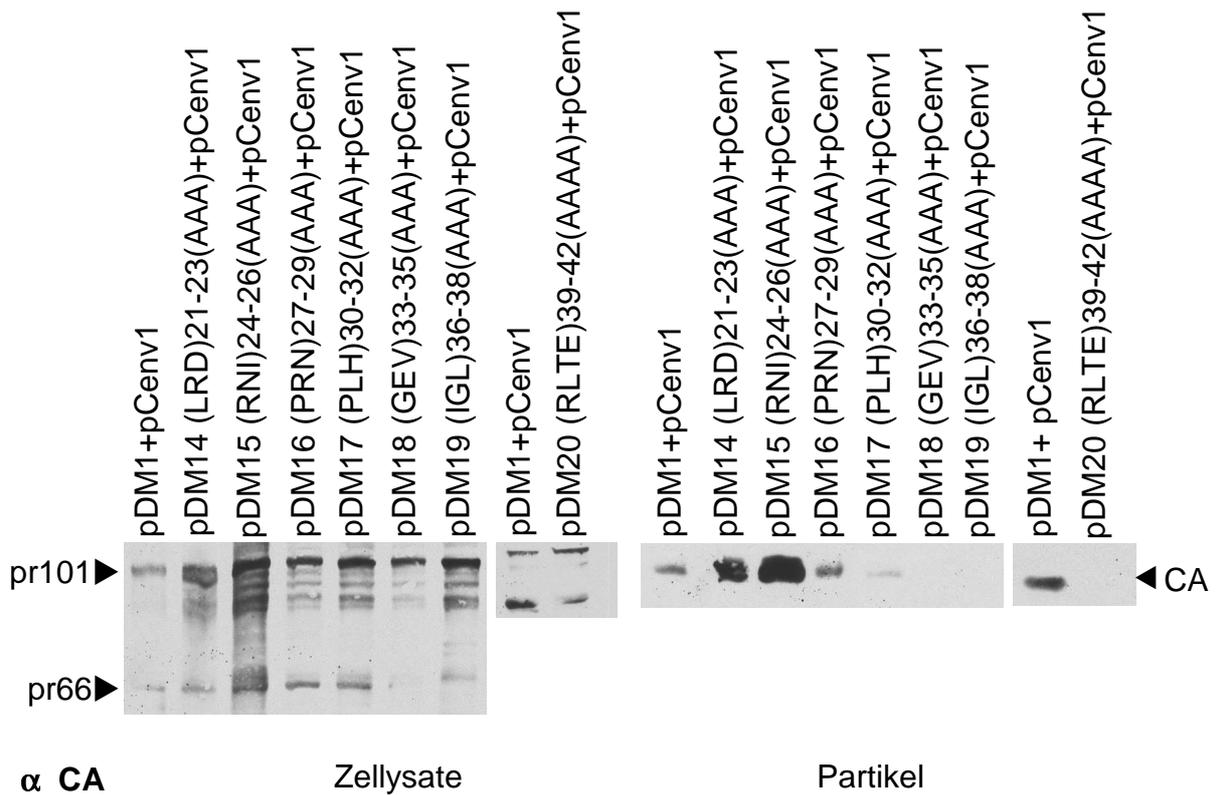


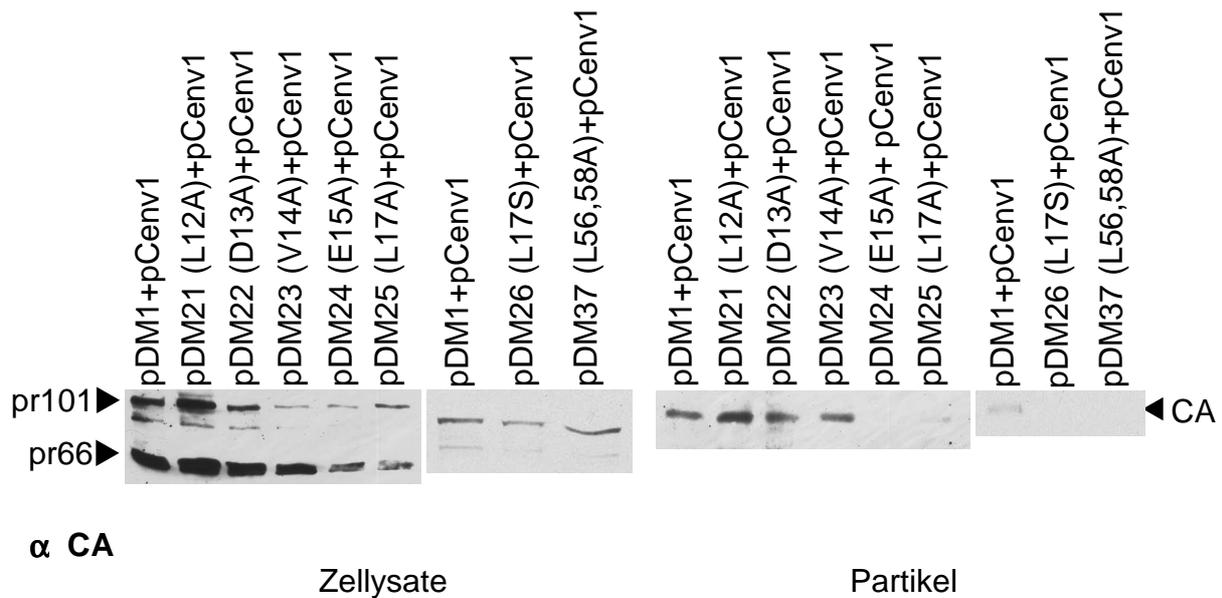
Abb. 13: Übersicht über die im PFV gag-ORF eingeführten Alaninsubstitutionen zwischen As 21-42



Ergebnisse

Abb. 14 (vorhergehende Seite): Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV *gag*-Alaninmutanten; 293T-Zellen wurden mit pDM1 oder den verschiedenen Alaninmutanten zusammen mit dem PFV Env-Expressionsvektor pCenv1 transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des CA-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -MPMV p27 Antiserum 1:1000 verdünnt und einem sekundären polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako) 1:2000 verdünnt

Die Substitution der As 21-23 sowie 24-26 gegen Alanin führte zu einer verglichen mit pDM1 stärkeren Gag-Freisetzung, jedoch wurden auch in den Zellysaten stärkere CA-Signale dieser Mutanten detektiert. Die Mutante pDM16 (PRN)27-29(AAA) wies eine mit pMD1 vergleichbare Freisetzung von chimärem Gag auf. Im Falle von pDM17 (PLH)30-32(AAA) war diese verringert, die Alaninmutanten pDM18 (GEV)33-35(AAA), pDM19 (IGL)36-38(AAA) sowie pDM20 (RLTE)39-42(AAAA) zeigten keinen Gag-Export mehr. Infolge dessen wurden die As 33-42 jeweils einzeln zu Alanin mutiert.



Ergebnisse

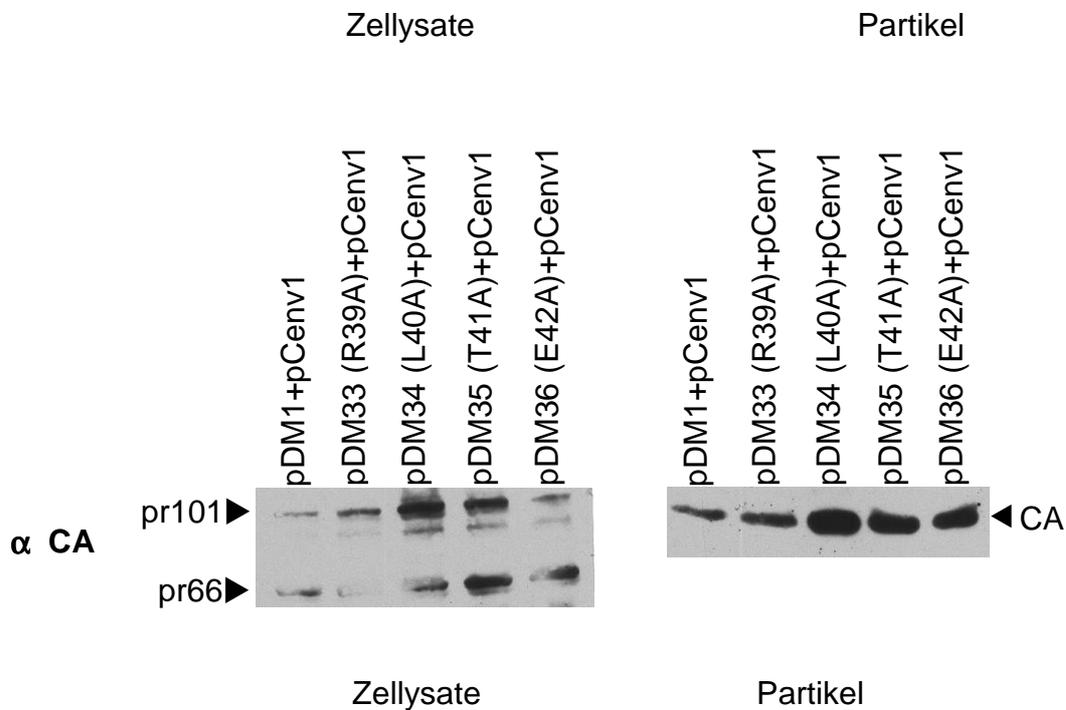
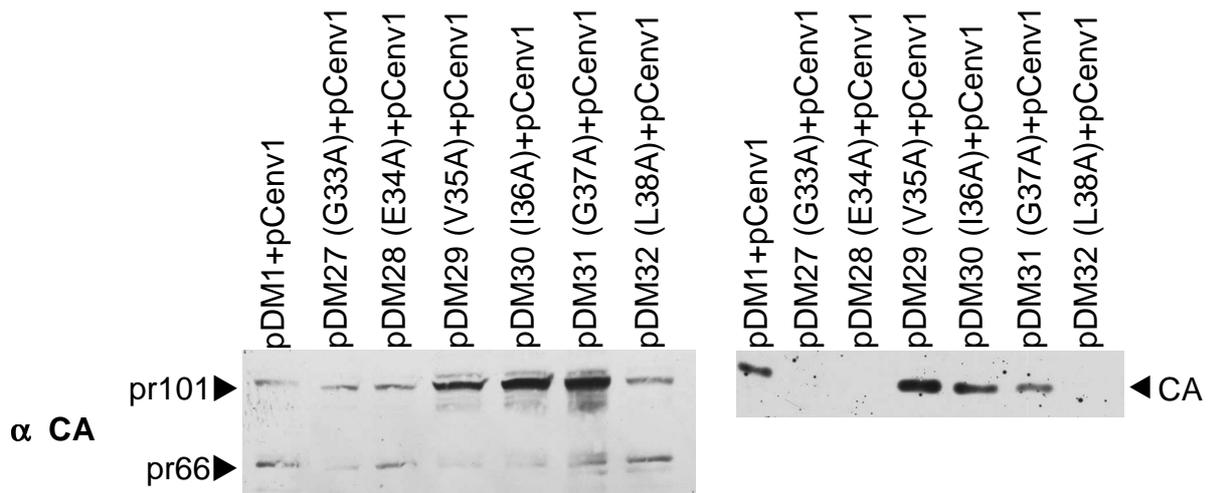


Abb. 15: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV *gag*-Alaninmutanten; 293T-Zellen wurden mit pDM1 oder den verschiedenen Alaninmutanten zusammen mit dem PFV Env-Expressionsvektor pCenv1 transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des CA-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -MPMV p27 Antiserum 1:1000 verdünnt und einem sekundären polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako) 1:2000 verdünnt

Wie zu erkennen ist, hatte die Substitution der As L12, D13 und V14 gegen Alanin keinen Einfluß auf den PFV Env-abhängigen Gag-Export. Die Mutation der As E15 zu Alanin verhinderte die Freisetzung von Gag, im Falle der L17A-Mutante war diese stark verringert. Wurde die As L17 jedoch gegen Serin substituiert, so war dagegen kein CA-Protein mehr im Überstand detektierbar. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Cartellieri et al. 2005, der die Mutationen L17A sowie L17S in den

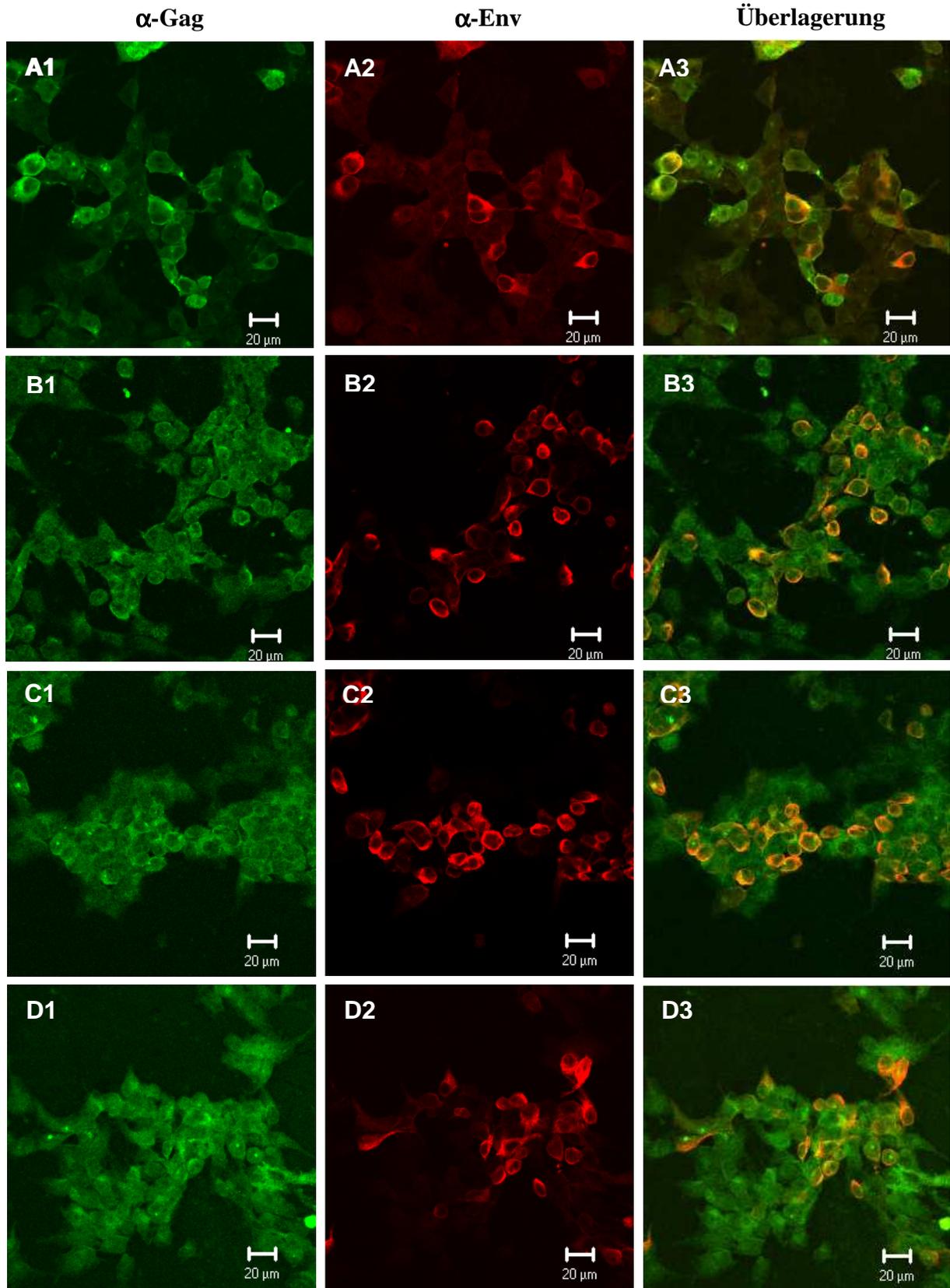
Ergebnisse

infektiösen PFV-Klon pcHSRV2 einführte. Neben der Mutante E15A zeigten auch die Mutanten G33A, E34A sowie L38A keinen Export von chimärem Gag mehr. Wie im pcHSRV2-Kontext (Cartellieri et al. 2005) konnte auch in dieser Arbeit für die Mutante L56,58A kein Gag mehr im Überstand detektiert werden. Im Falle der Mutante (RLTE)39-42(AAAA) konnte zwar kein Gag im Überstand nachgewiesen werden (s.o.), die Einzelmutanten R39A, L40A, T41A und E42A zeigten jedoch keine Beeinträchtigung des Gag-Exportes. Somit wurden die Mutanten E15A, G33A, E34A sowie L38A mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Analyse sowie der Erstellung von EM-Aufnahmen weitergehend untersucht.

3.1.5. Immunfluoreszenzanalyse Export-negativer Alaninmutanten

Mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Analyse sollten etwaige Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation im Vergleich zu Gag-Chimären mit WT-Sequenz nachgewiesen werden. Dazu sollte durch gleichzeitige Färbung des PFV Env-Proteins und Überlagerung der Aufnahmen eine Kolo-kalisation dieser beiden Proteine untersucht werden. Dazu wurden 293T-Zellkulturen in 6 cm-Schalen mit den jeweiligen Alaninmutanten (jeweils 3 µg) zusammen mit 3 µg pCenv1 kotransfiziert. In einer Kinetik viraler Partikelpräparationen nach transienter Transfektion wurde ein Zeitraum zwischen 24 - 48 h n.T. ermittelt, in welchem die Partikelfreisetzung ein Maximum erreicht (Cartellieri et al., 2005). Um ein Überladen der transfizierten Zellen mit viralen Proteinen und eine dadurch bedingte erschwerte Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen zu vermeiden, wurde die Fixierung der Zellen in dieser Arbeit bereits nach 28 h n.T. vorgenommen (s. Kap. 2.3.5.). Als Positivkontrolle dienten Zellen, welche mit dem infektiösen PFV-Klon pczHSRV2 transfiziert wurden. Die Markierung des PFV-Anteils der Gag-Chimären erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (Kaninchen-α-PFV Gag 122, 1:50 verdünnt), die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem sekundären, FITC-markierten Antikörper (Schwein-α-Kaninchen IgG-FITC, 1:40 verdünnt). Für die Markierung des Env-Proteins wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet (Maus-α-PFV Env SU P3E10, 1:2 verdünnt), für dessen Detektion ein sekundärer, Cy3-markierter Antikörper (Ziege-α-Maus IgG-Cy3, 1:500 verdünnt).

Ergebnisse



Ergebnisse

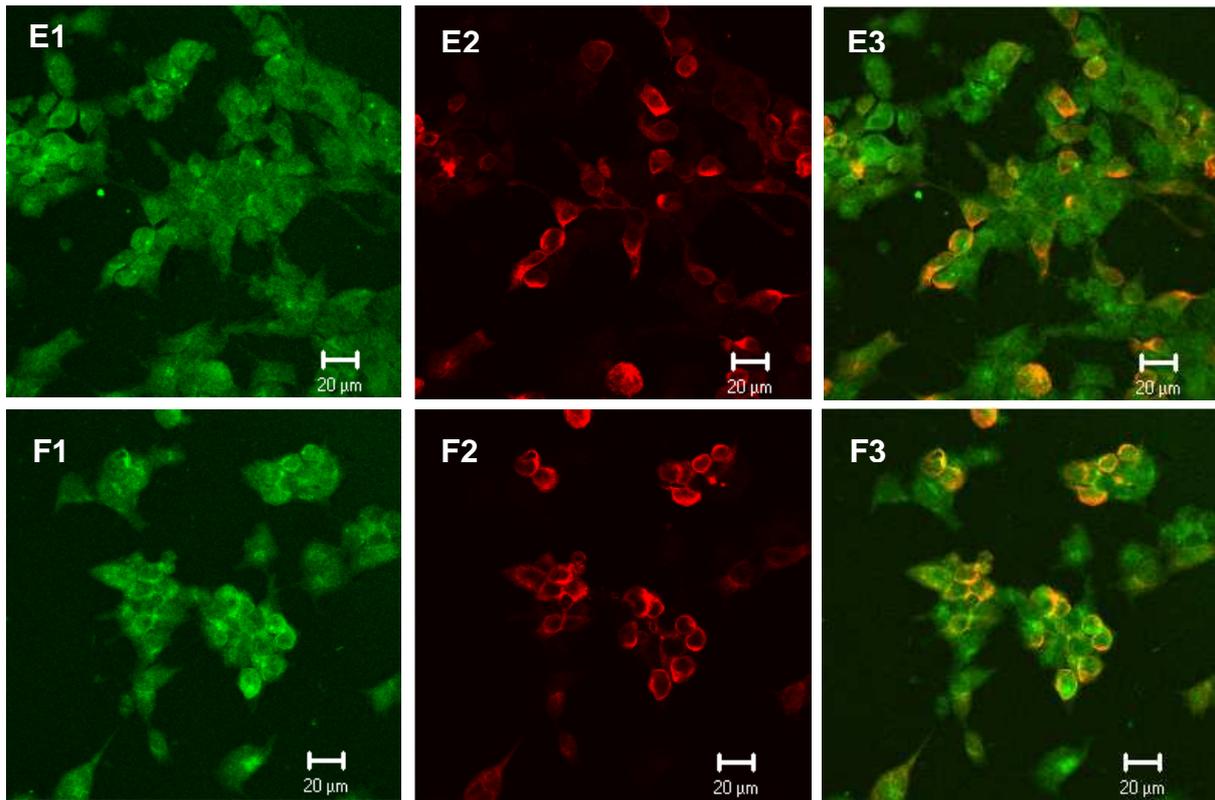


Abb. 16: IF-Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit (A) pczHSRV2, (B) pDM1+pCenv1, (C) pDM24 (E15A)+pCenv1, (D) pDM27 (G33A)+pCenv1, (E) pDM28 (E34A)+pCenv1, (F) pDM32 (L38A)+pCenv1; (1): Markierung mit einem primären AK gegen PFV Gag (Kaninchen- α -PFV Gag 122, 1:50) und einem sekundären FITC-markiertem AK (Schwein- α -Kaninchen IgG-FITC, 1:40), (2): Markierung mit einem primären AK gegen PFV Env (Maus- α -PFV Env SU P3E10, 1:2) und einem sekundären Cy3-markierten AK (Ziege- α -Maus IgG-Cy3, 1:500), (3): Kolokalisation von (1) und (2)

In der mit dem proviralen Konstrukt pczHSRV2 transfizierten Zellkultur konnte eine punktuelle Ansammlung (Spots) der Gag-Proteine in der Nähe des Nukleus beobachtet werden. Verantwortlich hierfür ist das bereits beschriebene CTRS im N-Terminus von PFV Gag (Yu et al., 2006). Zudem lagen die Gag-Proteine diffus im Zytoplasma verteilt vor. Diese Beobachtungen decken sich mit bereits in der Literatur beschriebenen (Cartellieri et al., 2005, Yu et al., 2006). In den mit pDM1 bzw. den verschiedenen Alaninmutanten transfizierten Zellkulturen war kein qualitativer Unterschied in der intrazellulären Gag-Verteilung im Vergleich zum Phänotyp der Positivkontrolle festzustellen, lediglich die Stärke der Gag-Expression schien etwas geringer zu sein. Demnach verhielten sich die chimären Gag-Proteine mit Hinblick auf die transiente perinukleäre Akkumulation wie PFV Gag-Proteine, höchstwahrscheinlich bedingt durch das CTRS. Auch die vorgenommenen Alaninsubstitutionen im PFV-Anteil der Gag-Chimären führten zu keiner veränderten intrazellulären Lokalisation. Das Env-Protein lag zum Teil ebenfalls diffus im Zytoplasma verteilt vor, darüber hinaus konnte in allen Aufnahmen auch eine

Ergebnisse

ausgeprägte Membranlokalisation beobachtet werden. Eine Interferenz der Fluoreszenzen, welche auf eine Kolo-kalisation von Gag und Env schließen ließ, führte zu einer Gelb- bis Orange-Färbung in den Aufnahmen. Sowohl im Falle der mit pczHSRV2 als auch der mit pDM1 sowie den verschiedenen Mutanten transfizierten Zellkulturen konnte eine solche Interferenzfärbung festgestellt werden. Diese war dabei zum Teil punktuell nahe des Nukleus lokalisiert, vergleichbar mit der Verteilung des Gag-Proteins. Eine Kolo-kalisation von Gag und Env an der Zellmembran konnte jedoch ebenso beobachtet werden. Die Resultate der IF-Analyse zeigten, daß sich die chimären Gag-Proteine im Hinblick auf ihre intrazelluläre Lokalisation sowie die Kolo-kalisation mit dem PFV Glykoprotein nicht von PFV Gag-Proteinen unterscheiden. Zudem deuteten die Aufnahmen darauf hin, daß die vorgenommenen Alaninsubstitutionen in Gag keine Auswirkung auf die Kolo-kalisation mit Env haben.

3.1.6. EM-Analyse Export-negativer Alaninmutanten

Zur Bestimmung der Morphologie sowie der intrazellulären Lokalisation der chimären Kapside sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt werden. Für deren Anfertigung wurden 293T-Zellen in 10 cm-Schalen mit jeweils 8 µg der Plasmide pDM1, pDM24 (E15A), pDM27 (G33A), pDM28 (E34A) oder pDM32 (L38A) zusammen mit 8 µg pCenv1 kotransfiziert. Als Positivkontrolle wurden 293T-Zellen mit dem infektiösen PFV-Klon pczHSRV2 transfiziert. 48 h n.T. wurden die Zellen mit einer Glutaraldehydlösung fixiert (s. Kap. 2.3.6.). Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Zentgraf und seiner Arbeitsgruppe am DKFZ in Heidelberg übernommen. In den mit pczHSRV2 transfizierten Zellen waren sowohl intrazelluläre Kapside wie auch extrazelluläre Viruspartikel zu erkennen. Ebenso war die Abschnürung reifer Viruspartikel an zellulären Membranen zu beobachten. Leider waren in den mit pDM1, pDM24 (E15A), pDM27 (G33A), pDM28 (E34A) sowie pDM32 (L38A) transfizierten Zellen keinerlei Kapside oder partikuläre Strukturen zu erkennen. Es schien, als ob die chimären Gag-Proteine nicht in der Lage waren, zu Kapsiden zu aggregieren, im Falle von pDM1 jedoch noch die Fähigkeit zu einer Interaktion mit dem PFV Glykoprotein aufwiesen. Auf mögliche Gründe dafür soll jedoch in der Diskussion genauer eingegangen werden.

Ergebnisse

3.1.7. Expression der Export-negativen Alaninmutanten in pczHSRV2

Aufgrund des negativen Ergebnisses der EM-Analyse bestand das weitere Vorgehen darin, die vier Alaninsubstitutionen, welche im pDM1-Kontext eine PFV Env-Freisetzung verhinderten, im pczHSRV2-Kontext zu exprimieren. Dafür wurde mittels PCR unter Verwendung der terminalen Primer 4392/4393 ein etwa 1700 bp langer Sequenzabschnitt zwischen der PBS und dem *gag*-ORF aus pcHSRV2 amplifiziert und über spezifische mutagene Primerpaare die jeweiligen Alaninsubstitutionen eingeführt (Übersicht in Kap. 2.1.9. Oligonukleotide). Die Amplifikate wurden mit KasI/SwaI verdaut und mit dem KasI/SwaI verdauten Vektor pczHSRV2 ligiert. Dies lieferte die vier Substitutionsmutanten pczHSRV2 M159 (E15A), pczHSRV2 M160 (G33A), pczHSRV2 M161 (E34A) sowie pczHSRV2 M162 (L38A).

Zunächst wurde mittels WB-Analyse untersucht, ob in den Überständen von mit diesen Mutanten transfizierten 293T-Zellkulturen extrazelluläres Virus nachzuweisen war. Dazu wurden Partikelpräparationen sowie Zellysate hergestellt und die denaturierten Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion des Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen PFV Gag-Antiserum 1:1000 verdünnt. Als sekundärer Ak wurde ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) verwendet.

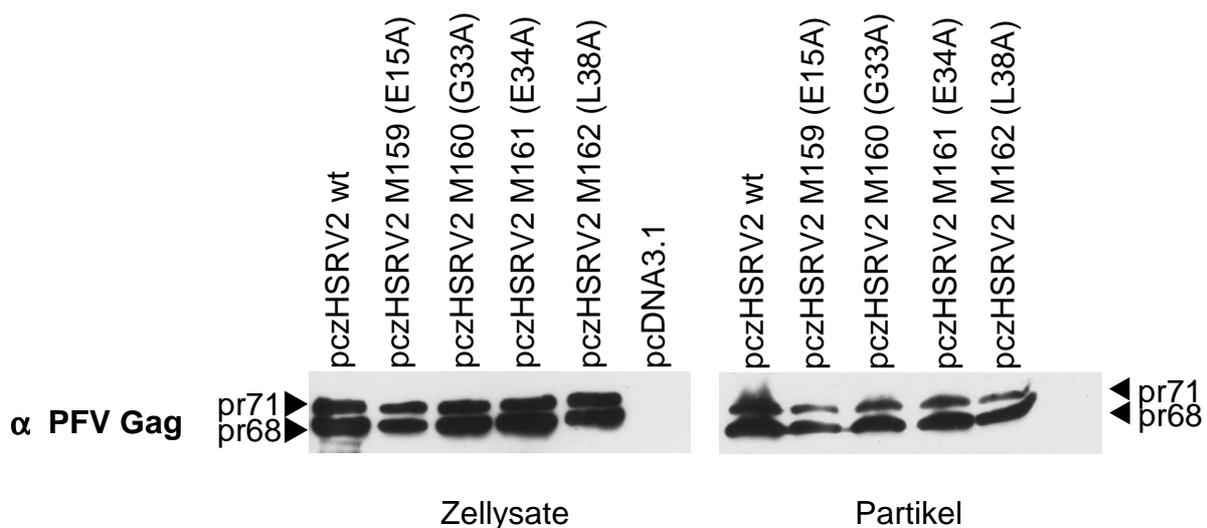


Abb. 17: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pczHSRV2 *gag*-Alaninmutanten; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 oder den verschiedenen Alaninmutanten transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des PFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -PFV Gag-Antiserum 1:1000 verdünnt und einem sekundären polyklonalen Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako) 1:2000 verdünnt.

Ergebnisse

Durch Inkubation der Blots mit dem PFV Gag-Antiserum wurden die charakteristischen Doppelbanden sichtbar, welche dem unprozessierten Vorläuferprotein pr71 sowie der prozessierten Form pr68 entsprachen. Wie dem WB der Partikelpräparationen zu entnehmen ist, wiesen die im pczHSRV2-Kontext exprimierten Alaninmutanten keinen vom WT abweichenden Phänotyp bezüglich des PFV Env-abhängigen Exportes auf. Dies steht im Widerspruch zu jenen Ergebnissen, welche im Kontext des PFV/MPMV-Hybridplasmids ermittelt wurden. Mögliche Ursachen dafür sollen in der Diskussion erörtert werden.

3.1.8. Immunfluoreszenzanalyse der pczHSRV2-Alaninmutanten

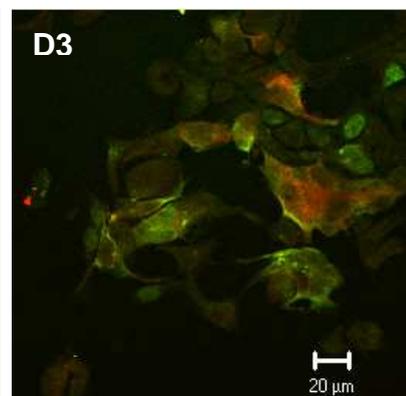
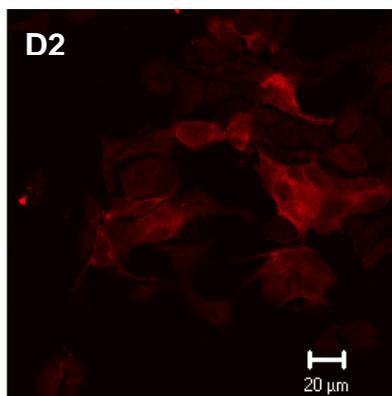
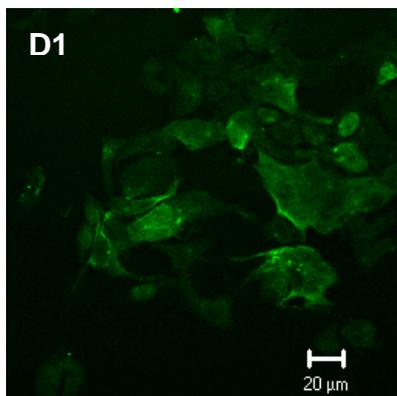
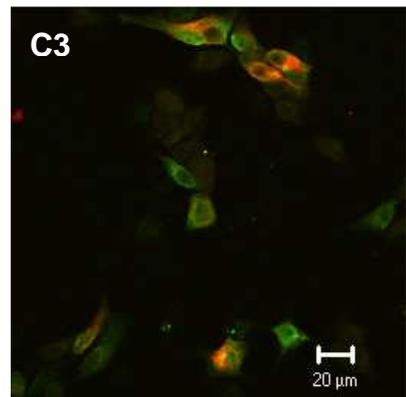
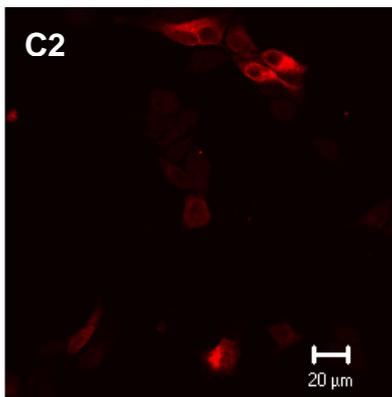
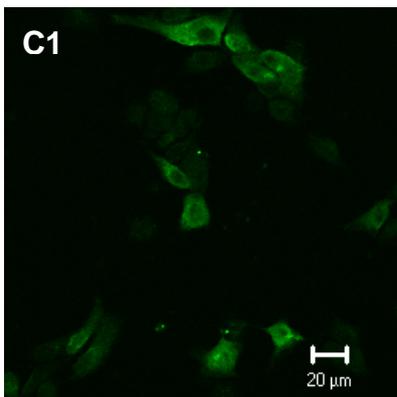
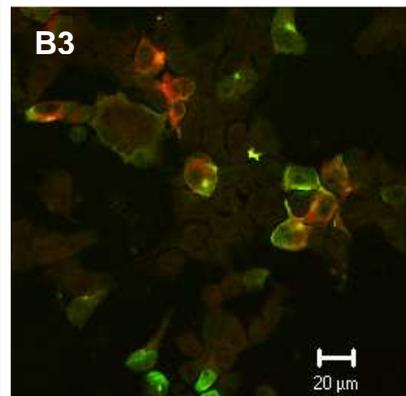
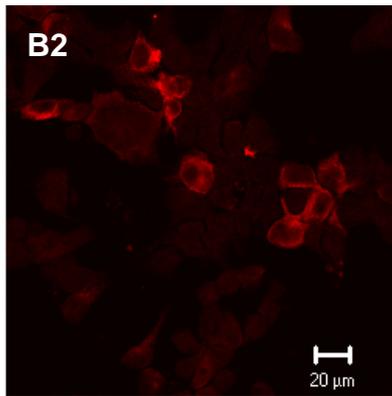
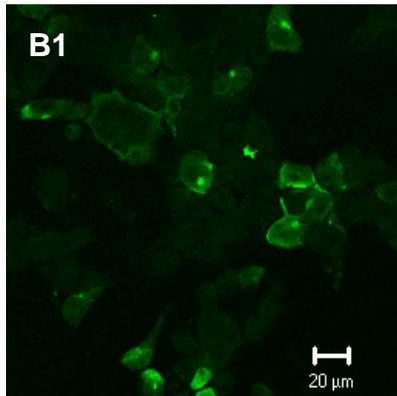
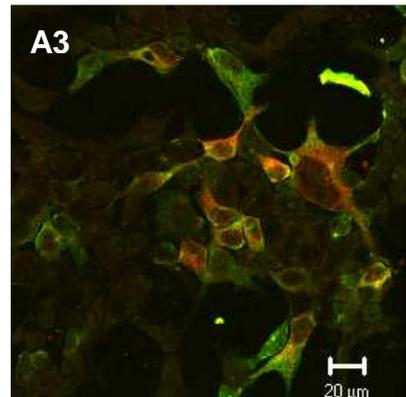
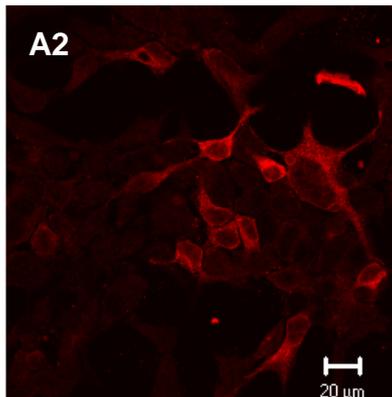
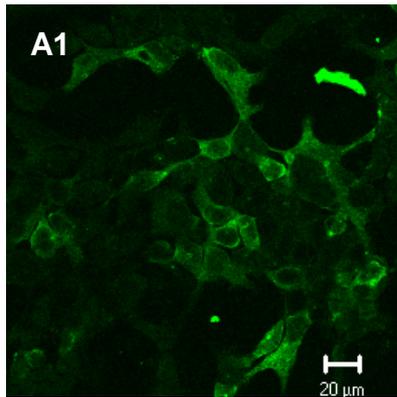
Mittels einer Immunfluoreszenzanalyse sollte wie schon für die Gag-Chimären untersucht werden, ob die eingeführten Mutationen im pczHSRV2-Kontext zu Unterschieden in der intrazellulären Lokalisation der Gag-Proteine führten. Zudem sollte durch gleichzeitige Färbung des PFV Env-Proteins und Überlagerung der Aufnahmen eine Kolo-kalisation dieser beiden Proteine untersucht werden. Dazu wurden analog zur Durchführung in Kap. 3.1.5. 293T-Zellkulturen in 6 cm-Schalen mit 6 µg der entsprechenden Konstrukte transfiziert und 28 h n.T. fixiert. Die Markierung des Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (Kaninchen-α-PFV Gag 122, 1:50 verdünnt), die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem sekundären, FITC-markierten Antikörper (Schwein-α-Kaninchen IgG-FITC, 1:40 verdünnt). Für die Markierung des Env-Proteins wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet (Maus-α-PFV Env SU P3E10, 1:2 verdünnt), für dessen Detektion ein sekundärer, Cy3-markierter Antikörper (Ziege-α-Maus IgG-Cy3, 1:500 verdünnt).

Ergebnisse

α -Gag

α -Env

Überlagerung



Ergebnisse

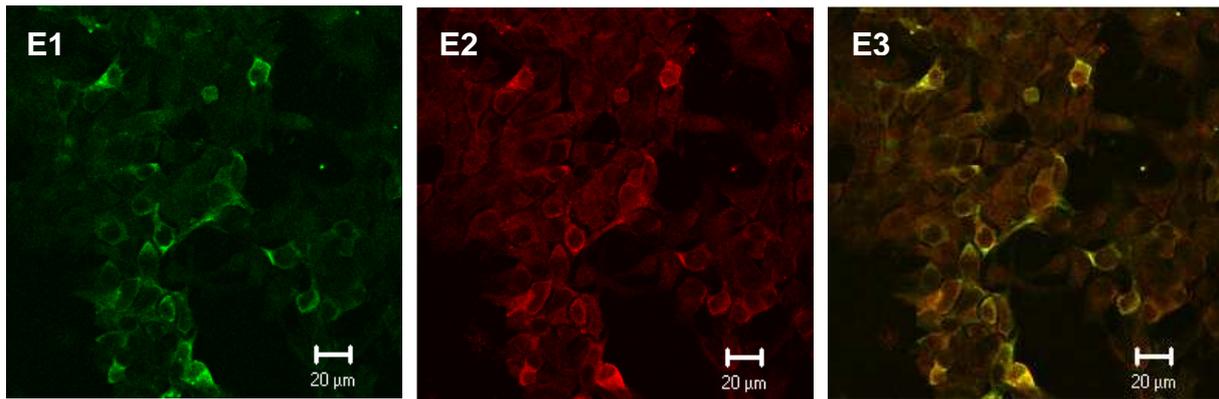


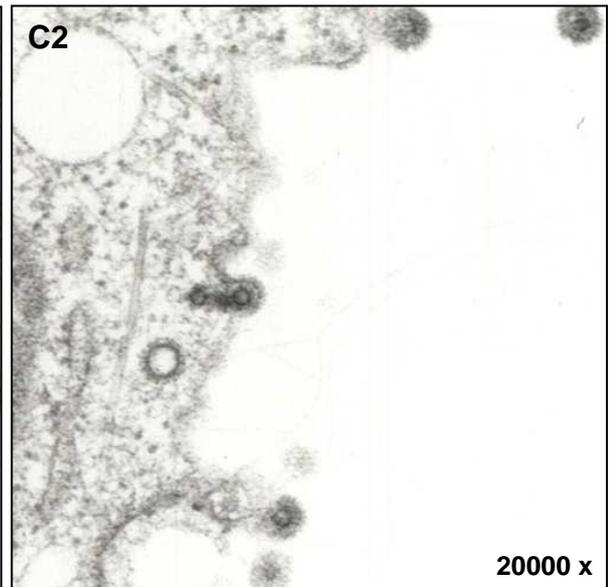
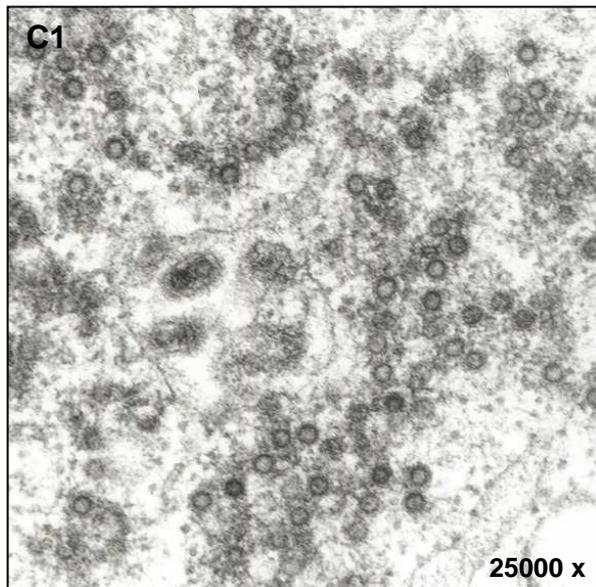
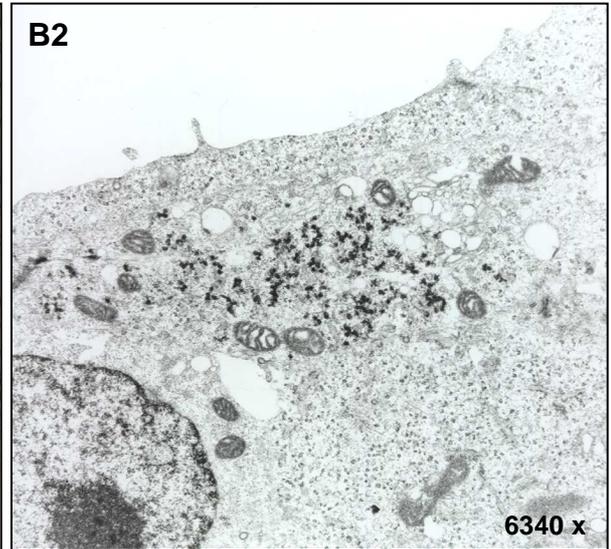
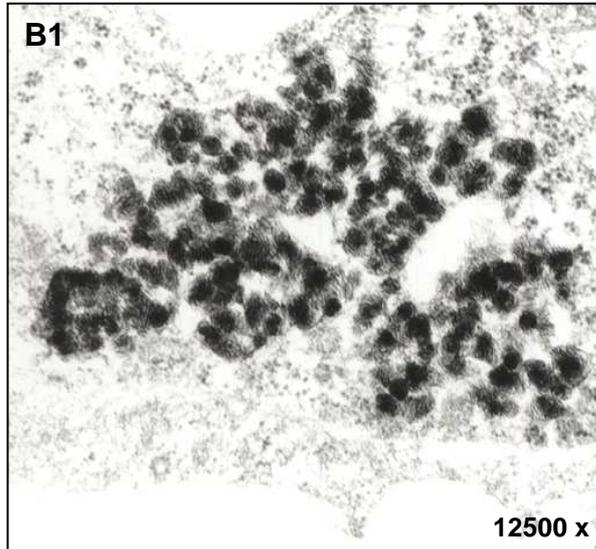
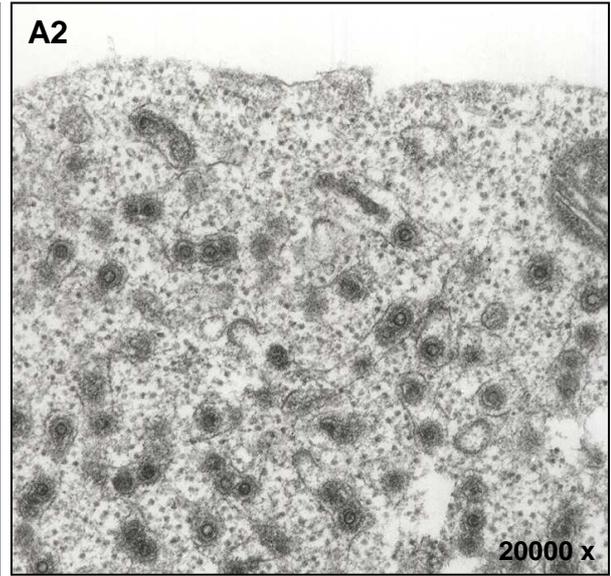
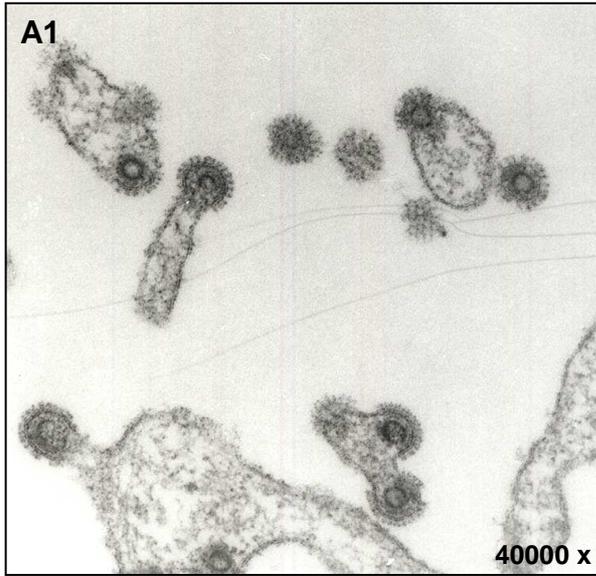
Abb. 18: IF-Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit (A) pczHSRV2 wt, (B) pczHSRV2 M159 (E15A), (C) pczHSRV2 M160 (G33A), (D) pczHSRV2 M161 (E34A), (E) pczHSRV2 M162 (L38A); (1): Markierung mit einem primären AK gegen PFV Gag (Kaninchen- α -PFV Gag 122, 1:50) und einem sekundären FITC-markiertem AK (Schwein- α -Kaninchen IgG-FITC, 1:40), (2): Markierung mit einem primären AK gegen PFV Env (Maus- α -PFV Env SU P3E10, 1:2) und einem sekundären Cy3-markierten AK (Ziege- α -Maus IgG-Cy3, 1:500), (3): Kolokalisation von (1) und (2)

Wie zu erkennen ist, akkumulierten sowohl die Wildtyp- als auch die mutierten Gag-Proteine in der Nähe des Nukleus zu punktuellen Ansammlungen (vgl. Aufnahmen in Kap. 3.1.5.). Demnach führten die vorgenommenen Alaninsubstitutionen im pczHSRV2-Kontext zu keiner veränderten intrazellulären Lokalisation von Gag. Das Env-Protein lag zum Teil ebenfalls diffus im Zytoplasma verteilt vor, jedoch konnte in mehreren Aufnahmen auch eine ausgeprägte Membranlokalisierung beobachtet werden. Sowohl im Falle der mit pczHSRV2 als auch der mit den verschiedenen Mutanten transfizierten Zellkulturen konnte eine Interferenzfärbung und damit eine Kolokalisation von Gag und Env festgestellt werden. Diese war dabei hauptsächlich punktuell nahe des Nukleus lokalisiert (gut zu erkennen in Abb. C3 und E3). Ebenso konnte eine Kolokalisation von Gag und Env an der Zellmembran beobachtet werden (siehe Abb. D3 und E3). Die Resultate der IF-Analyse standen im Einklang mit der WB-Analyse in Kap. 3.1.7. und zeigten, daß die im pczHSRV2-Kontext vorgenommenen Alaninsubstitutionen in Gag keine Auswirkung auf die Kolokalisation mit Env hatten.

3.1.9. EM-Analyse der pczHSRV2-Alaninmutanten

Für die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurden 293T-Zellen in 10 cm-Schalen mit je 8 μ g pcHSRV2 als Positivkontrolle bzw. einer der vier Substitutionsmutanten zusammen mit 8 μ g pcDNA3.1 kotransfiziert, 48 h n.T. fixiert und von Herrn Prof. Dr. Zentgraf und seiner Arbeitsgruppe weiter aufgearbeitet.

Ergebnisse



Ergebnisse

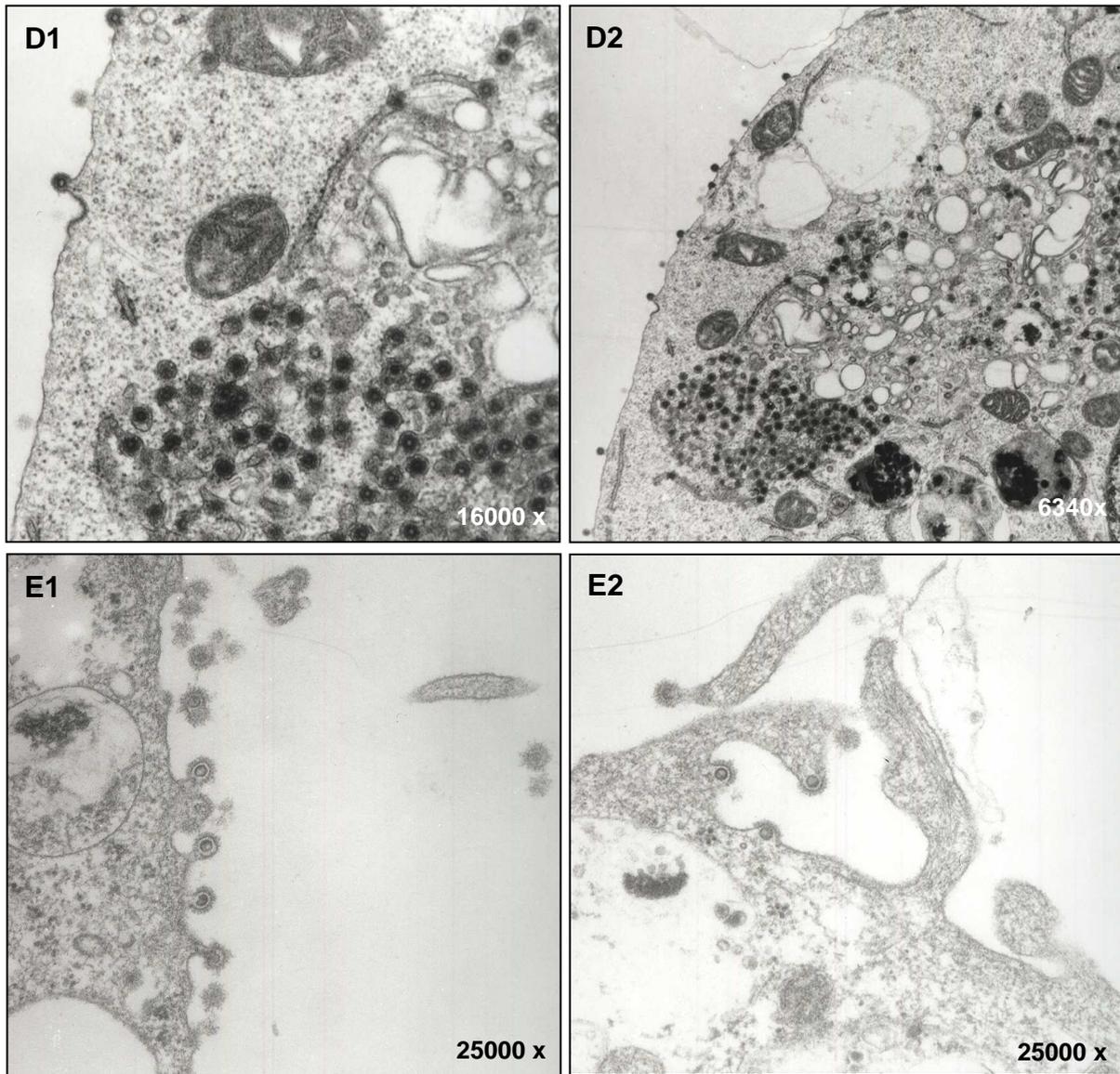


Abb. 19: EM-Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit (A) pczHSRV2 wt, (B) pczHSRV2 M159 (E15A) (C) pczHSRV2 M160 (G33A), (D) pczHSRV2 M161 (E34A), (E) pczHSRV2 M162 (L38A)

In den mit pczHSRV2 transfizierten Zellen konnten wiederum intrazelluläre Kapside sowie extrazelluläre Viruspartikel beobachtet werden. In Zellen, welche mit der Mutante pczHSRV2 M159 (E15A) transfiziert wurden, konnten zwar Kapside mit Wildtypmorphologie detektiert werden, welche in intrazellulären Kompartimenten akkumulierten, jedoch waren keine extrazellulären Viruspartikel zu finden. Bei den Mutanten pczHSRV2 M160 (G33A), pczHSRV2 M161 (E34A) sowie pczHSRV2 M162 (L38A) waren in den transfizierten Zellen wiederum intrazelluläre Kapside wie auch freigesetzte Viruspartikel zu finden, deren Morphologie der von Wildtyppartikeln entsprach. Die EM-Aufnahmen deuteten im Gegensatz zur WB-Analyse in Kap. 3.1.7. darauf hin, daß die Substitution der As E15 gegen Alanin Auswirkungen auf

den Export der Kapside aus den Zellen hatte. Die Substitution der As 33, 34 sowie 38 gegen Alanin hatte dagegen keinen Einfluß auf die Partikelfreisetzung.

3.2. Funktionelle Analyse basischer Aminosäurereste in FV Gag

3.2.1. Klonierung von Substitutionsmutanten infektiöser PFV- und FFV-Klone

Wie in Kap. 1.2.8. erläutert, weisen FV Gag-Proteine einen äußerst geringen Lysinanteil auf. Der überwiegende Anteil basischer As wird durch Arginin vertreten (Tab. 3). Für die Translation von Argininen stehen sechs Kodons zur Verfügung: CGG, CGA, CGC, CGU, AGG sowie AGA. Da Lysine von AAG und AAA kodiert werden, würde eine Mutation der jeweils zweiten Base dieser Lysin-Kodons demnach in einer Substitution von Lysin gegen Arginin resultieren. Wie in Tab. 4 ersichtlich, werden im Mittel mehr als 60 % aller Arginine in FV Gag-Proteinen von AGG sowie AGA kodiert, jenen Kodons, welche ursprünglich Lysin kodiert haben könnten. Die Genome von Foamyviren wie auch der meisten anderen Retroviren weisen einen hohen A/T-Gehalt auf. Der mittlere A/T-Gehalt orthoretroviraler Genome beträgt etwa 53%, derjenige foamyviraler Genome ist mit etwa 60 % noch höher (Tab. 5). Eine A zu G-Transition, wie sie für eine Substitution von Lysin gegen Arginin nötig ist, mußte somit gegen einen natürlichen Gradienten von G zu A-Mutationen im übrigen FV-Genom stattgefunden haben. Dies impliziert einen positiven Selektionsdruck auf Gag-Mutanten mit einer Lysin-zu-Arginin-Substitution während der foamyviralen Evolution. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche Funktion Arginine in foamyviralen Gag-Proteinen während der Replikation übernehmen. Zu diesem Zweck wurden in die Gag-Proteine von PFV sowie FFV mehrere Arginin-zu-Lysin-Substitutionen eingeführt und anschließend das Replikationsverhalten dieser Mutanten untersucht. PFV Gag besitzt eine Länge von 648 As und enthält einen einzigen Lysinrest an Position 396. FFV Gag ist mit einer Länge von 514 As kürzer als das der Primaten-FV und vergleichbar mit BFV Gag sowie EFV Gag. Von allen FV Gag-Proteinen besitzt es mit acht Lysinen den größten Anteil dieser As (1,6 %), dennoch wird auch in diesem Fall der überwiegende Anteil basischer As wird durch Arginin vertreten. Sämtliche Lysine sind dabei in der C-terminalen Hälfte von Gag lokalisiert, davon befinden wiederum fünf Lysine innerhalb

Ergebnisse

der pr4-Domäne, welche durch die virale Protease vom pr52-Vorläuferprotein abgespalten wird.

Für die Mutagenesestudien wurden die infektiösen Klone pszHSRV2 (PFV) sowie pChatul-3 (FFV) verwendet. Die Gag-Proteine dieser beiden Vertreter wurden wie in Abb. 20 dargestellt aligned und die entsprechenden Genabschnitte mutiert. Alle Klonierungsprodukte wurden durch analytischen Probeverdaug, PCR-Produkte mittels Sequenzierung auf ihre Korrektheit hin überprüft. Für die Herstellung der PFV *gag*-Substitutionsmutanten wurde mittels PCR unter Verwendung der terminalen Primer 4392/4393 ein etwa 1700 bp langes Fragment aus pczHSRV2 amplifiziert. Dieses erstreckt sich von der PBS bis in den 3'-Bereich des *gag*-ORFs (s. Abb. 21). Über spezifische mutagene Primerpaare wurden die jeweiligen Mutationen eingeführt (Übersicht in Kap. 2.1.9. Oligonukleotide). Die Amplifikate wurden mit KasI/SwaI verdaut und mit dem KasI/SwaI verdauten Vektor pczHSRV2 ligiert. Neben Einzelmutationen wurden auch kombinatorische Substitutionen vorgenommen. Substitutionsmutanten von FFV *gag* wurden ebenfalls mittels PCR unter Verwendung der terminalen Primer 4453/4454 hergestellt. Dadurch wurde ein etwa 1400 bp langes Fragment aus pChatul-3 amplifiziert, welches sich vom CMV-Promotor bis etwa zur Hälfte des *gag*-ORFs erstreckt (s. Abb. 21). Über spezifische mutagene Primerpaare wurden die jeweiligen Mutationen eingeführt (Übersicht in Kap. 2.1.9. Oligonukleotide). Die Amplifikate wurden mit SnaBI/BlnI verdaut und mit dem SnaBI/BlnI verdauten Vektor p-Chatul-3 ligiert. Das Replikationsverhalten dieser Mutanten wurde im Folgenden hinsichtlich ihres Titors, ihres Nukleinsäuregehaltes, dem Zeitpunkt der reversen Transkription sowie der Env-Abhängigkeit des zellulären Kapsidexportes untersucht. Zudem wurden die *gag*-Mutanten hinsichtlich einer möglichen Ubiquitinierung der zusätzlichen Lysine untersucht. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Replikationsfähigkeit verschiedener Substitutionsmutanten in der Gegenwart von IFN- (Interferon-) α und γ .

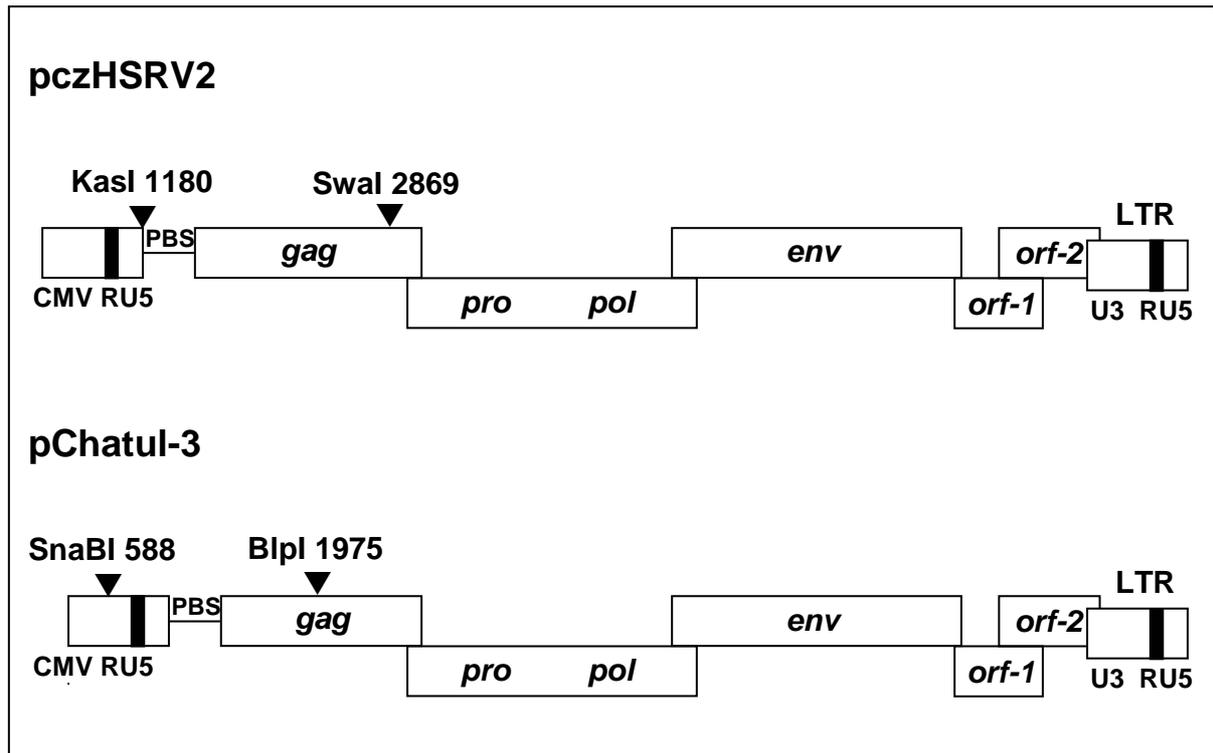


Abb. 21: Schematische Darstellung der infektiösen PFV- (oben) bzw. FFV- (unten) Klone mit den für die Klonierung verwendeten Schnittstellen

3.2.2. Bestimmung der Titer der mutierten Proviren

Für die Bestimmung des Titers der mutierten Proviren wurden 293T-Zellen in 6 cm-Schalen mit je 3 μ g der verschiedenen pczHSRV2- bzw. pChatul-3-Mutanten transfiziert. Zur Überprüfung einer gleichmäßigen Transfektionseffizienz wurden 3 μ g des Kontrollplasmids pEGFP-N1 kotransfiziert. Zwei Tage n. T. wurden zellfreie Virusüberstände geerntet und auf den Indikatorzellen BHK/LTR(PFV)/lacZ bzw. CrFK/LTR(FFV)/lacZ titriert (s. Kap. 2.4.3.). Die Zielzellen wurden drei Tage nach Infektion mittels einer histochemischen β -Galactosidase-Färbung angefärbt (s. Kap. 2.3.7.) und die blauen Infektionsherde ausgezählt. Die Anzahl infektiöser Einheiten pro ml Infektionsmedium (ffu = focus forming units) konnte über die Verdünnungsreihe rechnerisch bestimmt werden. In Tab. 6 sind die Resultate mindestens dreier unabhängiger Transfektionen für die PFV gag-Mutanten dargestellt. Zur Kontrolle der zellulären Gag-Expression wurden zudem Zellysate hergestellt. Die Detektion des Gag-Proteins in der anschließenden WB-Analyse erfolgte mit einem polyklonalen PFV Gag-Antiserum 1:250 verdünnt. EGFP wurde mit einem polyklonalen Kaninchen- α -EGFP Antiserum (Sigma, 1:3000) detektiert. Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP

Ergebnisse

Antiserum (Dako, 1:2000) verwendet. Abb. 22 stellt einen exemplarischen WB für dieses Experiment dar.

Probe	Titer ffu/ml	Probe	Titer ffu/ml
pczHSRV2 wt	$9,28 \pm 2,02 \times 10^6$	pczHSRV2 M149 (141+145)	$1,47 \pm 0,36 \times 10^5$
pczHSRV2 M141	$1,07 \pm 0,28 \times 10^5$	pczHSRV2 M150 (142+143)	$8,60 \pm 1,47 \times 10^6$
pczHSRV2 M142	$9,63 \pm 4,03 \times 10^6$	pczHSRV2 M151 (142+144)	$1,01 \pm 0,32 \times 10^7$
pczHSRV2 M143	$1,09 \pm 0,28 \times 10^7$	pczHSRV2 M152 (142+145)	$7,93 \pm 2,59 \times 10^6$
pczHSRV2 M144	$5,28 \pm 1,53 \times 10^6$	pczHSRV2 M153 (143+144)	$6,46 \pm 1,74 \times 10^6$
pczHSRV2 M145	$9,66 \pm 5,21 \times 10^6$	pczHSRV2 M154 (143+145)	$6,50 \pm 1,13 \times 10^6$
pczHSRV2 M146 (141+142)	$9,59 \pm 4,79 \times 10^4$	pczHSRV2 M155 (144+145)	$5,68 \pm 1,67 \times 10^6$
pczHSRV2 M147 (141+143)	$5,43 \pm 1,84 \times 10^4$	pczHSRV2 M156 (146+144)	$7,58 \pm 3,26 \times 10^4$
pczHSRV2 M148 (141+144)	$1,54 \pm 0,60 \times 10^5$	pczHSRV2 M157 (156+143)	$7,21 \pm 4,70 \times 10^4$

Tab. 6: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler mindestens dreier unabhängiger Transfektionen; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 bzw. den verschiedenen Substitutionsmutanten transfiziert, 48 h später wurden zellfreie Überstände auf BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen transferiert und drei Tage später mittels histochemischer β -Galactosidase-Färbung die infektiösen Titer ermittelt

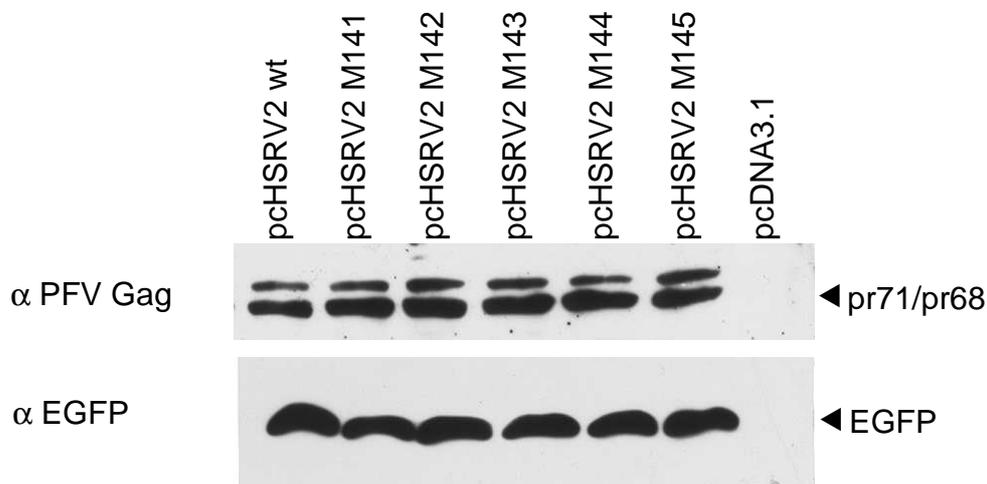


Abb. 22: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von PFV Gag und EGFP; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 oder den verschiedenen Lysinmutanten transfiziert. Zellfreie Überstände (für die Titerbestimmung) und Zellysate wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des PFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -PFV Gag-Antiserum 1:250, die Detektion von EGFP mit einem polyklonalen Kaninchen- α -EGFP Antiserum (Sigma, 1:3000). Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt

Nach Transfektion von 293T-Zellen mit pczHSRV2 und anschließender Infektion von BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen wurde ein durchschnittlicher Virustiter von $9,28 \times 10^6$ ffu pro ml generiert. Dieser liegt etwa eine Größenordnung über dem von Roy et al.

Ergebnisse

2003 ermittelten Titer. Ein möglicher Grund dafür ist, daß 293T-Zellen in dieser Arbeit mit PEI transfiziert wurden, wohingegen Roy et al. CaPO₄-Transfektion durchführten. Die Titer der Mutanten M142, M143, M144 und M145 lagen in derselben Größenordnung wie der Titer der WT-Viren und waren teilweise sogar geringfügig höher als dieser, wie für die Mutanten M142, M143 sowie M145 beobachtet. Mutante M141 wich von den übrigen Mutanten ab, da deren Titer etwa zwei Größenordnungen unter dem WT-Titer lag. Zudem war schon einen Tag n. T. ein cytopathischer Effekt in der 293T-Zellkultur zu beobachten, welcher sich nach einem weiteren Tag verstärkt hatte. Abb. 23 zeigt mit pczHSRV2 (A) bzw. pczHSRV2 M141 (B) transfizierte 293T-Zellkulturen, welche 48 h p. T. einer Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung (Gattenloehner et al., 2007) unterzogen wurden. Die HE-Färbung und anschließende Mikroskopierung wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Gattenlöhner und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie der Uniklinik Würzburg durchgeführt (Mikroskop: Olympus BX50, Vergrößerung 400 x, vergrößerter Ausschnitt in (B) 800 x). 293T-Zellen, welche mit dem WT-Virus transfiziert wurden, waren gering bis mäßig polymorph, Riesenzellen konnten nicht nachgewiesen werden (A). Mit der Mutante M141 transfizierte Zellen waren im Vergleich dazu deutlich polymorpher, es waren polymorphe Kerne sowie prominente Vakuolen zu erkennen. Zusätzlich konnten zahlreiche Riesenzellen nachgewiesen werden (vergrößerter Ausschnitt in (B)).

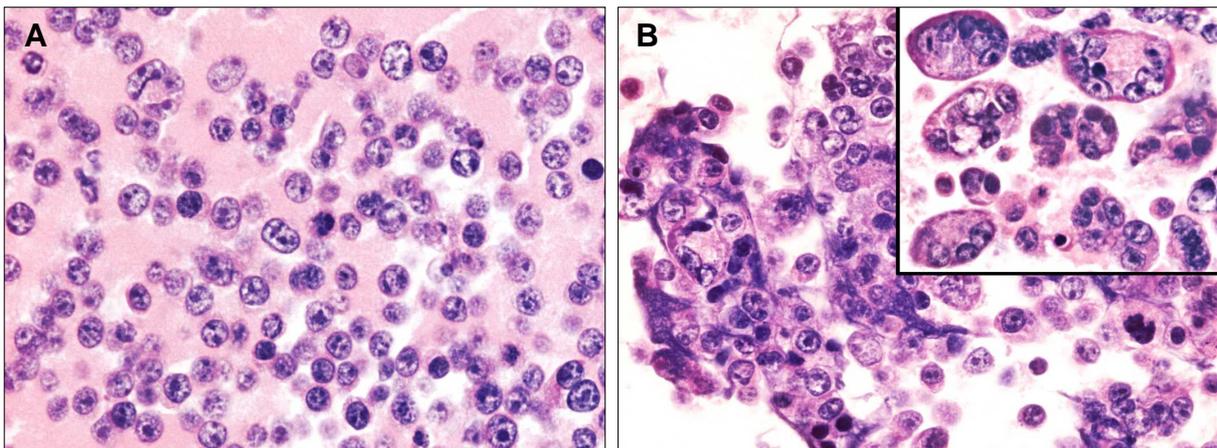


Abb. 23: Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung transfizierter 293T-Zellkulturen; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 (A) oder der Mutante pczHSRV2 M141 (B) transfiziert und 48 h p. T. einer HE-Färbung unterzogen.

Die Titer der kombinatorischen Mutanten verhielten sich ähnlich den Titern der Einzelmutanten. Alle Mutanten, welche die Mutation M141 (R22,24K) enthielten, generierten Titer, welche etwa zwei Größenordnungen unter dem WT-Titer lagen.

Ergebnisse

Zudem induzierten sie wie die Einzelmutante M141 einen CPE in der transfizierten Zellkultur. Kombinatorische Mutanten, welche nicht die Mutation M141 enthielten, wiesen einen zu WT-Viren vergleichbaren Titer auf, im Falle der Mutante M151 war dieser sogar geringfügig höher. Damit konnte gezeigt werden, daß alle Arginin-Lysin-Substitutionsmutanten voll replikationskompetent waren und mit Ausnahme von Mutante M141 ähnliche infektiöse Titer wie WT-Viren generieren konnten.

Für die Analyse der Mutante pczHSRV2 M158, in welcher das singuläre Lysin K396 gegen Arginin substituiert wurde, wurden Partikelpräparationen hergestellt, um einen eventuellen Defekt in der Freisetzung von Viruspartikeln infolge der Mutation zu festzustellen. Dazu wurden 293T-Zellen in 10 cm-Schalen mit je 8 µg pczHSRV2 bzw. pczHSRV2 M158 sowie 8 µg pcDNA3.1 kotransfiziert. 48 h p.T. wurden zellfreie Überstände geerntet und Partikel durch Ultrazentrifugation präpariert. Die Detektion des PFV Gag-Proteins in der WB-Analyse erfolgte mit einem polyklonalen PFV Gag-Antiserum 1:250 verdünnt.

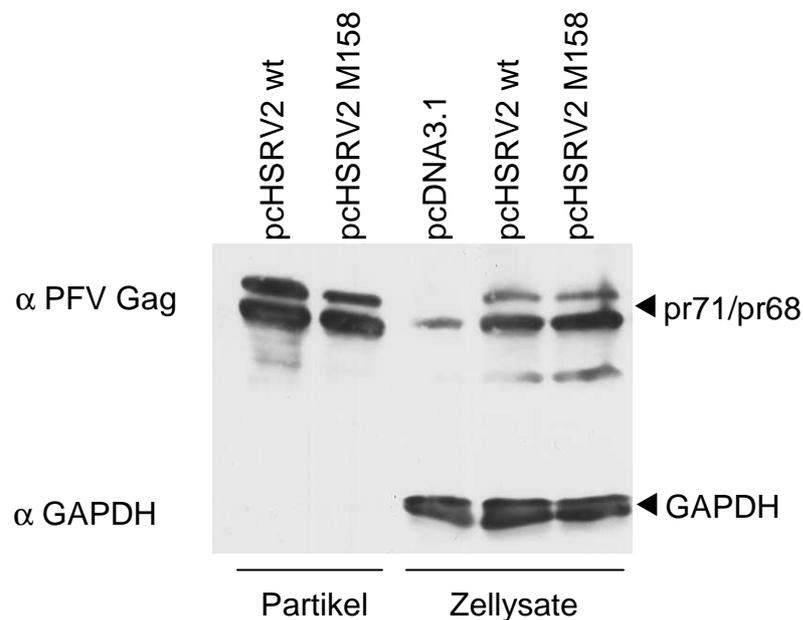
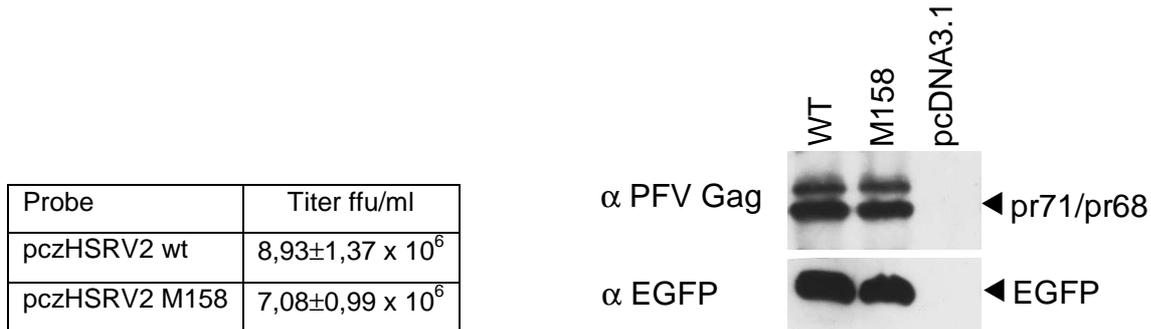


Abb. 24: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pczHSRV2 gag-Mutante M158 (K396R); 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 oder der Mutante M158 transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des PFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen-α-PFV Gag-Antiserum (1:1000 verdünnt für Partikel, 1:250 verdünnt für Zellysate). Als Ladekontrolle wurde GAPDH einem polyklonalen Kaninchen-α-GAPDH-Antiserum (Sigma, 1:1000) detektiert. Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege-α-Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt.

Wie im WB der Partikelpräparationen zu erkennen ist, hatte der Austausch des singulären Lysins K396 gegen Arginin in der Mutante pczHSRV2 M158 keinen

Ergebnisse

Einfluß auf die Freisetzung von Viruspartikeln. Um die Infektiosität der freigesetzten Partikel zu überprüfen, wurde wie für die Arginin-Lysin-Substitutionsmutanten auch für die Mutante M158 eine Bestimmung des infektiösen Titers durchgeführt. In Tab. 7 ist das Resultat dreier unabhängiger Transfektionen für diese Mutante dargestellt, daneben ein exemplarischer WB zur Transfektionskontrolle für dieses Experiment (Durchführung analog zur WB-Analyse Abb.23).



Tab. 7: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 bzw. der M158-Substitutionsmutante transfiziert, 48 h später wurden zellfreie Überstände auf BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen transferiert und drei Tage später mittels histochemischer β -Galactosidase-Färbung die infektiösen Titer ermittelt; daneben ist eine exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von PFV Gag und EGFP dargestellt.

Wie in den Partikelpräparationen waren auch in der Titerbestimmung keine signifikanten Unterschiede zum WT-Virus zu verzeichnen. Der infektiösen Titer der Mutante M158 lag in der gleichen Größenordnung wie der Titer des WT-Virus und war nur geringfügig niedriger als dieser. Somit konnte weder hinsichtlich der Freisetzung noch der Infektiosität dieser Mutante ein auffälliger Unterschied zum WT festgestellt werden.

Tab. 8 faßt die Resultate mindestens dreier unabhängiger Transfektionen für die FFV gag-Mutanten zusammen. In Abb. 25 ist wiederum ein exemplarischer WB für dieses Experiment dargestellt. Das Gag-Protein von FFV ist mit einer Länge von 514 As deutlich kürzer ist als jenes von PFV mit 648 As, dementsprechend weisen die Proteinbanden mit 52 kDa bzw. 48 kDa (prozessierte Form) eine geringere Größe als die PFV Gag-Banden auf.

Ergebnisse

Probe	Titer ffu/ml	Probe	Titer ffu/ml
pChatul-3 wt	$4,69 \pm 1,33 \times 10^5$	pChatul-3 M7	$2,12 \pm 0,41 \times 10^5$
pChatul-3 M1	$1,49 \pm 0,56 \times 10^5$	pChatul-3 M8	$3,31 \pm 1,08 \times 10^5$
pChatul-3 M2	$2,82 \pm 1,66 \times 10^5$	pChatul-3 M9	$3,27 \pm 0,78 \times 10^5$
pChatul-3 M3	$9,95 \pm 3,42 \times 10^4$	pChatul-3 M10	$2,31 \pm 0,87 \times 10^5$
pChatul-3 M4	$3,28 \pm 2,45 \times 10^5$	pChatul-3 M11	$1,23 \pm 0,42 \times 10^5$
pChatul-3 M5	$1,22 \pm 0,42 \times 10^4$	pChatul-3 M12	$4,12 \pm 1,14 \times 10^5$
pChatul-3 M6	$1,02 \pm 0,26 \times 10^5$		

Tab. 8: Durchschnittliche infektiöse FFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler mindestens dreier unabhängiger Transfektionen; 293T-Zellen wurden mit pChatul-3 bzw. den verschiedenen Substitutionsmutanten transfiziert, 48 h später wurden zellfreie Überstände auf CrFK/LTR (FFV)/lacZ-Zellen transferiert und drei Tage später mittels histochemischer β -Galactosidase-Färbung die infektiösen Titer ermittelt

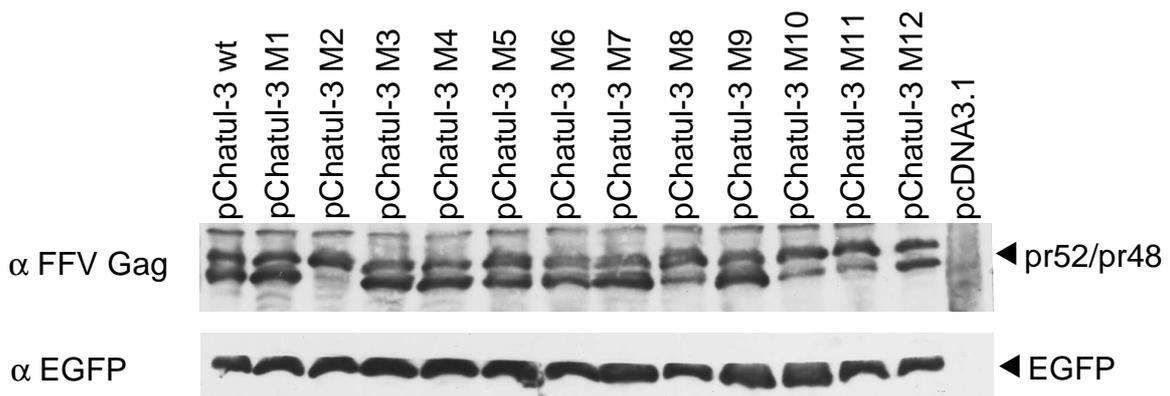


Abb. 25: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von FFV Gag und EGFP; 293T-Zellen wurden mit pChatul-3 oder den Lysinmutanten M1-M12 transfiziert. Zellfreie Überstände (für die Titerbestimmung) und Zellysate wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des FFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -FFV Gag-Antiserum 1:1000, die Detektion von EGFP mit einem polyklonalen Kaninchen- α -EGFP Antiserum (Sigma, 1:3000). Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt

Alle Mutanten mit Ausnahme der Mutante M5 wiesen Titer auf, welche in der Größenordnung des WT-Provirus liegen. Einzig der Titer der Mutante M5 lag eine Größenordnung unter dem WT-Titer. Auch im Falle von pChatul-3 lag der in dieser Arbeit ermittelte Titer über dem von Roy et al. errechneten, was wohl wiederum auf die unterschiedlichen Methoden zur Transfektion der 293T-Zellen zurückzuführen war.

Ergebnisse

3.2.3. Untersuchung auf Revertantenbildung von PFV-Mutanten

Eine weitere in der vorliegenden Arbeit untersuchte Eigenschaft der PFV-Mutanten war deren genetische Stabilität. Zum einen bestand die Möglichkeit einer Revertantenbildung, bei der die in *gag* eingebrachten Mutationen im Laufe mehrerer zellfreier Passagierungen wieder in die WT-Sequenz zurückmutieren würden. Zum anderen wurde eine eventuelle Pseudorevertantenbildung untersucht, bei der die eingeführten Mutationen zwar erhalten blieben, dafür aber andere kompensatorische Mutationen in *gag* auftreten würden. Zu diesem Zweck wurden die *gag*-Gene aufgereinigter und amplifizierter viraler DNA nach zehn zellfreien Passagierungen der Mutanten sequenziert.

Dafür wurden 293T-Zellen in 6 cm-Schalen mit den entsprechenden pczHSRV2-Mutanten transfiziert (jeweils 3 µg Provirus-DNA zusammen mit 3 µg pcDNA3.1) und 48 h p.T. mit den zellfreien Überständen BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen infiziert. Bei Auftreten eines CPEs in den Zellkulturen (nach etwa zwei bis drei Tagen) wurden neue, 24 h zuvor ausgesäte BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen mit dem zellfreien Überstand infiziert. Auf diese Weise wurden für alle Mutanten simultan zehn Passagierungen durchgeführt. Nach der ersten sowie nach der zehnten Passage, welche jeweils in 10 cm-Schalen stattfanden, wurden je 10 ml zellfreier Überstand jeder Probe durch Ultrazentrifugation über ein 20 % Sucrosekissen konzentriert. Die Sedimente wurden in jeweils 200 µl PBS gelöst und die virale DNA mit Hilfe des QIAamp^R MinElute^R Virus Spin Kits (Quiagen) isoliert. Nach Verdau der viralen RNA mittels RNase A wurde die *gag*-Gensequenz der viralen DNA in einer PCR unter Verwendung der Primer 4392/4513 amplifiziert. Da die Ausbeute an PCR-Produkt in dieser ersten PCR nur sehr gering war, wurde eine seminested PCR durchgeführt, in welcher das PCR-Produkt unter Verwendung der Primer 4392/4514 nochmals amplifiziert wurde. Dadurch wurde eine ausreichende Menge an PCR-Produkt für die anschließende Sequenzierung der *gag*-Gensequenzen mittels der Primer 4447/4098/4099/4153/4405/4515 generiert. Die Auswertung der Sequenzen ergab, daß sämtliche Mutanten nach der zehnten Passage die eingeführten Arginin-zu-Lysin-Substitutionen enthielten und zudem keine kompensatorischen Mutationen aufgetreten waren. Um zu untersuchen, ob die Mutanten am Ende der Passagierungen ähnliche Titer wie in den früheren Experimenten generieren konnten, wurde parallel zur Extraktion der viralen DNA nach Passage zehn für jede Probe eine Bestimmung des Virustiters

Ergebnisse

durchgeführt. Dafür wurde vor der Ultrazentrifugation von den jeweiligen zellfreien Überständen ein Aliquot (30 µl) abgenommen und damit BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen infiziert. Um die so ermittelten Titer mit dem Titer von passagiertem WT-Virus vergleichen zu können, wurde analog zur o. g. Vorgehensweise eine zweimalige Passagierung des WT-Virus auf BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen durchgeführt. Die Titer wurden wiederum durch Auszählen der blauen Infektionsherde im Anschluß an eine histochemische β -Galactosidase-Färbung bestimmt.

Probe	Titer ffu/ml
pczHSRV2 wt	$1,20 \pm 0,16 \times 10^7$
pczHSRV2 M141	$8,04 \pm 1,39 \times 10^5$
pczHSRV2 M142	$1,88 \pm 0,31 \times 10^7$
pczHSRV2 M143	$1,72 \pm 0,49 \times 10^7$
pczHSRV2 M144	$2,03 \pm 0,74 \times 10^7$
pczHSRV2 M145	$1,56 \pm 0,19 \times 10^7$

Tab. 9: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen nach zehnmaliger (WT-Virus: zweimaliger) Passagierung auf BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 bzw. den verschiedenen Substitutionsmutanten transfiziert und 48 h später die zellfreien Überstände auf BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen transferiert; anschließend wurden alle drei bis vier Tage die zellfreien Überstände simultan auf frisch ausgesäte BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen transferiert. Die zellfreien Überstände der zehnten Passage wurden zur Sequenzanalyse geerntet, ein Aliquot wurde zur Titerbestimmung durch Infektion von BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen und histochemischer β -Galactosidase-Färbung drei Tage danach verwendet.

Nach zehnmaliger Passagierung auf BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen wiesen sämtliche Mutanten durchschnittlich etwa um den Faktor zwei höhere infektiöse Titer auf als nach Transfektion und einmaligem Überstandstransfer (s. Kap. 3.2.2.). Auch der nach zweimaliger Passagierung ermittelte Titer des WT-Virus lag geringfügig höher als jener des Experimentes in Kap. 3.2.2..

3.2.4. Bestimmung des Zeitpunktes der reversen Transkription der mutierten Proviren

Saib et al. konnten 1997 zeigen, daß das Nukleosidanalogon Azidothymidin (AZT; 3-Azido-3'-desoxythymidin) eine inhibierende Wirkung auf die foamyvirale Replikation hat, indem es zu einem Kettenabbruch während der reversen Transkription führt. Moebes et al. wiesen durch Applikation von AZT entweder auf die Produktionszellen oder auf die Zielzellen nach, daß PFV seine genomische RNA noch in der

Ergebnisse

virusproduzierenden Zelle revers transkribiert. Gleiches konnten Roy et al. für FFV zeigen. Mit Hilfe dieses AZT-Inhibierungsassays wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der reversen Transkription der in dieser Arbeit hergestellten PFV-Substitutionsmutanten von jenem der WT-Viren abweicht. Dazu wurden wie in Abb. dargestellt 293T-Zellen in 6 cm-Schalen mit pczHSRV2 oder den verschiedenen Mutanten transfiziert (jeweils 3 µg Provirus-DNA zusammen mit 3 µg pEGFP-N1). 48 h p. T. wurden zellfreie Virusüberstände geerntet und damit BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen infiziert. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Gag-Expression sowie Transfektionseffizienz wurden Zellysate hergestellt und mit polyklonalen Kaninchen- α -PFV Gag- bzw. α -EGFP-Antiserum die jeweiligen Proteine detektiert (s. Abb. 27). Im Falle von Experiment A wurden sowohl Produktionszellen als auch Indikatorzellen in Abwesenheit von AZT (Retrovir, GlaxoSmithKline) kultiviert (Negativkontrolle). Experiment B diente als Positivkontrolle, bei dem sowohl Produktionszellen als auch Indikatorzellen in Gegenwart von 10 µM AZT kultiviert wurden. Die AZT-Applikation auf die 293T-Zellen erfolgte sowohl unmittelbar vor der Transfektion als auch nach dem Mediumwechsel am Tag nach der Transfektion. Die AZT-Applikation auf die Zielzellen erfolgte vier Stunden vor deren Infektion. Die verwendete AZT-Konzentration lag über der von Moebes et al., 1997 verwendeten (5 µM) und war dadurch begründet, daß in Vorversuchen noch eine mäßige Virusreplikation in 293T-Zellen trotz Anwesenheit von 5 µM AZT zu beobachten war. Diese Tatsache war möglicherweise in den höheren Virustitern infolge PEI-Transfektion begründet. In Experiment C wurden nur die Zellzellen, nicht aber die Produktionszellen in der Gegenwart von 10 µM AZT kultiviert. In Experiment D fand die Virusproduktion in Gegenwart von 10 µM AZT und die Infektion der Zielzellen in Abwesenheit von AZT statt.

Ergebnisse

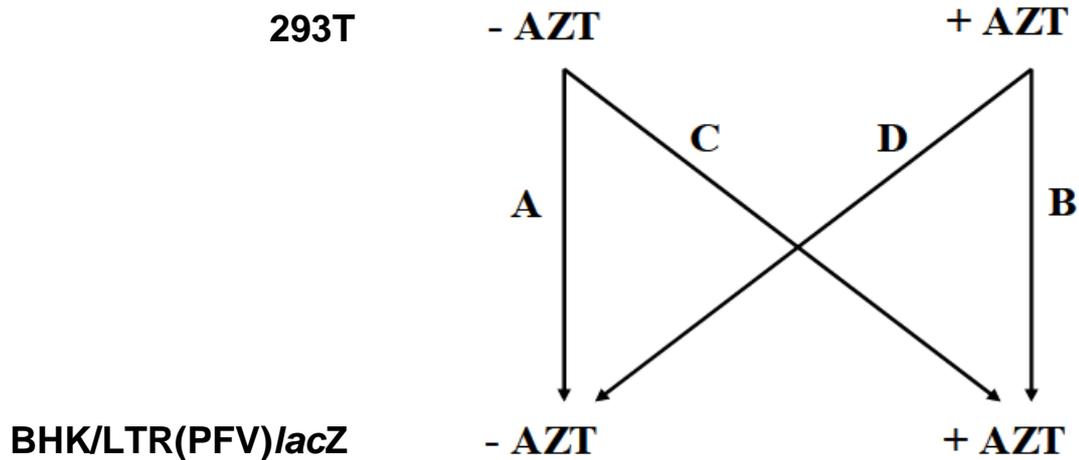


Abb. 26: Applikationsschema von AZT zur Untersuchung des Zeitpunktes der reversen Transkription (verändert nach Moebes et al., 1997)

Probe	A (-/-)	B (+/+)	C (-/+)	D (+/-)
pczHSRV2 wt	$1,29 \pm 0,71 \times 10^7$	$4,00 \pm 1,73$	$8,56 \pm 8,13 \times 10^6$	$6,67 \pm 0,67$
pczHSRV2 M141	$1,75 \pm 0,43 \times 10^5$	$3,33 \pm 0,67$	$1,54 \pm 0,70 \times 10^5$	$5,00 \pm 1,00$
pczHSRV2 M142	$1,60 \pm 0,68 \times 10^7$	$5,33 \pm 1,20$	$2,62 \pm 1,44 \times 10^6$	$6,67 \pm 1,33$
pczHSRV2 M143	$1,57 \pm 0,70 \times 10^7$	$3,67 \pm 1,77$	$5,17 \pm 3,95 \times 10^6$	$4,67 \pm 1,77$
pczHSRV2 M144	$5,25 \pm 2,22 \times 10^6$	$5,00 \pm 1,00$	$5,29 \pm 2,29 \times 10^6$	$5,67 \pm 1,77$
pczHSRV2 M145	$3,60 \pm 1,79 \times 10^6$	$3,33 \pm 1,45$	$1,43 \pm 1,04 \times 10^6$	$4,67 \pm 1,67$

Tab. 10: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 bzw. den verschiedenen Substitutionsmutanten transfiziert, 48 h später wurden zellfreie Überstände auf BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen transferiert und drei Tage später mittels histochemischer β -Galactosidase-Färbung die infektiösen Titer ermittelt; Experiment A: Kultivierung der virusproduzierenden Zellen und der Indikatorzellen in der Abwesenheit von AZT; Experiment B: Kultivierung der virusproduzierenden Zellen und der Indikatorzellen in der Gegenwart von 10 μ M AZT; Experiment C: Kultivierung der virusproduzierenden Zellen in der Abwesenheit von AZT und der Indikatorzellen in der Gegenwart von 10 μ M AZT; Experiment D: Kultivierung der virusproduzierenden Zellen in der Gegenwart von 10 μ M AZT und der Indikatorzellen in der Abwesenheit von AZT;

Ergebnisse

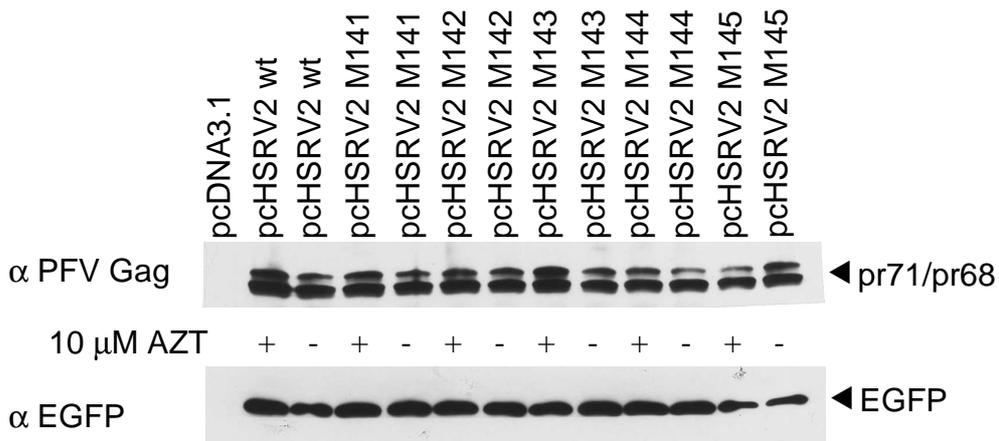


Abb. 27: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von PFV Gag und EGFP; 293T-Zellen wurden in der Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von 10 μM AZT mit pczHSRV2 oder den verschiedenen Lysinmutanten transfiziert. Zellfreie Überstände (für die Titerbestimmung) und Zellysate wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des PFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen-α-PFV Gag-Antiserum 1:250, die Detektion von EGFP mit einem polyklonalen Kaninchen-α-EGFP Antiserum (Sigma, 1:3000). Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege-α-Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt.

In Tab. 8 sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Transfektionen zusammengefasst. In Experiment A, in welchem sowohl die Virusproduktion als auch die Infektion der Zielzellen in Abwesenheit von AZT stattfanden, lagen die Titer der Mutanten M142, M143, M144 und M145 in derselben Größenordnung, wohingegen Mutante M141 einen Titer generierte, welche im Mittel fast zwei Größenordnungen unter dem der WT-Viren lag (vgl. Kap. 3.2.2.). Im Falle der Kontrolle D, bei der sowohl Produktions- als auch Zielzellen in der Anwesenheit von 10 μM AZT kultiviert wurden, war die Virusreplikation fast vollständig unterdrückt. Fand die Virusproduktion in Abwesenheit, die Infektion der Zielzellen jedoch in Anwesenheit von 10 μM AZT statt (Experiment C), so war nur eine geringe Abnahme der Virustiter zu beobachten. Wurden dagegen die 293T-Zellen in Anwesenheit von 10 μM AZT und die BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen in Abwesenheit des Inhibitors kultiviert (Experiment D), so war die Virusreplikation wie in Experiment fast vollständig unterdrückt. Mithilfe dieses Experimentes konnte gezeigt werden, daß alle Substitutionsmutanten eine zu den Wildtypviren analoge Replikationsstrategie verfolgen und ihre genomische RNA noch in der virusproduzierenden Zelle revers transkribieren.

Ergebnisse

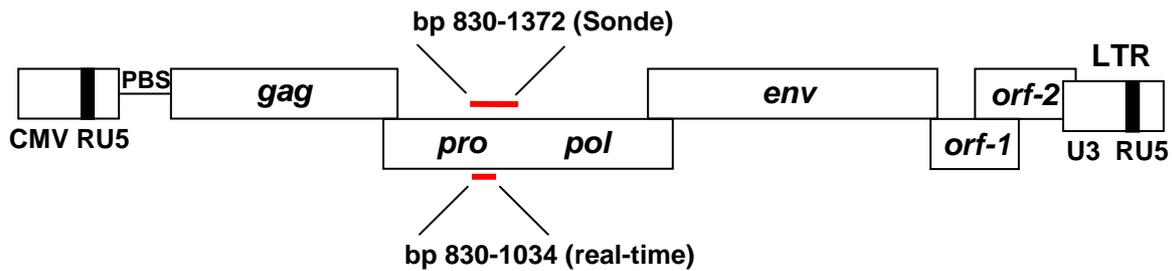
3.2.5. Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes der mutierten Proviren

FV-Partikel enthalten neben DNA auch RNA (Yu et al., 1999, Roy et al., 2003). Yu et al. ermittelten für PFV mittels quantitativer kompetitiver PCR sowie RT-PCR ein durchschnittliches RNA:DNA-Verhältnis von 4,6:1 für Virusüberstände, welche über ein Saccharosekissen ohne einen Gradienten aufgereinigt wurden. Für Gradientenaufgereinigte Virusüberstände betrug dieses Verhältnis durchschnittlich 4:1. Für FFV konnten Roy et al. mittels quantitativer kompetitiver PCR sowie RT-PCR ein durchschnittliches RNA:DNA-Verhältnis von 2,3:1 ermitteln. In einer Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR wurde ein durchschnittliches RNA:DNA-Verhältnis von 5,6:1 ermittelt. In beiden Fällen wurden Virusüberstände verwendet, welche über ein Saccharosekissen ohne einen Gradienten aufgereinigt wurden. In dieser Arbeit wurde eine Quantifizierung der Nukleinsäuren mittels RT-PCR sowie quantitativer real-time PCR vorgenommen. Dafür wurden zunächst DNA- sowie RNA-Sonden als externe Standards hergestellt. Für die FFV-Sonde pDM40 wurde in einer PCR unter Verwendung der Primer 4486/4487 ein etwa 540 bp langes Fragment aus dem *pol*-ORF von pChatul-3 amplifiziert (s. Abb. 24), das Amplifikat mit HindIII/XhoI verdaut (Schnittstellen über die Primer eingeführt) und mit dem HindIII/XhoI verdauten pCRII-TOPO-Vektor ligiert. Der aus pChatul-3 amplifizierte Bereich entspricht dabei genau jenem, welcher von Roy et al. 2003 für die Sondenklonierung verwendet wurde. Dies sollte eine Übertragbarkeit der Ergebnisse gewährleisten. Für die PFV-Sonde pDM39 wurde ein ähnlich langes Fragment aus dem *pol*-ORF von pczHSRV2 amplifiziert, um die ermittelten DNA- sowie RNA-Werte von PFV und FFV miteinander vergleichen zu können. Der entsprechende Abschnitt des PFV *pol*-ORFs wurde in einer PCR unter Verwendung der Primer 4499/4500 amplifiziert (s. Abb. 24), das Amplifikat mit HindIII/XhoI verdaut (Schnittstellen über die Primer eingeführt) und mit dem HindIII/XhoI verdauten pCRII-TOPO-Vektor ligiert. Zur DNA-Quantifizierung mittels quantitativer real-time PCR wurden Verdünnungsreihen von pDM39 bzw. pDM40 hergestellt und jeweils 1 µl der verschiedenen Verdünnungen als externe Standards für die PCR-Reaktion eingesetzt. Zur RNA-Quantifizierung wurde eine in-vitro-Transkription von pDM39 bzw. pDM40 durchgeführt (s. Kap. 2.2.17.). Der pCRII-TOPO-Vektor verfügt über einen SP6-Promotor, an welchen die SP6-Polymerase bindet und so die in-vitro-Transkription der 3' von diesem Promotor inserierten *pol*-Fragmente initiiert. Um die in-vitro-Transkription nach den inserierten *pol*-Fragmenten

Ergebnisse

zu beenden, wurden die Sonden zuvor durch Verdau an einer 3' der Inserts lokalisierten XbaI-Schnittstelle linearisiert und anschließend mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (s. Kap. 2.2.15.). Von den präparierten RNA-Sonden wurden ebenfalls Verdünnungsreihen hergestellt und jeweils 1 µl der verschiedenen Verdünnungen als externe Standards für die RT-Reaktion eingesetzt.

pczHSRV2



pChatul-3

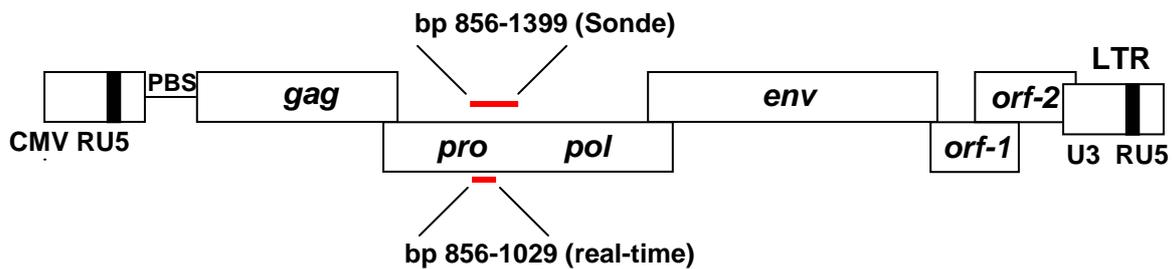


Abb. 28: Amplifizierte Abschnitte der PFV (oben) und FFV (unten) *pol*-ORFs für die Sondenklonierung bzw. während der real-time PCR; angegeben sind die bp der *pol*-ORFs

Für die Quantifizierung der DNA sowie der RNA aus Partikeln wurden wie in Kap. 2.2.18. beschrieben jeweils 10 ml zellfreier Virusüberstand durch Ultrazentrifugation über ein 20 % Sucrosekissen konzentriert. Die Sedimente wurden in jeweils 200 µl PBS gelöst und die Nukleinsäuren mit Hilfe des QIAamp^R MinElute^R Virus Spin Kits (Quiagen) isoliert. Zur DNA-Quantifizierung wurden die Eluate (19 µl) anschließend mit RNase A, für die RNA-Bestimmung mit RQ-DNase verdaut. Das Volumen der DNA-Präparationen nach RNase-Verdau betrug jeweils 20 µl, d.h. 1 µl getestete DNA entsprach 0,5 ml Überstand. Das Volumen der RNA-Präparationen nach DNase-Verdau betrug jeweils 24 µl, da für den DNase-Verdau jeweils 2 µl Puffer

Ergebnisse

sowie zur Inaktivierung der DNase jeweils 2 µl 25 mM EDTA hinzugefügt werden mußten. Damit entsprach 1 µl getestete RNA etwa 0,42 ml Überstand.

Für die Bestimmung der RNA wurde wie in Kap. 2.2.19. beschrieben eine RT-Reaktion durchgeführt. Dafür wurden die pCRII-TOPO-Vektoren *in vitro* transkribiert, die RNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt, die RNA-Standards auf eine Arbeitskonzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und Verdünnungsreihen angesetzt. In den RT-Reaktionen, für welche die M-MLV RT RNase H⁻, Punktmutante (Promega) verwendet wurde, wurden jeweils 1 µl der isolierten RNA bzw. 1 µl der verschiedenen Standardverdünnungen sowie die jeweiligen antisense Primer der Sondenklonierungen eingesetzt (Primer 4500 für PFV, Primer 4487 für FFV). Anschließend wurde jeweils 1 µl einer RT-Reaktion in der anschließenden real-time PCR eingesetzt. Für die DNA-Quantifizierung wurde jeweils 1 µl der isolierten DNA bzw. 1 µl der verschiedenen DNA-Standardverdünnungen in der real-time PCR eingesetzt. Diese wurde wie in Kap. 2.2.20. beschrieben durchgeführt, wobei für die PFV-Proben die Primer 4497/4507, für die FFV-Proben die Primer 4498/4505 verwendet wurden. Diese amplifizieren einen etwa 200 bp langen Abschnitt in den *pol*-ORFs von PFV bzw. FFV (s. Abb. 24). Die optimale Länge von PCR-Produkten für die Quantifizierung durch den iCycler iQTM (Biorad) lag laut Herstellerangaben in einem Bereich zwischen 150-200 bp. Aufgrunddessen wurden in der real-time PCR kürzere Abschnitte der PFV bzw. FFV *pol* ORFs amplifiziert als für die Klonierung der entsprechenden Sonden.

Parallel zur Nukleinsäurequantifizierung wurde für jede Probe eine Bestimmung des Virustiters durchgeführt. Dafür wurde vor der Ultrazentrifugation von den jeweiligen zellfreien Überständen ein Aliquot (30 µl) abgenommen und damit die entsprechenden Indikatorzellen (BHK/LTR(PFV)/*lacZ* für PFV bzw. CrFK/LTR(FFV)/*lacZ* für FFV) infiziert (s. Kap. 2.4.3.). Die Titer wurden durch Auszählen der blauen Infektionsherde im Anschluß an eine histochemische β-Galactosidase-Färbung (s. Kap. 2.3.7.) bestimmt. Dadurch sollte ein Vergleich der ermittelten Anzahl der Nukleinsäurekopien pro ml mit der Anzahl der infektiösen Partikel pro ml möglich gemacht werden. In den Tab. 11 und 12 sind die Resultate dreier voneinander unabhängiger Transfektionen für PFV bzw. FFV dargestellt, von jeder Probe fand eine Doppelbestimmung in der real-time PCR statt.

Ergebnisse

Probe	DNA-Kopien x 10 ⁷ /ml	RNA-Kopien x 10 ⁷ /ml	RNA:DNA	Titer ffu/ml
pczHSRV2 wt	1,88±0,64	6,66±1,38	3,55	4,02±1,60 x 10 ⁶
pczHSRV2 M141	0,91±0,17	1,22±0,11	1,34	3,99±1,82 x 10 ⁴
pczHSRV2 M142	4,62±0,96	4,54±2,34	0,98	7,49±3,63 x 10 ⁶
pczHSRV2 M143	2,94±0,98	5,72±0,56	1,94	3,12±1,03 x 10 ⁶
pczHSRV2 M144	1,72±0,56	5,24±0,90	3,04	6,71±2,53 x 10 ⁵
pczHSRV2 M145	1,82±1,03	5,05±2,20	2,77	2,45±2,28 x 10 ⁶

Tab. 11: Quantifizierung der Nukleinsäuren aus PFV-Partikeln in Kopienzahl pro ml mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen; zum Vergleich sind die parallel dazu ermittelten infektiösen Titer in ffu/ml mit Standardfehler angegeben

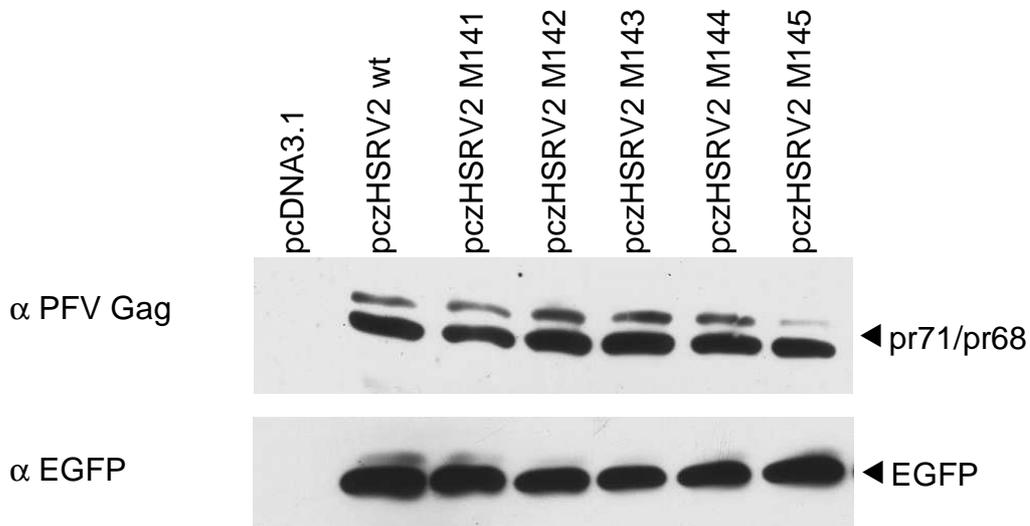


Abb. 29: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von PFV Gag und EGFP; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 oder den verschiedenen Lysinmutanten transfiziert. Zellfreie Überstände (für die Nukleinsäureextraktion sowie die Titerbestimmung) und Zellysate wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des PFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen-α-PFV Gag-Antiserum 1:250, die Detektion von EGFP mit einem polyklonalen Kaninchen-α-EGFP Antiserum (Sigma, 1:3000). Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege-α-Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt.

Das für PFV ermittelte Verhältnis der RNA- und DNA-Kopienzahlen liegt mit einem Wert von 3,55:1 in einem ähnlichen Bereich wie das von Yu et al., 1999 bestimmte (je nach Methode zwischen 4:1 bis 4,6:1). Das RNA:DNA-Verhältnis der Mutanten M144 und M145 war mit Werten von 3,04:1 bzw. 2,77:1 mit jenem der WT-Viren vergleichbar. Im Gegensatz dazu wiesen die Mutanten M141, M142 und M143 ein geringeres RNA:DNA-Verhältnis auf. Im Falle der Mutante M142, deren parallel zur Nukleinsäureextraktion ermittelter Titer im Vergleich zu pczHSRV2 etwa um den Faktor zwei höher lag, war dies vor allem auf einen höheren DNA-Gehalt

Ergebnisse

zurückzuführen, welcher ebenfalls etwa um den Faktor zwar höher lag als jener der WT-Viren. Die Mutante M143 wies ebenfalls einen höheren DNA-Gehalt bei gleicher RNA-Kopienzahl im Vergleich zum WT auf. Die Mutante M141 wies sowohl eine geringere DNA- wie auch RNA-Kopienzahl auf. Dieses Resultat korrelierte mit dem parallel dazu ermittelten infektiösen Titer, welcher auch in diesem Experiment etwa zwei Größenordnungen unter dem WT-Titer lag. Insgesamt zeigte sich aber keine eindeutige Korrelation zwischen der ermittelten DNA-Kopienzahl bzw. dem RNA:DNA-Verhältnis und dem infektiösen Titer der verschiedenen Mutanten.

Probe	DNA-Kopien x 10 ⁷ /ml	RNA-Kopien x 10 ⁷ /ml	RNA:DNA	Titer ffu/ml
pChatul-3 wt	2,21±0,87	9,90±1,18	4,49	3,15±1,56 x 10 ⁵
pChatul-3 M1	3,01±0,52	11,70±3,26	3,89	9,85±3,34 x 10 ⁴
pChatul-3 M2	2,23±1,01	0,69±0,09	0,31	1,18±0,31 x 10 ⁵
pChatul-3 M3	2,22±0,67	14,50±4,44	6,53	6,60±0,97 x 10 ⁴
pChatul-3 M4	4,33±0,54	3,37±1,86	0,78	8,36±2,80 x 10 ⁴
pChatul-3 M5	4,26±1,61	3,77±1,55	0,88	1,22±0,42 x 10 ⁴
pChatul-3 M6	0,86±0,11	5,57±1,04	6,49	1,02±0,74 x 10 ⁵
pChatul-3 M7	1,91±0,65	5,71±0,23	2,98	1,74±1,02 x 10 ⁵
pChatul-3 M8	1,33±0,17	3,27±1,66	2,45	3,75±3,01 x 10 ⁵
pChatul-3 M9	1,80±0,07	2,15±0,66	1,19	3,36±2,20 x 10 ⁵
pChatul-3 M10	0,65±0,18	2,73±1,07	4,17	5,80±2,37 x 10 ⁴
pChatul-3 M11	1,11±0,06	8,76±1,73	7,89	3,91±0,54 x 10 ⁴

Tab. 12: Quantifizierung der Nukleinsäuren aus FFV-Partikeln in Kopienzahl pro ml mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen; zum Vergleich sind die parallel dazu ermittelten infektiösen Titer in ffu/ml mit Standardfehler angegeben

Ergebnisse

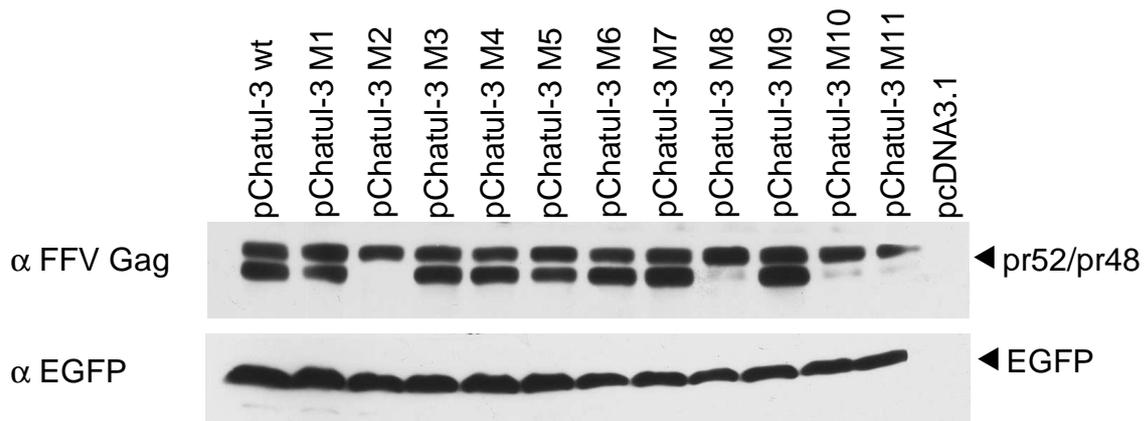


Abb. 30: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von FFV Gag und EGFP; 293T-Zellen wurden mit pChatul-3 oder den verschiedenen Lysinmutanten transfiziert. Zellfreie Überstände (für die Nukleinsäureextraktion sowie die Titerbestimmung) und Zellysate wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des FFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -FFV Gag-Antiserum 1:1000, die Detektion von EGFP mit einem polyklonalen Kaninchen- α -EGFP Antiserum (Sigma, 1:3000). Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt.

Auch das für FFV ermittelte Verhältnis der RNA- und DNA-Kopienzahlen war mit einem Wert von 4,49:1 vergleichbar mit dem in der Literatur beschriebenen von 5,6:1 (Roy et al., 2003). Jedoch lagen sowohl die in diesem Experiment bestimmten RNA- und DNA-Werte als auch die ermittelten infektiösen Titer eine Größenordnung über den von Roy et al., 2003 beschriebenen. Dies war, wie bereits in Kap. 3.2.2. erwähnt, höchstwahrscheinlich auf die unterschiedlichen Transfektionsmethoden zurückzuführen. Das RNA:DNA-Verhältnis der meisten Mutanten war mit dem der WT-Viren vergleichbar, wobei die Mutanten M6, M8, M10 und M11 einen niedrigeren DNA-Gehalt aufwiesen als der WT. Die Mutanten M2, M4, M5 und M9 wiesen ein geringeres RNA:DNA-Verhältnis als der WT sowie die übrigen Mutanten auf, was im Falle der Mutanten M4 und M5 auf eine erhöhte DNA-Kopienzahl, in anderen Fällen (Mutanten 2, 4, 5 und 9) auf einen deutlich niedrigeren RNA-Gehalt zurückzuführen war. Jedoch lagen die parallel zur Nukleinsäureextraktion bestimmten infektiösen Titer dieser Mutanten mit Ausnahme der Mutante M5 in einer Größenordnung mit dem WT-Titer. Insgesamt zeigte sich wie auch in der Nukleinsäureanalyse von PFV-Partikeln kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem DNA-Gehalt bzw. dem RNA:DNA-Verhältnis und dem infektiösen Titer der verschiedenen Mutanten.

In der parallel dazu durchgeführten WB-Analyse der Zellysate waren Schwankungen in der FFV Gag-Prozessierung zu erkennen, die in anderen WB-Analysen (s. Kap.

Ergebnisse

3.2.2., Kap. 3.2.7.) jedoch nicht auftraten und höchstwahrscheinlich in der Detektion durch das FFV Gag-Antiserum begründet waren.

3.2.6. Nachweis der Infektiösität von PFV DNA aus extrazellulären Partikeln

Yu et al., 1999 konnten durch Transfektion von Zellen mit aufgereinigter DNA aus extrazellulären Partikeln nachweisen, daß DNA das funktionale Genom von PFV darstellt. Gleiches wurde durch Roy et al., 2003 für FFV gezeigt. Analog zu diesen Versuchen wurde für die in dieser Arbeit hergestellten PFV-Mutanten über Verdünnungsreihen der extrahierten Virionen-DNA und anschließender Transfektion von Indikatorzellen eine semiquantitative Infektiösitätsanalyse durchgeführt.

Dazu wurden 293T-Zellen in 10 cm-Schalen mit pczHSRV2 bzw. den entsprechenden gag-Mutanten transfiziert (jeweils 8 µg Provirus-DNA zusammen mit 8 µg pcDNA3.1). 48 h p.T. wurden jeweils 20 ml zellfreier Überstand je Probe geerntet und durch Ultrazentrifugation über ein 20 % Sucrosekissen konzentriert. Die Sedimente wurden in jeweils 200 µl PBS gelöst und über Nacht mit 4 U DNase I inkubiert, um Plasmid-DNA, welche nicht durch das virale Kapsid geschützt war, zu verdauen. Die virale DNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAamp^R MinElute^R Virus Spin Kits (Quiagen) isoliert und mit 24 µl sterilem Aqua_{dest} eluiert. 4 µl des Eluats wurden zur Bestimmung der DNA-Menge mittels Photometer verwendet, der Rest zur Transfektion von BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen. Die Transfektion der tags zuvor in 12-Loch-Platten ausgesäten Zellen wurde nach dem in Kap. 2.3.3. beschriebenen Schema durchgeführt, wobei für diesen Versuch eine Verdünnungsreihe der viralen DNA hergestellt wurde (s. Tab. 13). Um die Infektiösität der extrahierten DNA mit jener von Plasmid-DNA vergleichen zu können, wurden Zellen mit unterschiedlichen Mengen des PFV-Proviruskonstruktes pczHSRV2 transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit 1 µg pczHSRV2 Plasmid-DNA transfiziert, welche zuvor über Nacht mit 4 U DNase I verdaut wurde. Als zweite Negativkontrolle dienten Zellen, welche mit 1 µg pcDNA3.1 transfiziert wurden. Drei Tage nach Infektion der BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen wurden die zellfreien Überstände auf frische tags zuvor in 12-Loch-Platten ausgesäte BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen transferiert und diese drei Tage später mittels histochemischer β-Galactosidase-Färbung auf Infektionsherde hin analysiert. Der Überstandstransfer wurde vorgenommen, da eine direkte Färbung der transfizierten

Ergebnisse

Zellen nur einen Nachweis für die Expression des Tas-Proteins, nicht jedoch für die Produktion infektiöser Viren gewesen wäre.

pczHSRV2 (Positivkontrolle)	Infektiösität		Negativkontrollen	Infektiösität	
1 ng	+	+	1 µg pczHSRV2/DNaseI	-	-
0,1 ng	+	+	1 µg pcDNA3.1	-	-
0,01 ng	+ (5)	+ (4)			
0,001 ng	-	-			
0,0001 ng	-	-			

	pczHSRV2		pczHSRV2 M141		pczHSRV2 M142		pczHSRV2 M143		pczHSRV2 M144		pczHSRV2 M145	
OD ₂₆₀ DNA (ng/µl)	3	7	6	7	1	7	2	4	4	4	2	6
	Infektiösität		Infektiösität		Infektiösität		Infektiösität		Infektiösität		Infektiösität	
1 µl	+	+	+(1)	+(2)	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1 µl	+(4)	+(5)	-	-	+(5)	+(5)	+(5)	+(3)	+(3)	+(4)	+(3)	+(5)
0,01 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,001 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0001 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 13: Transfektionsschema zum Nachweis der der Infektiösität von PFV DNA aus extrazellulären Partikeln; +: Infektiösität nach Überstandtransfer auf BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen und Färbung konnte festgestellt werden, die Anzahl der Foci in den Wells mit der größten Verdünnung, bei der noch Foci auftraten, ist in Klammern angegeben; -: keine Infektiösität feststellbar;

In Tab. 13 sind das Transfektionsschema sowie die Ergebnisse zweier unabhängiger Transfektionen dargestellt. Die Anzahl der Foci wurde jeweils in den Wells mit der größten Verdünnung, bei der noch Foci auftraten, bestimmt. Nach Transfektion von BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen mit pczHSRV2 Plasmid-DNA (Positivkontrolle) konnte in den infizierten BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zielzellen ein CPE beobachtet werden. Ebenso induzierte die aus extrazellulären Partikeln extrahierte DNA nach Überstandtransfer in den infizierten Zellkulturen einen CPE, womit die Infektiösität der Virionen-DNA nachgewiesen werden konnte. Die Nachweisgrenze für die Infektiösität lag dabei für die Plasmid-DNA bei 0,01 ng, für die Virionen-DNA bei 0,1 µl für den WT sowie die Mutanten M142, M143, M144 und M145 sowie bei 1 µl für die Mutante M141.

Ergebnisse

3.2.7. Untersuchung einer möglichen Ubiquitinierung der zusätzlichen Lysine in PFV und FFV Gag

Wie in Kap. 1.2.7. dargelegt, können Lysine in retroviralen Gag-Proteinen kovalent mit Ubiquitin modifiziert werden, wobei die Funktion dieser Modifikation bisher nicht eindeutig geklärt ist. PFV Gag enthält einen einzigen Lysinrest an Position 396. Bisher konnte jedoch keine Ubiquitinierung dieses Restes nachgewiesen werden (Stanke et al., 2005). Um eine mögliche Ubiquitinierung der neu eingeführten Lysine in den PFV- sowie FFV-Mutanten zu untersuchen, wurde das Plasmid pBJ5 verwendet (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Heinrich Göttlinger). Dieses Konstrukt kodiert für ein Hämagglutinin- (HA-) Ubiquitin-Fusionsprotein, sodaß ubiquitinierte Gag-Proteine indirekt über das HA-Tag detektiert werden konnten.

293T-Zellen wurden in 10 cm-Schalen mit jeweils 8 µg pczHSRV2 bzw. pChatul-3 sowie den verschiedenen Substitutionsmutanten dieser Proviruskonstrukte zusammen mit 8 µg pBJ5 kotransfiziert. 48 h nach n.T. wurden zellfreie Virusüberstände geerntet und Viruspartikel durch Ultrazentrifugation präpariert. Die Viruspellets wurden in diesem Versuch jedoch in 80 µl anstatt wie üblich in 50 µl PBS/2fach PPP 1:1 resuspendiert. Jeweils 40 µl der Proben wurden in zwei SDS-PA-Gelen aufgetrennt. Anschließend wurde ein Blot als Kontrolle für den Partikelexport mit den jeweiligen polyklonalen α -PFV Gag bzw. α -FFV Gag-Antikörpern inkubiert. Der zweite Blot wurde mit einem polyklonalen Kaninchen- α -HA Antikörper (Sigma) inkubiert, um HA-gekoppeltes Ubiquitin zu detektieren.

Ergebnisse

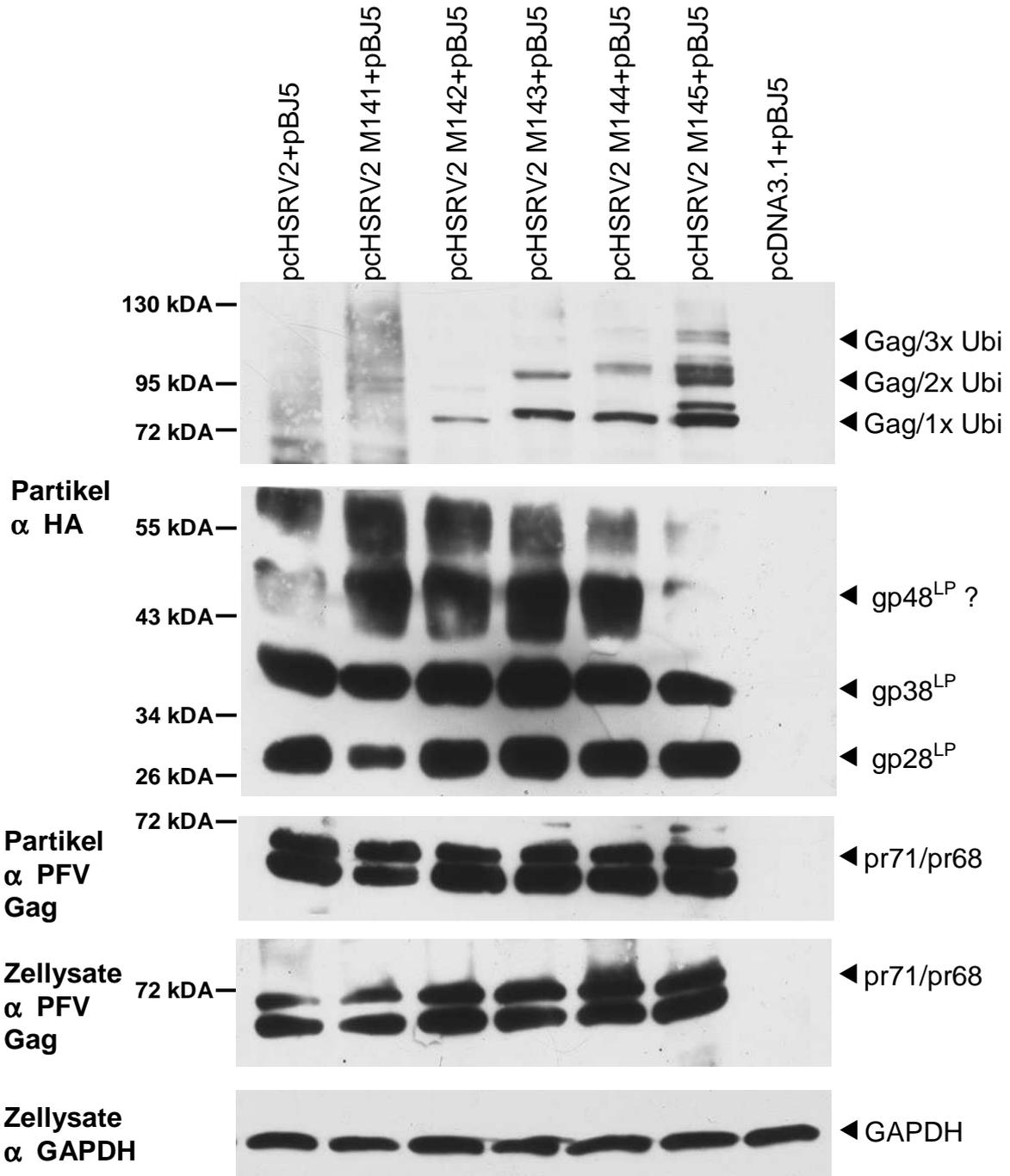


Abb. 31: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pczHSRV2 *gag*-Lysinmutanten; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 oder den Mutanten M141-M145 transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion ubiquitinerter PFV Gag-Proteine erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -HA-Antiserum 1:400, die Detektion des PFV Gag-Proteins mit einem polyklonalen Kaninchen- α -PFV Gag-Antiserum (1:1000 verdünnt für Partikel, 1:250 verdünnt für Zellysate). Als Ladekontrolle wurde GAPDH einem polyklonalen Kaninchen- α -GAPDH-Antiserum (Sigma, 1:1000) detektiert. Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt.

Wie im WB der Zellysate mit einem polyklonalen PFV Gag-Antikörper zu erkennen ist, fand eine gleichmäßige Gag-Expression in allen Proben statt. Im WB der Partikelpräparationen mit einem polyklonalen PFV Gag-Antikörper konnte in allen

Ergebnisse

Proben eine vergleichbare Kapsidfreisetzung in den Überstand festgestellt werden. Eine Inkubation mit dem polyklonalen α -HA Antikörper führte zu mehreren spezifischen Proteinbanden. Sowohl in der PFV WT-Probe als auch in den Proben der PFV *gag*-Mutanten wurden höhermolekulare, ubiquitinierte Formen des Env LP (gp28^{LP} und gp38^{LP}) mit einem Molekulargewicht von 28 bzw. 38 kDA detektiert. Oberhalb der gp38^{LP}-Bande wurden weitere Banden detektiert, wobei die Bande über dieser der dreifach ubiquitinierten Form des LP, gp48^{LP}, entsprechen könnte. Wie in Kap. 1.2.3.3. beschrieben wurde, können alle fünf Lysine der zytoplasmatischen Domäne des LP (K14,15,18,34,53) ubiquitiniert werden, jedoch werden die ersten drei präferentiell genutzt (Stanke et al., 2005). Auf Höhe des PFV-Gag-Proteins konnten in der WT-Probe keine Ubiquitin-spezifischen Banden detektiert werden, was mit bisherigen Ergebnissen (Stanke et al., 2005) übereinstimmt. Damit konnte auch in diesem Versuch gezeigt werden, daß keine Konjugation von Ubiquitin an den singulären Lysinrest K396 in PFV Gag stattfindet. Ebenso konnte in der mit der Mutante M141 transfizierten Probe kein ubiquitiniertes Gag-Protein im Überstand festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten in den Virusüberständen der *gag*-Mutanten M142 bis M145 höhermolekulare Banden detektiert werden, welche höchstwahrscheinlich ubiquitinierten Formen des PFV Gag-Proteins entsprachen. In der Probe M142 war eine Bande erkennbar, die zweite der Gag-Doppelbande war höchstwahrscheinlich aufgrund der geringen Signalintensität nicht sichtbar. Somit fand eine Einfach-Ubiquitinierung eines neu eingeführten Lysinrestes statt. In den Proben M143 und M144 wurde oberhalb der ersten Bande eine weitere Bande detektiert. In diesem Fall wurden also entweder zwei Lysine mit einem Ubiquitinrest kovalent modifiziert oder es wurden zwei Ubiquitinmoleküle an einen Lysinrest angefügt. In der Probe M145 waren drei Doppelbanden erkennbar, somit wurden also entweder drei Lysine ubiquitiniert oder mehrere Ubiquitine wurden an einen oder zwei Lysinreste angefügt. Somit konnte gezeigt werden, daß die PFV *gag*-Mutanten M142, M143, M144 sowie M145 mit mindestens einem Ubiquitinrest an den neu eingeführten Lysinen kovalent modifiziert wurden.

Ergebnisse

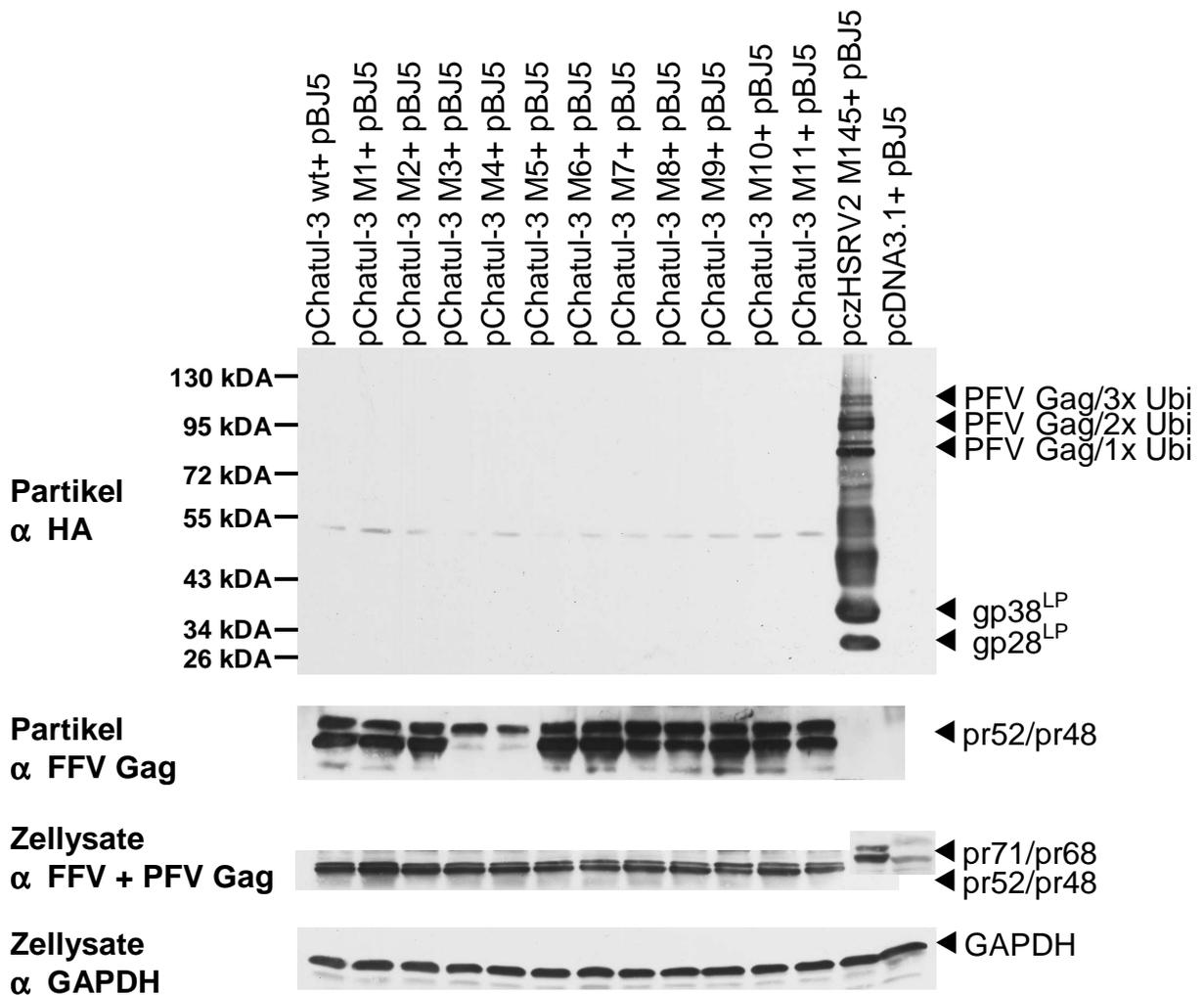


Abb. 32: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pChatul-3 gag-Lysinmutanten; 293T-Zellen wurden mit pChatul-3 oder den Mutanten M1-M12 transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion ubiquitinerter FFV Gag-Proteine erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -HA-Antiserum 1:400, die Detektion des FFV Gag-Proteins mit einem polyklonalen Kaninchen- α -FFV Gag-Antiserum 1:1000. Als Ladekontrolle wurde GAPDH einem polyklonalen Kaninchen- α -GAPDH-Antiserum (Sigma, 1:1000) detektiert. Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt.

In der WB-Analyse der FFV Gag-Ubiquitinierung konnte in den Zellysaten nach Inkubation mit einem polyklonalen FFV Gag-Antikörper eine vergleichbare Gag-Expression in allen Proben festgestellt werden. Im WB der Partikelpräparationen mit einem polyklonalen FFV Gag-Antikörper konnte ebenfalls eine gleichmäßige Kapsidfreisetzung in den Überstand festgestellt werden, wobei im Falle der Mutanten M3 und M4 die pr48-Bande eine deutlich geringere Intensität aufwies als die unprozessierte pr52-Bande. Diese beiden Mutanten generierten jedoch ähnliche infektiöse Titer wie der WT (s. Kap. 3.2.2.) und wiesen zudem in einer anderen WB-Analyse eine den übrigen Proben vergleichbare Prozessierung auf (nicht gezeigt),

Ergebnisse

weshalb die Ursache dieses scheinbar abweichenden Phänotyps letztlich nicht geklärt werden konnte.

Im Gegensatz zur Analyse von PFV konnte nach Inkubation mit dem polyklonalen α -HA Antikörper weder in der FFV WT-Probe noch in den Proben der FFV Gag-Mutanten M1-M11 ubiquitiniertes Gag eindeutig detektiert werden. Zwar war in sämtlichen Proben eine schwache Proteinbande zu erkennen, jedoch wies diese mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDA eine zu geringe Größe für ubiquitiniertes Gag auf. Demzufolge war davon auszugehen, daß es sich dabei um eine unspezifische Bande handelte. Zudem waren auch in der Positivkontrolle (pczHSRV2 M145) Proteinbanden zu erkennen, welche weder Gag noch dem LP zugeordnet werden konnten.

Darüber hinaus konnten auch keine ubiquitinierten Formen des FFV Env LP detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte für die Positivkontrolle sowohl Gag- als auch LP-Ubiquitinierung festgestellt werden.

3.2.8. Untersuchung einer VLP-Freisetzung sowie der Pseudotypisierung ubiquitiniertes PFV *gag*-Mutanten

Infolge der Resultate in Kap. 3.2.7. wurde die Fähigkeit der ubiquitinierten PFV Gag-Proteine sowohl zur zellulären Freisetzung in Form von VLPs als auch zur Pseudotypisierung mit VSV-G untersucht werden. Für diese Versuche wurde das 4-Plasmid-System verwendet (vgl. Kap. 2.4.1.), bei dem die drei Strukturproteine Gag, Pol und Env sowie die verpackbare genomische RNA als Vektor von vier separaten Plasmiden kodiert werden (Heinkelein et al., 2002a). Dafür wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer 4494/4495 ein etwa 1400 bp umfassender Abschnitt des *gag*-ORFs, in welchem sämtliche Arginin-Lysin-Substitutionen lokalisiert waren, aus den pczHSRV2-Mutanten M141, M142, M143, M144 sowie M145 amplifiziert und in das Gag-Expressionsplasmid pClgag2 umkloniert. Dieses besitzt 5´ des *gag*-Startkodons eine EcoRI-Schnittstelle, welche für die Umklonierung verwendet wurde. Dementsprechend wurde über den Primer 4494 eine EcoRI-Schnittstelle an die 5´-Termini der PCR-Produkte angefügt. Die Amplifikate wurden mit EcoRI/Stul verdaut und mit dem EcoRI/Stul verdauten Vektor pClgag2 ligiert. Für die Analyse einer möglichen VLP-Freisetzung wurde in den entsprechenden Transfektionsansätzen anstelle des Env-Expressionsplasmids pCenv1 der Expressionsvektor pcDNA3.1

Ergebnisse

verwendet. Für die Pseudotypisierungsversuche wurde pCenv1 gegen das VSV-G-Expressionsplasmid pMD2.G ausgetauscht.

Zur Kontrolle der Funktionalität des VSV-G-Expressionsplasmids pMD2.G wurde ein HIV-Vektorsystem verwendet. Im Gegensatz zu FV können lentivirale Kapside mit heterologen Glykoproteinen pseudotypisiert werden (s. Kap. 1.2.3.3.). Dabei fungiert pWPXL als Vektor, welcher das Markergen *egfp* exprimiert. psPAX2 kodiert für die HIV-Strukturproteine Gag, Pro und Pol. 293T-Zellen wurden in 10 cm-Schalen mit 8 µg pWPXL, 6 µg psPAX2 sowie 2,4 µg pMD2.G bzw. pcDNA3.1 (Negativkontrolle) kotransfiziert. 48 h n.T. wurden jeweils 500 und 100 µl zellfreie Virusüberstände von den transfizierten Zellkulturen auf HT1080-Zellen transferiert. Drei Tage nach dem Überstandtransfer wurden die Indikatorzellen auf die Expression des Reportergens *egfp* und damit den pWPXL-Vektortransfer hin untersucht.

Probe	% EGFP-pos. Zellen
pWPXL + psPAX2 + pMD2.G	97,16
pWPXL + psPAX2 + pcDNA3.1	0,06

Tab. 14: FACS-Analyse von HT1080-Zellen zur pMD2.G-Funktionalitätskontrolle; 293T-Zellen wurden mit pWPXL, psPAX2 sowie pMD2.G oder pcDNA3.1 kotransfiziert. 48 h nach n.T. wurden zellfreie Virusüberstände auf HT1080-Zellen transferiert und diese drei Tage später mittels FACS-Analyse auf die Expression des Reportergens *egfp* hin untersucht. Die angegebenen Werte wurden anhand der HT1080-Zellkulturen ermittelt, welche mit jeweils 100 µl zellfreien Virusüberständen infiziert wurden.

Wurden die 293T-Zellkulturen mit pMD2.G kotransfiziert, so konnte ein effizienter pWPXL-Vektortransfer auf die HT1080-Zellen nachgewiesen werden. In der Abwesenheit von VSV-G fand dagegen keine Pseudotypisierung der HIV-Kapside und somit keine Infektion der Zielzellen statt. Somit wurde die Funktionalität dieses VSV-G-Expressionsplasmids bestätigt.

Für die WB-Analyse einer möglichen VLP-Generierung bzw. Pseudotypisierung der mutierten PFV Kapside wurden 293T-Zellen in 10cm-Schalen mit jeweils 10 µg pTW01, 1 µg pCpol2, 5 µg pC₁gag2 bzw. den jeweiligen *gag*-Substitutionsmutanten sowie 1 µg pCenv1, pcDNA3.1 oder pMD2.G kotransfiziert. 48 h nach n.T. wurden zellfreie Virusüberstände geerntet und Viruspartikel durch Ultrazentrifugation präpariert. Zur Kontrolle der zellulären Gag- sowie VSV-G-Expression wurden Zellysate hergestellt. Das PFV Gag-Protein wurde in einer WB-Analyse mit einem polyklonalen α-PFV Gag-Antikörper detektiert, VSV-G mit dem monoklonalen α-VSV-G-Antikörper I.1.

Ergebnisse

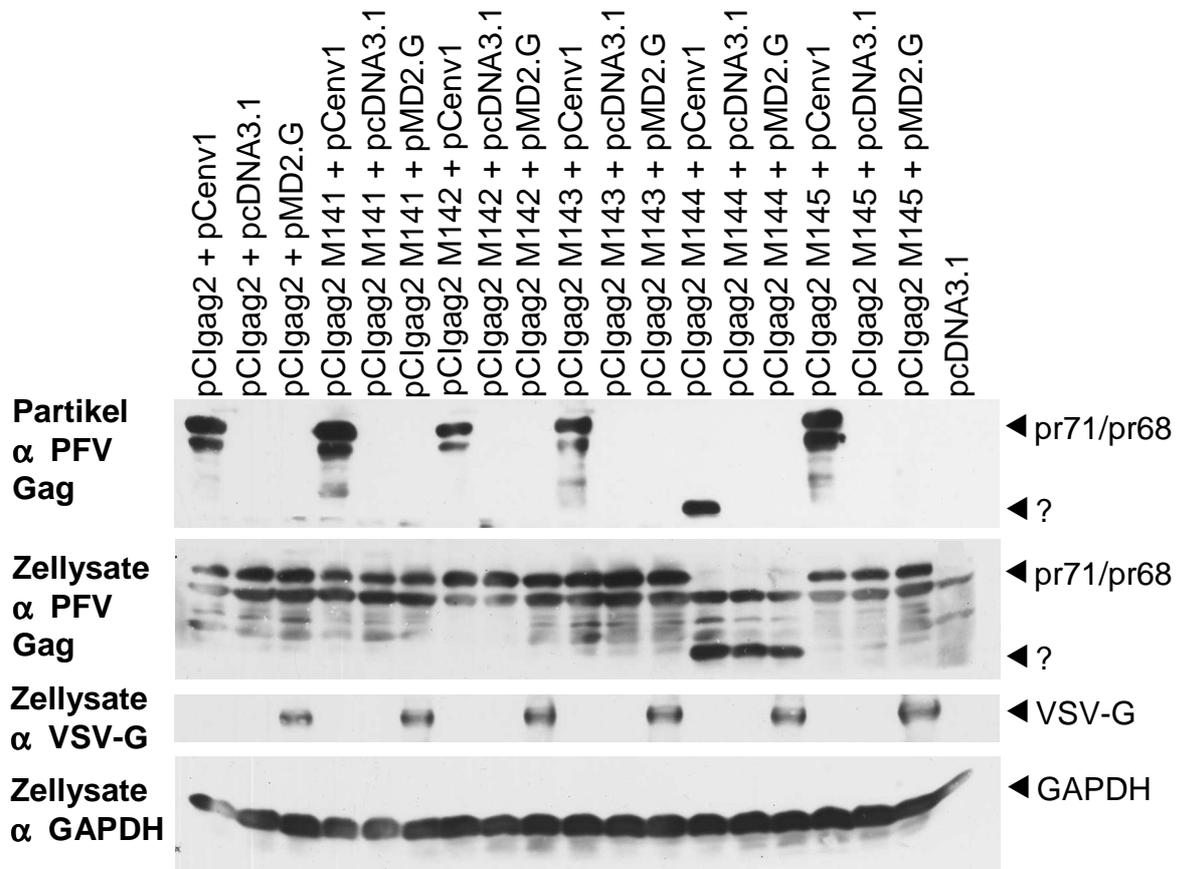


Abb. 33: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression und Partikelfreisetzung der pClgag2-Lysinmutanten; 293T-Zellen wurden mit pTW01, pCpol2, pClgag2 oder den verschiedenen Gag-Substitutionsmutanten sowie pCenv1, pcDNA3.1 oder pMD2.G kotransfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. geerntet. Die Detektion des PFV Gag-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen- α -PFV Gag-Antiserum (1:1000 verdünnt für Partikel, 1:250 verdünnt für Zellysate). Als Ladekontrolle wurde GAPDH einem polyklonalen Kaninchen- α -GAPDH-Antiserum (Sigma, 1:1000) detektiert. Als sekundärer Ak wurde jeweils ein polyklonales Ziege- α -Kaninchen IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) benutzt. Die Detektion von VSV-G erfolgte mit einem monoklonalen Maus- α -VSV-G-Antikörper (1:100 verdünnt), als sekundärer Ak wurde ein polyklonales Ziege- α -Maus IgG-HRP Antiserum (Dako, 1:2000) verwendet.

Im WB der Zellysate konnte eine vergleichbare Gag-Expression der Konstrukte pClgag2, M141, M142, M143 sowie M145 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wies die pr71-Bande der Mutante M144 eine äußerst geringe Intensität auf, wohingegen die pr68-Bande noch deutlich zu erkennen war. Zusätzlich konnte eine weitere Gag-Bande mit einem deutlich geringeren Molekulargewicht von schätzungsweise 55-60 kDa detektiert werden. In der VSV-G-Expressionsanalyse konnten vergleichbare Bandenintensitäten in allen Proben festgestellt werden. Im WB der Partikelpräparationen konnte mit Ausnahme der Mutante M144 in allen mit dem PFV Env-Expressionsplasmid pCenv1 kotransfizierten Ansätzen eine Kapsidfreisetzung in den Überstand detektiert werden. Wurde dagegen pcDNA3.1

Ergebnisse

anstelle von pCenv1 kotransfiziert, so war unabhängig vom verwendeten Gag-Konstrukt in keinem der Ansätze Gag-Protein im Überstand detektierbar. In den Ansätzen, in denen pMD2.G anstelle von pCenv1 kotransfiziert wurde, konnte ebenfalls unabhängig vom verwendeten Gag-Konstrukt in keinem der Ansätze Gag-Protein im Überstand detektiert werden. Im Falle der Mutante M144 konnte wie in den Zellsaten keine pr71/pr68-Gag-Doppelbande im Überstand festgestellt werden, stattdessen wurde wiederum eine singuläre Bande (55-60 kDa) detektiert. Die Ursache für diesen vom WT sowie allen anderen pCigag2- und pczHSRV2-Mutanten abweichenden Phänotyp konnte nicht geklärt werden, jedoch schien in diesem Falle eine zusätzliche Gag-Prozessierung stattgefunden zu haben.

Parallel zur WB-Analyse wurde mittels FACS-Analyse zum einen eine mögliche Pseudotypisierung der Gag-Mutanten mit VSV-G untersucht. Zudem wurde der Export der mutierten Kapside durch pco PE 01 Ubi- analysiert. Dabei handelt es sich um ein PFV Env-Expressionsplasmid, in welchem alle fünf potentiellen Ubiquitinierungsstellen innerhalb des LP (K14,15,18,34,53) gegen Arginin substituiert wurden. Wie in Kap. 1.2.3.3. beschrieben, wird die Freisetzung von SVPs durch die Ubiquitinierung der Lysine des LP reguliert, wobei alle fünf Lysine ubiquitiniert werden können, jedoch die ersten drei präferentiell genutzt werden (Stanke et al., 2005). Die in dieser Weise mutierten Env-Proteine vermitteln jedoch nach wie vor den PFV Gag-Export (Stanke et al., 2005). pco PE 01 Ubi- wie auch das als Positivkontrolle verwendete pco PE WT sind Kodon-optimierte PFV Env-Konstrukte, welche eine effizientere Expression in eukaryontischen Zellen gewährleisten sollten. Für die FACS-Analyse wurden 293T-Zellen in 6cm-Schalen mit jeweils 3,5 µg pTW01, 0,4 µg pCpol2, 1,8 µg pCigag2 bzw. den jeweiligen gag-Substitutionsmutanten sowie 0,4 µg pco PE WT, pco PE 01 Ubi- oder pMD2.G kotransfiziert. 48 h n.T. wurden jeweils 500, 300 und 100 µl zellfreie Virusüberstände von den transfizierten Zellkulturen auf HT1080-Zellen transferiert. Drei Tage nach dem Überstandstransfer wurden die Indikatorzellen auf die Expression des Reportergens *egfp* und damit den pTW01-Vektortransfer hin untersucht.

Ergebnisse

Probe	% EGFP-pos. Zellen	% im Vgl. zum WT
pClgag2 + pco PE WT	17,31	---
pClgag2 + pco PE 01 Ubi-	14,26	---
pClgag2 + pMD2.G	0,12	---
pClgag2 M141 + pco PE WT	1,30	7,51
pClgag2 M141 + pco PE 01 Ubi-	0,55	3,86
pClgag2 M141 + pMD2.G	0,08	62,50
pClgag2 M142 + pco PE WT	14,01	80,93
pClgag2 M142 + pco PE 01 Ubi-	8,17	57,31
pClgag2 M142 + pMD2.G	0,04	33,33
pClgag2 M143 + pco PE WT	9,01	52,07
pClgag2 M143 + pco PE 01 Ubi-	4,66	32,66
pClgag2 M143 + pMD2.G	0,05	37,50
pClgag2 M144 + pco PE WT	0,08	0,46
pClgag2 M144 + pco PE 01 Ubi-	0,33	2,31
pClgag2 M144 + pMD2.G	0,05	37,50
pClgag2 M145 + pco PE WT	20,35	117,57
pClgag2 M145 + pco PE 01 Ubi-	21,33	149,63
pClgag2 M145 + pMD2.G	0,04	29,17

Tab. 15: Mittelwert der FACS-Analyse von HT1080-Zellen nach zwei unabhängigen Transduktionen; 293T-Zellen wurden mit pTW01, pc pCpol2, pClgag2 bzw. den *gag*-Substitutionsmutanten M141-M145 sowie pco PE WT, pco PE 01 Ubi- oder pMD2.G kotransfiziert. 48 h nach n.T. wurden zellfreie Virusüberstände auf HT1080-Zellen transferiert und diese drei Tage später mittels FACS-Analyse auf die Expression des Reportergens *egfp* hin untersucht. Die angegebenen Werte wurden anhand der HT1080-Zellkulturen ermittelt, welche mit jeweils 300 µl zellfreien Virusüberständen infiziert wurden.

Alle pClgag2-Substitutionsmutanten außer der Mutante M144 generierten infektiöse Viruspartikel, wobei der Titer der Mutante M141 wie im pczHSRV2-Kontext unter dem WT-Titer lag. Die Titer der Substitutionsmutanten M142, M143 sowie M145 lagen in der gleichen Größenordnung wie jener des WT. Zudem war sowohl im Falle von pClgag2 als auch der Substitutionsmutanten M141-M143 die pTW01-Transduktionsrate nach Kotransfektion der *env*-Mutante pco PE 01 Ubi- leicht niedriger (maximal um den Faktor zwei) als nach Kotransfektion des entsprechenden WT-Konstrukts pco PE WT. Einzig die Mutante M145 generierte nach Kotransfektion von pco PE 01 Ubi- geringfügig höhere Titer als nach Kotransfektion von pco PE WT. Dementsprechend hatte die Ubiquitinierung der *gag*-Mutanten nur geringe

Ergebnisse

Auswirkungen auf eine Freisetzung durch die Ubiquitin-negative LP-Mutante. Zudem konnte wie schon in der WB-Analyse für sämtliche Proben keine Pseudotypisierung mit VSV-G festgestellt werden.

Wie aufgrund der WB-Analyse (Abb. 33) vermutet, generierte die Mutante M144 unabhängig vom kotransfizierten Env-Konstrukt keine infektiösen Viruspartikel mehr. Damit wies diese Mutante im pCIgag2-Kontext einen grundlegend anderen Phänotyp als im pczHSRV2-Kontext, in welchem keine Abweichungen vom WT hinsichtlich der Freisetzung und Infektiösität der Partikel festgestellt werden konnten, auf.

3.2.9. Untersuchung der Replikationsfähigkeit der Substitutionsmutanten in Interferon-behandelten MRC-5-Zellen

Interferone (IFN) sind von virusinfizierten Zellen produzierte, antiviral wirksame Botenstoffe, welche die Virusreplikation sowohl in der Produktionszelle als auch in nichtinfizierte Zielzellen inhibieren können (Janeway et al., 2002). Daneben besitzen IFN auch antiproliferative, antitumorale sowie immunmodulatorische Aktivität (Der et al., 1998). Es sind mehrere Untergruppen von IFN bekannt, wobei IFN- α und - β (Typ I-Interferone) direkt infolge einer Virusinfektion u.a. von Leukozyten und Fibroblasten produziert werden, IFN- γ dagegen erst später im Laufe der Immunreaktion von inflammatorischen Immunzellen sezerniert wird (Janeway et al., 2002). IFN vermitteln ihre Wirkung über die Induktion verschiedener Effektormoleküle, darunter einer dsRNA-abhängigen Proteinkinase, welche über die Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF-2 die Proteinbiosynthese hemmt (Baglioni, 1979), und einer 2',5'-Oligoadenylatsynthase (2'5'-OAS), welche über eine Aktivierung einer latenten Endonuklease (RNase L) zum Abbau zellulärer wie auch viraler mRNAs führt (Johnston und Torrence, 1984). Daneben aktivieren IFN weitere antiviral wirksame Effektormoleküle. So konnten Asaoka et al., 2005 eine durch IFN- α , - β sowie - γ induzierte verstärkte Trim5 α mRNA-Synthese nachweisen. In der Diskussion wird die Rolle dieses antiretroviral wirksamen Restriktionsfaktors genauer erörtert werden. Für IFN- α konnte zudem eine Induktion von APOBEC3G (Peng et al., 2006) sowie einer bestimmten ADAR- (adenosine deaminases that act on double-stranded RNA) Isoform (ADAR 1 p150) (Patterson und Samuel, 1995) nachgewiesen werden. ADARs sind dsRNA-editierende Enzyme, auf welche in der Diskussion genauer eingegangen werden wird. Wie in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt

Ergebnisse

wurde, kann durch exogene Applikation von IFN auf Zielzellen wie Fibroblasten oder Makrophagen die retrovirale Replikation teilweise oder nahezu vollständig gehemmt werden. So konnten Falcone et al., 1999 durch Transfer des Überstandes aktivierter peripherer Blutlymphozyten (PBL) wie auch durch Applikation von rekombinantem humanem IFN- γ auf humane Fibroblasten eine starke aber nicht vollständige Inhibition der foamyviralen Replikation erreichen. Zudem konnte auch für IFN- α und - β eine inhibitorische Wirkung auf die Replikation von PFV in IFN-sensitiven humanen Zelllinien gezeigt werden (Rhodes-Feuillette et al., 1990, Sabile et al., 1996). Ähnliche Resultate wurden für HIV-1 in mit IFN- α , - β und - γ behandelten Makrophagen (Meylan et al., 1993) bzw. in mit IFN- α behandelten T-Zellen (Shirazi und Pitha, 1992) erzielt.

Der genaue Angriffspunkt der IFN im viralen Replikationszyklus ist nicht bekannt. Abhängig vom verwendeten Zelltyp und abhängig davon, ob eine oder mehrere Replikationsrunden durchgeführt wurden bzw. ob Zellen vor einer Infektion mit IFN behandelt wurden oder zum Zeitpunkt der IFN-Applikation eine Infektion bereits etabliert war, wurde eine Wirkung von IFN während eines frühen Zeitpunkts der Replikation zwischen Zelleintritt und der Integration (Shirazi und Pitha, 1992) oder zu einem späten Zeitpunkt durch eine Hemmung des Assemblys und der Freisetzung (Meylan et al., 1993) postuliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von MRC-5-Zellen, einer IFN-sensitiven primären humanen Lungenfibroblastenzelllinie, die Replikationsfähigkeit sowohl der Arginin-Lysin-Substitutionsmutanten M141-M145 und M154 (M143+M145) als auch der Mutante M158 (K396R) im Vergleich zum WT in der Gegenwart von IFN- α und - γ untersucht werden. Die kombinatorische Mutante M154 wurde aufgrund der Tatsache gewählt, daß sie unter den Mutanten, welche dem WT vergleichbare infektiöse Titer generierten (s. Kap.3.2.2.), diejenige mit den meisten Substitutionen (sieben) darstellte. Um eine IFN-induzierte Restriktion der verschiedenen Mutanten miteinander vergleichen zu können, wurden die MRC-5-Zellen mit einer definierten Virusmenge (multiplicity of infection, MOI) infiziert. Dabei wurde rein rechnerisch eine Zelle von einer definierten Virusmenge infiziert. In diesem Versuch wurde eine MOI von 0,1 gewählt (analog zu Rhodes-Feuillette et al., 1990 sowie weiteren Veröffentlichungen). Damit entsprach die Virusmenge zum Zeitpunkt der Infektion 1/10 der vorhandenen Zellzahl. Zur Bestimmung der MOI wurden 293T-Zellen in 6 cm-Schalen mit je 3 μ g pczHSRV2 bzw. der verschiedenen Mutanten sowie 3 μ g

Ergebnisse

pcDNA3.1 kotransfiziert. Zwei Tage n. T. wurden zellfreie Virusüberstände geerntet. Ein Aliquot wurde zur Titerbestimmung mittels histochemischer β -Galactosidase-Färbung verwendet, der Rest wurde bis zur Infektion der MRC-5-Zellen bei -80°C eingefroren. Da die Virustiter durch das Einfrieren bei -80°C erfahrungsgemäß etwa um eine log-Stufe abfallen, wurden auch die Aliquots zur Titerbestimmung für drei Stunden bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Proben auf Eis aufgetaut und auf 24 h zuvor ausgesäte BHK/LTR(PFV)/acZ-Indikatorzellen titriert. Drei Tage danach wurden die Virustiter mittels histochemischer β -Galactosidase-Färbung ermittelt. Zur Einstellung der MOI wurde angenommen, daß sich die Anzahl der MRC-5-Zellen innerhalb eines Tages etwa verdoppelte. Diese wurden am Tag vor der Infektion in 12-Well-Platten ausgesät (4×10^4 x Zellen pro Well). Dementsprechend wurde zum Zeitpunkt der Infektion eine ungefähre Zellzahl von 8×10^4 x Zellen pro Well angenommen. Die für die Infektion eingefrorenen Virusüberstände wurden auf Eis aufgetaut und mit Medium so verdünnt, daß $100 \mu\text{l}$ 8×10^3 Viruspartikel enthielten. Schließlich wurden die MRC-5-Zellen mit jeweils $100 \mu\text{l}$ der Überstände in 1 ml Gesamtvolumen infiziert.

24 h vor Infektion wurden die MRC-5-Zellen mit je 100 U/ml Medium rekombinantem humanem Interferon- α (spezif. Aktivität $1,8 \times 10^8$ U/mg Protein, Peprotech) oder - γ (spezif. Aktivität 2×10^7 U/mg Protein, Peprotech) behandelt. Dies entsprach den in anderen Veröffentlichungen (u.a. Rhodes-Feuillet et al., 1990) verwendeten IFN-Konzentrationen. Vor der Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, zur Aufrechterhaltung des antiviralen Status der Zellen wurden wiederum je 100 U/ml Medium rekombinantes humanes Interferon- α oder - γ auf die MRC-5-Zellen appliziert. Als Positivkontrolle wurden alle Viren auf unbehandelten MRC-5-Zellen passagiert. Drei Tage nach Infektion konnte nur in den unbehandelten Zellkulturen ein schwacher CPE beobachtet werden. Aufgründessen wurde auf die Zellen ein weiterer ml frisches Medium entweder ohne oder mit 100 U der entsprechenden Interferone appliziert und diese bis zum Auftreten eines ausgeprägteren CPEs weitere zwei Tage inkubiert. Fünf Tage nach der Infektion wurden 24 h zuvor ausgesäte BHK/LTR(PFV)/acZ-Indikatorzellen mit den zellfreien Virusüberständen infiziert und drei Tage später die infektiösen Titer mittels histochemischer β -Galactosidase-Färbung bestimmt. Tab. 15 gibt eine Übersicht über die jeweilige Ausprägung des CPEs zum Zeitpunkt der Virusernte, in Tab. 16 sind die infektiösen Titer zweier Versuche dargestellt.

Ergebnisse

Probe	- IFN	100 U/ml IFN α	100 U/ml IFN γ
pczHSRV2 wt	++	+	-
pczHSRV2 M141	++	+	-
pczHSRV2 M142	++	+	-
pczHSRV2 M143	++	+	-
pczHSRV2 M144	++	-	-
pczHSRV2 M145	++	-	-
pczHSRV2 M154	++	-	-
pczHSRV2 M158	+	-	-

Tab. 16: Ausprägung des CPEs in den infizierten MRC-5-Zellkulturen fünf Tage nach Infektion (Durchführung s. Erläuterung Tab. 16); ++: einzelne CPEs; +: sehr vereinzelt CPEs; -: kein CPE

Probe	- IFN: Titer ffu/ml	100 U/ml IFN- α : Titer ffu/ml	100 U/ml IFN- γ : Titer ffu/ml
pczHSRV2 wt	6,34E+04	2,83E+03	12
pczHSRV2 M141	3,00E+03	1,11E+02	0
pczHSRV2 M142	6,59E+04	4,20E+02	1
pczHSRV2 M143	1,14E+04	4,25E+02	3
pczHSRV2 M144	3,13E+04	58	1,5
pczHSRV2 M145	2,85E+04	31	1
pczHSRV2 M154	9,78E+03	8	0
pczHSRV2 M158	72	6	0

Tab. 17: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) nach zwei unabhängigen Transfektionen und anschließender Passagierung auf Interferon-behandelten MRC-5-Zellen; 293T-Zellen wurden mit pczHSRV2 bzw. den verschiedenen Substitutionsmutanten transfiziert. Die Virusüberstände wurden auf eine MOI von 0,1 eingestellt und Interferon-behandelte MRC-5-Zellen (Kontrollen: unbehandelte Zellen) damit infiziert. Nach fünf Tagen wurden die zellfreien Überstände zur Titerbestimmung durch Infektion von BHK/LTR(PFV)/lacZ-Zellen und histochemischer β -Galactosidase-Färbung drei Tage danach verwendet.

In sämtlichen unbehandelten MRC-5-Zellkulturen konnte fünf Tage nach Infektion ein CPE beobachtet werden, wobei dieser im Falle der mit der Mutante M158 infizierten Zellen deutlich schwächer ausgeprägt war als in den übrigen Proben. Eine Kultivierung der Zellen in der Gegenwart von 100 U/ml IFN α führte dagegen zu einer deutlichen Abschwächung des CPEs. In den mit dem WT sowie den Mutanten M141, M142 sowie M143 infizierten Proben waren fünf Tage nach Infektion nur noch sehr vereinzelt CPEs festzustellen, die mit den Mutanten M144, M145, M154 sowie M158 infizierten Zellen entwickelten keinen CPE mehr. Eine Inkubation in der Gegenwart von 100 U/ml IFN γ führte in allen Proben zu einer vollständigen Hemmung einer CPE-Ausbildung. Diese morphologischen Beobachtungen spiegelten sich auch in den jeweiligen infektiösen Virustitern wider. Wurden die

Ergebnisse

Zellen in Abwesenheit von IFN inkubiert, so generierten der WT sowie die Mutanten M142, M143, M144, M145 und M154 Titer innerhalb einer Größenordnung. Wie erwartet lag der Titer der Mutante M141 auch in dieser Analyse unter dem WT-Titer, wenngleich nur um eine Größenordnung und nicht wie in den meisten anderen Titerbestimmungen um zwei Größenordnungen. Somit deckten sich diese Resultate weitestgehend mit jenen der vorangegangenen Versuche. Bemerkenswerterweise generierte die Mutante M158, welche in immortalisierten Zellen wie das WT-Virus replizierte, nur noch sehr niedrige infektiöse Titer von weniger als 100 Viren/ml Überstand.

Wurden die MRC-5-Zellen in Gegenwart von 100 U/ml IFN α inkubiert, so war bei allen Proben ein Abfall der infektiösen Titer zu beobachten. Im Falle des WT sowie der Mutanten M141 und M143 sank dieser um eine Zehnerpotenz, im Falle der Mutante M142 um zwei Zehnerpotenzen. Sehr viel drastischer fiel der Unterschied jedoch bei den übrigen Proben aus. So fielen die Titer der Mutanten M144 und M145 um drei Zehnerpotenzen, die Mutanten M154 und M158 generierten praktisch kein infektiöses Virus mehr.

Die Applikation von 100 U/ml IFN γ auf die Zellen hatte einen noch stärkeren Effekt auf die Virusreplikation. So konnte nur noch für den WT sowie die Mutanten M142, M143, M144 sowie M145 eine sehr geringe Infektiösität nachgewiesen werden, in allen anderen Proben war keine produktive Virusreplikation mehr festzustellen. Dieser Versuch wies auf Unterschiede in der IFN-Sensitivität der verschiedenen Mutanten sowie auf eine gehemmte Replikation der Mutante M158 in primären Zellen hin.

4. Diskussion

FV unterscheiden sich durch mehrere Besonderheiten von Orthoretroviren. Dies betrifft sowohl die Genomorganisation als auch die Regulation der Proteinexpression sowie den Replikationszyklus (s. Kap. 1.2.2.-1.2.4.). Gleichzeitig weisen sie mehrere Gemeinsamkeiten mit den Hepadnaviren auf, sowohl hinsichtlich ihrer Replikationsstrategie (reverse Transkription noch in der virusproduzierenden Zelle) als auch ihrer Morphogenese. Dies betrifft beispielsweise die Fähigkeit zur Freisetzung von Env in Form von SVPs, wenngleich dies bei Hepadnaviren in einem sehr viel größeren Ausmaß stattfindet (Ganem, 2004). Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Abhängigkeit des zellulären Kapsidexportes von der Anwesenheit des homologen Glykoproteins. Dieses Merkmal der foamyviralen Partikelmorphogenese wurde im ersten Teil dieser Arbeit behandelt.

Die Gag-Proteine sowohl von PFV als auch aller anderen FV-Isolate weisen eine weitere Besonderheit auf, nämlich einen äußerst geringen Lysingehalt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde anhand der Beispiele von PFV sowie von FFV der Frage nachgegangen, welche Funktionen Arginine in foamyviralen Gag-Proteinen während der Replikation übernehmen.

4.1. Identifikation eines Env-interagierenden Motivs in PFV Gag

FV verfolgen mit einer intrazytoplasmatischen Kapsidassemblierung eine ähnliche Morphogenesestrategie wie B- und D-Typ-Retroviren. Im Gegensatz zu diesen knospen FV Kapside jedoch an intrazellulären Membranen und nur in Anwesenheit des homologen Env-Proteins (Baldwin et al., 1998, Fischer et al., 1998, Pietschmann et al., 1999). Cartellieri et al., 2005 zeigten, daß die N-terminalen 297 As für eine Env-abhängige Freisetzung von partikelassoziiertem Gag ausreichend sind und daß eine Interaktionsdomäne mit dem foamyviralen Glykoprotein innerhalb der N-terminalen 100 As lokalisiert ist. Zudem wurde für die As 9-18 am N-Terminus von PFV Gag die Ausbildung eines cc-Motivs vorausgesagt.

Basierend darauf wurde in dieser Arbeit versucht, mittels eines chimären Konstruktes aus den Gag-Proteinen von MPMV und PFV ein Env-interagierendes Motiv sowie die für die Interaktion mit dem Glykoprotein essentiellen As zu identifizieren. Im Plasmid pDM1 wurde der MA-kodierende Anteil des MPMV *gag*-ORFs gegen den Teil des

Diskussion

PFV *gag*-ORFs substituiert, welcher für die N-terminalen 303 Aa kodiert. Dadurch wurden chimäre Kapside auf der Basis von MPMV Gag exprimiert, deren zellulärer Export PFV Env restringiert ist. Basierend auf diesen chimären Kapsiden wurden Deletionsmutationen hergestellt sowie ein Alanin-scanning des PFV Gag-Abschnittes durchgeführt, um Motive und Aa zu identifizieren, welche an einer Interaktion mit Env beteiligt sind. Durch die Anfertigung von Immunfluoreszenz- sowie elektronenmikroskopischen (EM-) Aufnahmen wurde die intrazelluläre Lokalisation sowie die Morphologie von Gag-Chimären untersucht, welche infolge einer Mutation keinen PFV Env-abhängigen zellulären Export mehr zeigten.

Für die Überprüfung der Funktionalität der Konstrukte pDM1, pDM2 sowie pDM38 wurde eine WB-Analyse durchgeführt. Mit einem polyklonalen α -MPMV p27 Antiserum konnten in den Zellysaten die MPMV Gag-Vorläufermoleküle (pr78) wie auch die chimären Vorläufermoleküle (pr101) detektiert werden. In den WB der Partikelpräparationen wurde die prozessierte CA-Untereinheit p27 detektiert. Dadurch konnte gezeigt werden, daß eine Gag-Expression von pDM1 und pDM2 sowie eine Prozessierung der Gag-Vorläufermoleküle durch die MPMV Protease stattfand. Zudem konnte durch Verwendung eines polyklonalen α -PFV Gag Antiserums (Kaninchen- α -PFV Gag 122) die Translation des N-terminalen PFV Gag-Anteils nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auffällig war dabei jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen pDM1 und pDM2 hinsichtlich der Intensitäten der Gag-Banden sowohl in den Zellysaten als auch in den Überständen. Dieser Gesichtspunkt soll später genauer erörtert werden. Zudem fiel auf, daß das Ausmaß des MPMV Gag-Exportes in der Anwesenheit des homologen MPMV Glykoprotein geringer war als nach Kotransfektion von Zellen mit pCenv1 bzw. in der Abwesenheit von Env-Protein. Sfakianos und Hunter, 2003 zeigten, daß das MPMV Glykoprotein für einen effizienten Transport der MPMV Kapside von der Assemblierungsregion zum Ort des Buddings nötig ist. Jedoch wurde in dieser Veröffentlichung auch auf frühere Experimente hingewiesen, in denen in konfluenten Zellkulturen, welche auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, eine effizientere Partikelfreisetzung in der Abwesenheit von MPMV Env stattfand als in nichtkonfluenten Zellkulturen.

Durch Kotransfektion der Zellen mit pDM1 oder pDM2 zusammen mit den jeweiligen Env-Expressionsplasmiden konnte gezeigt werden, daß sich die chimären Gag-Proteine hinsichtlich des PFV Env-abhängigen zellulären Exportes wie PFV Gag-Proteine verhielten. Zum einen wurde nur in Anwesenheit des homologen PFV

Diskussion

Glykoproteins Gag im Überstand detektiert. Zum anderen konnten die Gag-Chimären nicht mit dem heterologen Glykoprotein VSV-G pseudotypisiert werden. Diese Resultate waren die Voraussetzung für eine weitergehende Untersuchung der PFV Gag-Env-Interaktion mittels pDM1.

Durch Einführen verschiedener Deletionen wurde zunächst eine grobe Eingrenzung eines Env-interagierenden Motives vorgenommen. Mittels WB-Analyse der Partikelpräparationen konnte gezeigt werden, daß die N-terminalen 197 As von PFV Gag ausreichend waren, um PFV Env-abhängig aus der Zelle exportiert zu werden. Dieses Ergebnis ist in Analogie zu der von Wilk et al., 2001 gezeigten spezifischen Interaktion der N-terminalen 154 As von FFV Gag mit Peptidabschnitten des FFV Env LP zu sehen. Weitergehende C-terminale Deletionen im PFV Gag-Anteil der chimären Gag-Proteine verhinderten jedoch die Freisetzung von Gag. Die Deletion der beiden cc-Motive (As 130-150, 160-180) in den Mutanten pDM6 (Δ C132) und pDM7 (Δ C65) verhinderte möglicherweise eine für die Env-Interaktion notwendige, korrekte Konformation von Gag. Zudem stellt das erste cc-Motiv eine Interaktionsdomäne dar und vermittelt damit die Multimerisierung von PFV Gag zu Kapsiden. Zwar erfüllt die ISD im p12-Protein von MPMV die gleiche Funktion, sodaß eine Zusammenlagerung der Vorläufer-Gag-Proteine zu Kapsiden möglich schien, jedoch konnte diese Domäne anscheinend nach der Prozessierung durch die virale Protease keine Interaktion der PFV Gag-Moleküle mehr vermitteln. Gegen diese Ausführungen, vor allem die Deletionsmutante pDM6 (Δ C132) betreffend, spricht jedoch die Beobachtung, daß für eine PFV Gag-Deletionsmutante, welche die N-terminalen 129 As umfaßt, ein PFV Env-abhängiger Gag-Export mittels des monoklonalen α -PFV Gag-Antikörpers SGG1 nachgewiesen werden konnte (Dirk Lindemann, pers. Mitteilung). Somit kommt möglicherweise auch eine zu geringe Sensitivität des CA-Antiserums bei der Beurteilung der Detektion von Mutanten, welche nur ein geringes Ausmaß an Gag-Freisetzung zeigten, in Betracht.

Die Deletion der N-terminalen 20 As in pDM3 (Δ 2-20) führte ebenso zu keiner detektierbaren Env-abhängigen Gag-Freisetzung. Ob dies jedoch auf die Deletion eines Env-interagierenden Motives zurückzuführen war oder der Verlust des cc-Motivs in diesem Bereich strukturell nicht toleriert wurde, konnte nicht abschließend beurteilt werden. Der für die Mutante pDM4 (Δ 80-120) beobachtete Export-Block war möglicherweise durch sterische Zwänge, welche die Deletion schuf, begründet. Es ist vorstellbar, daß die interne Deletion größere Auswirkungen auf die Gesamtstruktur

Diskussion

des Proteins hatte als die vorgenommenen terminalen Deletionen. Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Deletionsmutanten wurde ein Alaninscreening beginnend vom N-Terminus bis zum Beginn des CTRS in PFV Gag durchgeführt.

Bei der Analyse der PFV Env-abhängigen Gag-Freisetzung in den Überstand wurden mehrere Alanineinzelmutanten ermittelt, bei welchen kein Gag-Protein mehr in den Partikelpräparationen detektierbar war. Im Falle der Mutante pDM25 (L17A) war die Gag-Freisetzung stark verringert. Nach Substitution der As L17 gegen Serin in der Mutante pDM26 (L17S) konnte dagegen kein CA-Protein mehr im Überstand detektiert werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Cartellieri et al., 2005, der die Mutationen L17A sowie L17S in den infektiösen PFV-Klon pczHSRV2 einführte. Dabei wies die L17A-Mutante noch einen Env-abhängigen Gag-Export auf und EM-Aufnahmen zeigten im Zytoplasma einzelne Kapside. Dagegen war im Falle der L17S-Mutante kein Gag mehr im Überstand detektierbar und in EM-Aufnahmen waren zwar noch Gag-Aggregate, jedoch keine Kapside mehr sichtbar. Aufgrund dieser Resultate wurde vermutet, daß die Substitution der hydrophoben As Leucin gegen die hydrophile As Serin die Ausbildung des cc-Motivs in diesem Gag-Abschnitt massiv störte (Cartellieri et al., 2005). Wie im pcHSRV2-Kontext (Cartellieri et al. 2005) konnte auch in dieser Arbeit für die Mutante pDM37 (L56,58A) kein Gag mehr im Überstand detektiert werden. Cartellieri et al. erklärten diesen Phänotyp mit einem Transportdefekt der mutierten Gag-Proteine, sodaß diese nicht mehr zu Kapsiden multimerisieren konnten. Desweiteren konnte für die Mutanten pDM24 (E15A), pDM27 (G33A), pDM28 (E34A) sowie pDM32 (L38A) kein Gag-Export festgestellt werden. Im Falle der Mutante pDM20 (RLTE39-42AAAA) war zwar kein Gag im Überstand detektierbar, die Einzelmutanten pDM33 (R39A), pDM34 (L40A), pDM35 (T41A) und pDM36 (E42A) zeigten jedoch keine Beeinträchtigung des Gag-Exportes. Möglicherweise führte die Substitution von vier aufeinanderfolgenden As gegen Alanin zu einer Beeinträchtigung der Proteinfaltung, wohingegen der Austausch einzelner As gegen Alanin toleriert wurde. In der darauffolgenden Immunfluoreszenzanalyse von pDM1 sowie der export-negativen Alaninmutanten pDM24 (E15A), pDM27 (G33A), pDM28 (E34A) sowie pDM32 (L38A) zeigte sich für alle Proben ein zur Positivkontrolle pczHSRV2 vergleichbarer Phänotyp. Die chimären Gag-Proteine zeigten wie PFV Gag-Proteine eine perinukleäre Akkumulation, welche für die Assemblierung zu Kapsiden erforderlich ist. Sowohl in

Diskussion

MPMV Gag (Choi et al., 1999) als auch in PFV Gag (Yu et al., 2006) konnte ein CTRS als das für den Gag-Transport zu den Zentrosomen verantwortliche Signal identifiziert werden. Auch im Hinblick auf die Kollokalisierung mit dem PFV Glykoprotein gab es keine Unterschiede zwischen der pczHSRV2, pDM1 und den Substitutionsmutanten.

Für eine genauere Untersuchung der intrazellulären Lokalisation sowie der Morphologie der chimären Kapside wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. In den mit pDM1, pDM24 (E15A), pDM27 (G33A), pDM28 (E34A) sowie pDM32 (L38A) transfizierten Zellen waren jedoch keinerlei Kapside oder partikuläre Strukturen zu erkennen. Cartellieri et al., 2005 konnten in der EM-Analyse der C-terminalen PFV Gag-Deletionsmutante pMC60 Δ 297 und weiterer C-terminaler Verkürzungen zwar extrazelluläre virusähnliche Partikel nachweisen, jedoch wiesen diese keine reguläre Kapsidstruktur mehr auf. Zudem konnten im Zytoplasma keine Kapside entdeckt werden. Daraus wurde geschlußfolgert, daß die verkürzten Gag-Proteine zwar in Form partikulärer Gag-Aggregate Env-abhängig aus der Zelle freigesetzt werden konnten, jedoch nicht mehr in der Lage waren, sich zu regulären Kapsiden zusammenzulagern. Die in dieser Arbeit konstruierten Gag-Chimären wiesen zwar noch die Fähigkeit zu einer Interaktion mit dem PFV Glykoprotein auf, beruhend auf der Integrität des dafür notwendigen PFV Gag N-Terminus. Die MPMV Gag-Domänen des chimären Proteins führten jedoch wahrscheinlich zu massiven sterischen Zwängen in anderen Proteinbereichen, was eine Multimerisierung zu partikulären Strukturen oder Kapsiden verhinderte. Somit könnte eine Freisetzung von Gag-Env-Proteinkomplexen beispielsweise in Form von Vesikeln stattgefunden haben, welche jedoch keine elektronendichten Strukturen wie Kapside darstellten und deswegen in der EM-Analyse nicht als solche erkennbar waren.

In mehreren WB-Analysen war eine verringerte Gag-Expression von pDM1 im Vergleich zu pDM2 wie auch zu diversen Alaninmutanten festzustellen. Dementsprechend wiesen auch die entsprechenden CA-Banden in den Überständen geringere Intensitäten als im Falle anderer Proben auf. Zudem waren in den meisten Zellsaten Schwankungen in den Bandenintensitäten zwischen den verschiedenen Proben festzustellen. Der genaue Grund dafür ist nicht bekannt. Möglicherweise wiesen die chimären Gag-Vorläufermoleküle eine geringere Stabilität als natürliche MPMV oder PFV Gag-Moleküle auf. Eine fehlende Multimerisierung zu Kapsiden könnte zu einem beschleunigten Abbau durch zelluläre Proteasen geführt haben.

Diskussion

Dies würde die etwas geringeren Intensitäten der Gag-Fluoreszenzen im Vergleich zu pczHSRV2 in der IF-Analyse erklären. Als Konsequenz der verhinderten Partikelmorphogenese der Gag-Chimären wurden die vier Alaninsubstitutionen E15A, G33A, E34A sowie L38A, welche im pDM1-Kontext eine PFV Env-Freisetzung verhinderten, im pczHSRV2-Kontext exprimiert. Dabei wiesen sämtliche Alaninmutanten in einer WB-Analyse mit einem polyklonalen PFV Gag-Antiserum keinen vom WT abweichenden Phänotyp bezüglich des PFV Env-abhängigen Exportes auf. Ein möglicher Grund dafür könnte wie bereits erwähnt eine zu geringe Sensitivität des verwendeten MPMV CA-Antiserum bei der Detektion von Mutanten mit einem geringen Ausmaß an Gag-Freisetzung sein. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß die eingeführten Alaninsubstitutionen im Kontext der chimären Konstrukte zu einem anderen Phänotyp führten als im pczHSRV2-Kontext. In der IF-Analyse der pczHSRV2-Mutanten zeigten sich wie auch für die Gag-Chimären beschrieben weder Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation der Gag-Mutanten noch in der Kolo-kalisation mit dem Glykoprotein. In der EM-Analyse konnte in allen Proben intrazelluläre Kapside mit WT-Morphologie nachgewiesen werden. In den mit den Mutanten pczHSRV2 M160 (G33A), M161 (E34A) sowie pczHSRV2 M162 (L38A) transfizierten Proben waren zudem extrazelluläre Viruspartikel zu beobachten. Im Gegensatz dazu waren in der mit der Mutante M159 (E15A) transfizierten Probe keine extrazellulären Viruspartikel zu finden. Dies widerspricht dem Ergebnis der WB-Analyse, in welcher auch für diese Mutante Gag-Protein im Überstand detektiert werden konnte. Da die Fixierung der transfizierten Zellkulturen zu einem vergleichbaren Zeitpunkt stattfand wie die Ernte der zellfreien Überstände für die WB-Analyse (48 h p.T.), ist eine verzögerte Partikelfreisetzung als Grund für das Fehlen extrazellulärer Partikel in dieser Probe unwahrscheinlich. Zudem ist es fraglich, ob der Austausch der As E15 gegen Alanin allein eine Inhibition der Env-Interaktion bewirken konnte, da diese Substitution analog zur L17A-Mutante für die Struktur des cc-Motivs am PFV Gag N-Terminus wohl tolerierbar war. Letztlich konnte die Ursache für die Diskrepanz zwischen WB- und EM-Analyse nicht geklärt werden.

Abschließend ist festzustellen, daß die für die Gag-Chimären erzielten Ergebnisse nur bedingt auf das PFV Gag-Protein im natürlichen Kontext übertragbar waren. Mit Hinblick auf einige Aspekte wie die perinukleäre Akkumulation und die Abhängigkeit der Freisetzung von PFV Env verhielten sich die Gag-Chimären wie PFV Gag-

Proteine, jedoch stellten sie vor allem aufgrund der fehlenden Partikelmorphogenese kein geeignetes System zur funktionellen Analyse der PFV Gag-Env-Interaktion dar.

4.2. Funktionelle Analyse basischer Aminosäurereste in FV Gag

4.2.1. Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf das virale Replikationsverhalten

Foamyvirale Gag-Proteine weisen einen zu orthoretroviralen Kapsiden vergleichbaren Gesamtanteil basischer As auf. In FV Gag wird dieser jedoch überwiegend oder ausschließlich von Arginin repräsentiert, wohingegen orthoretrovirale Gag-Proteine vergleichbare Anteile von Argininen und Lysinen aufweisen (s. Tab. 3). Zudem fällt auf, daß der Anteil von AGG- und AGA-Kodons, welche über eine Einzelmutation aus Lysin-Kodons hervorgegangen sein könnten, in orthoretroviralen wie foamyviralen Gag-Proteinen etwas über 60 % beträgt (s. Tab. 4). In Orthoretroviren fand dieser Basenaustausch und damit die Substitution von Lysin gegen Arginin in Gag nicht statt, im Laufe der foamyviralen Evolution dagegen traten diese Mutationen auf und wurden durch einen positiven Selektionsdruck etabliert. Die funktionelle Analyse basischer Aminosäurereste wurde im Kontext der proviralen Konstrukte pczHSRV2 (PFV) und pChatul-3 (FFV) vorgenommen. Zur Untersuchung einer möglichen Fähigkeit zur Pseudotypisierung sowie eines Env-unabhängigen Partikelexportes von PFV *gag*-Mutanten wurde das 4-Plasmid-System verwendet. Mittels mutagener PCR wurde eine Reihe von Argininresten, welche ausschließlich durch AGA- oder AGG-Kodons spezifiziert wurden, gegen Lysinreste substituiert. Im Falle von PFV Gag wurden neben Einzelmutanten mehrere kombinatorische Mutanten hergestellt, welche zwischen drei und sieben Substitutionen enthielten. Ebenso wurde das singuläre Lysin in PFV Gag (K396) gegen Arginin substituiert.

In einem ersten Schritt wurde die Replikationsfähigkeit der mutierten Proviren durch Infektion von BHK/LTR(PFV)/*lacZ*- bzw. CrFK/LTR(FFV)/*lacZ*-Indikatorzellen mit zellfreien Virusüberständen und anschließender histochemischer β -Galactosidase-Färbung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß sämtliche PFV- sowie FFV-Mutanten replikationskompetent waren. Bis auf zwei Ausnahmen wiesen alle PFV- sowie FFV *gag*-Einzelmutanten infektiöse Titer auf, welche im Bereich des WT-

Diskussion

Virus lagen. Ebenso hatte der Austausch des singulären Lysins K396 gegen Arginin in der Mutante pczHSRV2 M158 keinen Einfluß auf die Freisetzung infektiöser und replikationskompetenter Viruspartikel. Sowohl in den Partikelpräparationen als auch in der Titerbestimmung konnten keine gravierenden Unterschiede zum WT-Virus festgestellt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, daß das singuläre Lysin in PFV Gag keine essentiellen Funktionen während der Replikation übernimmt. Mit Hinblick auf SFVmac, SFVagm sowie BFV, deren Gag-Proteine keinen Lysinrest enthalten, kann spekuliert werden, daß in sämtlichen FV-Isolaten die in Gag vorhandenen Lysinreste ohne eine Beeinträchtigung der Replikationsfähigkeit gegen Arginin substituiert werden können.

Auffällige quantitative Unterschiede in den ermittelten Virustitern im Vergleich zum jeweiligen WT konnten für PFV im Falle der Mutante M141 sowie aller kombinatorischen Mutanten, welche die Mutation R22,24K enthielten, und für FFV im Falle der Mutante M5 festgestellt werden. 293T-Zellkulturen, welche mit dem Konstrukt pczHSRV2 M141 oder einer kombinatorischen Mutante mit der R22,24K-Substitution transfiziert wurden, entwickelten innerhalb von weniger als 24 h p. T. einen ausgeprägten CPE mit großflächigen Synzytien und einer Vielzahl von Vakuolen. Dies war ungewöhnlich, da diese Zelllinie normalerweise nur einen sehr schwachen CPE infolge Transfektion mit foamyviralen Proviruskonstrukten aufweist. Diese Beobachtung deutete auf eine Auswirkung der Mutation auf die Interaktion von Gag mit dem PFV Glykoprotein hin. Die Substitutionen in pczHSRV2 M141 betreffen die As R22 und R24 und liegen damit in unmittelbarer Nähe des cc-Motivs (As 4-19), welches für die Interaktion mit Env verantwortlich gemacht wird. Das Einführen von Lysinen an diese Positionen könnte eine räumlich begrenzte Konformationsänderung von Gag bewirkt haben, welche diese Interaktion abschwächte und für das Glykoprotein ein Fusionssignal mit Gag-unabhängigem Transport zur Plasmamembran darstellte (D. Lindemann, pers. Mitteilung). Infolge dessen könnte eine verringerte Freisetzung infektiöser Nachkommenviren stattgefunden haben, welche den im Mittel um zwei Zehnerpotenzen niedrigeren Titer im Vergleich zum WT erklären würde.

Die Ursache für den um eine Zehnerpotenz im Vergleich zum WT erniedrigten Titer der Mutante pChatul-3 M5 konnte nicht abschließend geklärt werden, möglicherweise spielten lokal begrenzte und für die Gesamtkonformation von Gag tolerierbare strukturelle Veränderungen eine Rolle. In der Mutante pChatul-3 M2 (R43K) wurde

Diskussion

das innerhalb der FV konservierte Arginin im CTRS gegen Lysin substituiert. Bemerkenswerterweise hatte diese Substitution keine Auswirkungen auf die Freisetzung und Infektiösität der Partikel. Im Gegensatz dazu verhinderte die Mutation dieser As zu Alanin (R43A) die Partikelfreisetzung (Geiselhart et al., 2003). Die Mutation des analogen Arginins im CTRS von PFV *gag* zu Alanin oder Tryptophan (R50A, R50W) führte zu einem Assemblierungs- und Buddingdefekt (Eastman und Linial, 2001). Wurde das analoge Arginin in MPMV *gag* zu Tryptophan mutiert (R55W), so führte dies zu einer Umkehr des Morphogeneseweges von einer D-Typ- hin zu einer C-Typ-Morphogenese (Rhee und Hunter, 1990). Demzufolge ist möglicherweise das Vorhandensein einer basischen As und nicht zwingend von Arginin an dieser Position für die Funktionalität des CTRS notwendig. Um dies zu untersuchen, sollte die entsprechende Substitution in PFV *gag* (R50K) bzw. MPMV *gag* (R55K) eingeführt und eine mögliche Freisetzung infektiöser Partikel analysiert werden.

Neben der Replikationskompetenz wurde die genetische Stabilität der PFV-Mutanten untersucht. Dafür wurden die Gag-Gene aufgereinigter und amplifizierter viraler DNA der Mutanten M141 bis M145 nach zehnmaliger Passagierung auf BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen sequenziert und auf das Auftreten von Revertanten und Pseudorevertanten hin analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß sämtliche Mutanten die eingeführten Arginin-zu-Lysin-Substitutionen enthielten und keine kompensatorischen Mutationen aufgetreten waren. Allerdings besitzt ein solches Zellkulturexperiment über einen relativ kurzen Zeitraum nur eine geringe Aussagekraft bezüglich der genetischen Stabilität von Mutanten. Neben der geringen Zeitspanne dieses Experiments verglichen mit evolutionären Zeiträumen spielt dabei sicherlich auch der im Vergleich zu komplexen und immunkompetenten Organismen schwache Selektionsdruck *in vitro* eine Rolle. Parallel zur *gag*-Sequenzierung wurden die infektiösen Titer der Mutanten nach der zehnten Passage bestimmt. Dabei wiesen sämtliche Mutanten durchweg geringfügig höhere Titer auf als nach einer Infektionsrunde (vergl. Titer in Tab. 6 und 8). Diese Beobachtung konnte jedoch auch im Falle der WT-Viren gemacht werden. Nach wie vor wies dabei die Mutante M141 einen verglichen mit den anderen Mutanten um zwei Größenordnungen niedrigeren Titer auf.

FV zeichnen sich durch eine frühe reverse Transkription noch in der virusproduzierenden Zelle aus. Dies wurde anhand der Beispiele von PFV (Moebes

Diskussion

et al., 1997) sowie FFV (Roy et al., 2003) mittels der Applikation von AZT, eines Inhibitors der reversen Transkription, nachgewiesen. Analog dazu wurde durch die Inkubation entweder der Produktionszellen oder der Zielzellen in der Anwesenheit von AZT untersucht, ob sich die in dieser Arbeit hergestellten PFV Substitutionsmutanten hinsichtlich des Zeitpunktes der reversen Transkription von WT-Viren unterscheiden. Fand die Virusproduktion in der Gegenwart von AZT statt, so war die Virusreplikation fast vollständig unterdrückt. Eine Infektion der Zielzellen in der Gegenwart des Inhibitors führte dagegen nur zu einer geringen Abnahme der Virustiter. Die in diesem Experiment ermittelten Titer waren dabei mit jenen in Kapitel 3.2.2. vergleichbar. Die etwas geringeren Titer in Experiment C (Virusproduktion in der Abwesenheit von AZT, Infektion der Zielzellen in der Gegenwart von AZT) im Vergleich zum Kontrollexperiment A waren möglicherweise auf die verwendete AZT-Konzentration zurückzuführen, welche mit 10 μM doppelt so hoch war wie die von Moebes et al., 1997 verwendete. Zudem ist bekannt, daß FV Partikel neben dsDNA auch RNA enthalten und die reverse Transkription zwar größtenteils in der virusproduzierenden Zelle stattfindet, dieser Prozeß aber erst in der Zielzelle vollständig abgeschlossen wird (Moebes et al., 1997, Yu et al., 1999, Roy et al., 2003, Delelis et al., 2003). Dies würde einen gewissen inhibitorischen Effekt von AZT auf die virale Replikation mit den beobachteten Auswirkungen auf die infektiösen Titer erklären. Auch in dem von Roy et al., 2003 durchgeführten AZT-Inhibitionsversuch wurden sowohl für PFV als auch für FFV in Experiment C niedrigere Titer ermittelt als im Kontrollexperiment A. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß sich die hergestellten PFV Gag-Lysinmutanten hinsichtlich ihrer Replikationsstrategie nicht von WT-Viren unterscheiden und ihre genomische RNA noch in der Produktionszelle revers transkribieren. Dies deutet darauf hin, daß die Lysin-zu-Arginin-Transitionen im Laufe der foamyviralen Evolution nicht mit einem Wechsel der reversen Transkription von einem frühen hin zu einem späten Zeitpunkt während des Replikationszyklus einhergingen.

Um eventuelle Unterschiede in der Nukleinsäureinkorporation der PFV- sowie FFV-Mutanten im Vergleich zu WT-Viren zu analysieren, wurde der RNA- und DNA-Gehalt extrazellulärer Virionen mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Dazu wurden etwa 200 bp lange Abschnitte in den *pol*-ORFs der aufgereinigten Nukleinsäuren von PFV bzw. FFV amplifiziert. Für PFV WT-Partikel wurde ein Verhältnis der RNA- und DNA-Kopienzahlen von etwa 3,6:1 ermittelt. Dieser Wert ist

Diskussion

mit dem von Yu et al., 1999 bestimmten Verhältnis von 4:1 bis 4,6:1 (je nach angewandter Methode) vergleichbar. Auch das für FFV WT-Partikel ermittelte RNA:DNA-Verhältnis von 4,5 lag in einem ähnlichen Bereich wie das von Roy et al., 2003 beschriebene von 5,6:1. Wie bereits in Kap. 3.2.5. erwähnt, lagen die in dieser Arbeit bestimmten RNA- und DNA-Kopienzahlen als auch die parallel dazu ermittelten infektiösen Titer eine Größenordnung über den von Roy et al., 2003 beschriebenen, was höchstwahrscheinlich auf die unterschiedlichen Transfektionsmethoden zurückzuführen war. Die PFV Mutanten pczHSRV2 M144 und M145 wiesen mit Werten von etwa 3:1 bzw. 2,8:1 ein RNA:DNA-Verhältnis auf, welches mit jenem der WT-Viren vergleichbar war. Im Gegensatz dazu wiesen die Mutanten pczHSRV2 M141, M142 und M143 ein geringeres RNA:DNA-Verhältnis auf, was im Falle der Mutanten M142 und M143 auf eine höhere DNA-Kopienzahl zurückzuführen war. Die Mutante pczHSRV2 M141 wies sowohl eine geringere DNA- wie auch RNA-Kopienzahl auf. Wie in Kap. 1.2.2. beschrieben, benötigen FV für die Verpackung der genomischen RNA die *cis*-aktiven Sequenzen CASI, welche von der U5-Region am 5'-Ende des Genoms bis in den *gag*-ORF hineinreicht, und CASII, welche im 3'-Bereich des *pol*-ORFs lokalisiert ist (Erlwein et al., 1998, Heinkelein et al., 1998, Wu et al., 1998). Die in pczHSRV2 M141 eingeführte R22,24K-Substitution lag in dem Bereich des PFV *gag*-ORFs, in welchen sich die CASI erstreckt. Eine veränderte RNA-Verpackung infolge der vorgenommenen Mutation konnte demnach nicht ausgeschlossen werden. Es ist jedoch wahrscheinlicher, daß die geringeren DNA- und RNA-Werte auf den durch diese Mutante in der transfizierten Zellkultur induzierten CPE und dem damit verbundenen niedrigeren infektiösen Titer zurückzuführen war. In diesem Zusammenhang ist auch ein premature Budding infolge einer veränderten Gag-Env-Interaktion möglich, bei dem es zu einer verfrühten Freisetzung von Viruspartikeln ohne vorherige Nukleinsäureinkorporation kommt. Im Falle der Mutante M142 korrelierte der im Vergleich zum WT um den Faktor zwei erhöhte infektiöse Titer mit dem höheren DNA-Gehalt der Partikel, für die Mutante M143 konnte jedoch kein solcher Zusammenhang festgestellt werden. Auch für die FFV-Mutanten zeigte sich kein einheitliches Bild. Eine Reihe von Mutanten (M6, M8, M10 sowie M11) wiesen geringere DNA-Kopienzahlen als der WT auf, jedoch lagen deren infektiöse Titer in einem ähnlichen Bereich wie jener der WT-Viren. Für andere Mutanten (M2, M4, M5 sowie M9) wurde ein geringeres RNA:DNA-Verhältnis ermittelt, jedoch war auch deren Titer mit dem WT-Titer vergleichbar.

Diskussion

pChatul-3 M5, welche als einzige FFV-Mutante einen um eine Zehnerpotenz niedrigeren Titer als der WT generierte, wies wiederum einen höheren DNA-Gehalt als WT-Partikel auf. Insgesamt zeigte sich sowohl für die PFV als auch für die FFV *gag*-Mutanten keine eindeutige Korrelation zwischen der ermittelten DNA-Kopienzahl bzw. dem RNA:DNA-Verhältnis und dem infektiösen Titer. Wie bereits von Yu et al., 1999 sowie Roy et al., 2003 gezeigt, unterstrich dieses Experiment jedoch die Bedeutung der genomischen RNA während der foamyviralen Replikation, trotz der Rolle der genomischen DNA als funktionales Genom und der daraus abgeleiteten Definition von FV als DNA-Viren.

Für den Nachweis der Infektiösität von PFV DNA aus extrazellulären Partikeln wurden BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen mit aufgereinigter Provirus-DNA sowohl von pczHSRV2 als auch der Mutanten pczHSRV2 M141 bis M145 transfiziert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, welche mit pczHSRV2 Plasmid-DNA transfiziert wurden. Nach Überstandtransfer auf frisch ausgesäte BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen und anschließende histochemische β -Galactosidase-Färbung konnte für alle Proben infektiöse DNA nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze, bei der noch blaue Foci in der infizierten Zellkultur festgestellt werden konnten, lag dabei für die Plasmid-DNA bei 0,01 ng. Für die aus Partikeln extrahierte DNA lag die Nachweisgrenze für den WT sowie die Mutanten M142 bis M145 bei 0,1 μ l Eluat, für die Mutante M141 bei 1 μ l Eluat, wobei die DNA-Konzentrationen der Eluate je nach Probe zwischen 1 und 7 ng/ μ l variierten. Somit lag die Nachweisgrenze für Provirus-DNA zwischen einer und zwei Größenordnungen über jener von Plasmid-DNA. Ein Vergleich dieses Resultates mit denen anderer Veröffentlichungen ist nur eingeschränkt möglich. Sowohl Yu et al., 1999 als auch Roy et al., 2003 führten die histochemische β -Galactosidase-Färbung an der transfizierten Zellkultur durch, d.h. es fand keine Passagierung von infektiösem Virus statt. Zudem wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden und im Falle von Yu et al. auch unterschiedliche Produktions- wie auch Zielzellen verwendet. Von Roy et al. wurde zudem keine quantitative Infektiösitätsanalyse durchgeführt, da anstelle einer Verdünnungsreihe jeweils 20 μ l Eluat für die Transfektion verwendet wurde. Die von Yu et al. ermittelten Nachweisgrenzen für die Infektiösität lagen bei 1 ng für Plasmid-DNA bzw. 50 ng für Virionen-DNA. Trotz der Unterschiede zwischen der Veröffentlichung von Yu et al. und der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der absoluten Werte sind die Relationen der Nachweisgrenzen Plasmid-DNA/Virionen-DNA jedoch miteinander vergleichbar.

Diskussion

Dieser Versuch konnte somit wie frühere Veröffentlichungen die infektiöse Natur foamyviraler genomischer DNA zeigen.

Die Rolle von Ubiquitin wie auch der Gag-Ubiquitinierung während der retroviralen Partikelfreisetzung ist bisher nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben Budding-Defekte infolge der Mutation von Lysinresten in Gag, unabhängig davon, ob eine Ubiquitinierung der entsprechenden Gag-Proteine festgestellt werden konnte (Gottwein und Kräusslich, 2005, Gottwein et al., 2006, Spidel et al. 2004). Anhand von PFV Gag konnte gezeigt werden, daß eine ubiquitin-abhängige Partikelfreisetzung auch in der Abwesenheit jeglicher Ubiquitinakzeptoren in Gag vonstatten geht (Zhadina et al., 2007).

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Arginin-Lysin-Substitutionen waren in der N-terminalen Hälfte des PFV Gag-Proteins lokalisiert, und eine Ubiquitinierung konnte sowohl für die Mutanten M144 (R266,268K) und M145 (R272,274,275,276K), deren neu eingeführten Lysine in unmittelbarer Nähe der L-Domäne (PSAP, As 284-287) lokalisiert waren, als auch für die Mutanten M142 (R68,70K) und M143 (R169,172,173K) nachgewiesen werden. Für die Mutante M141 (R22,24K) konnte keine Ubiquitinierung detektiert werden, möglicherweise waren die Lysine aufgrund der Beteiligung dieses Gag-Abschnittes an der Interaktion mit dem Glykoprotein nicht für Ubiquitin-konjugierende Enzyme zugänglich.

Wie in den Kap. 1.2.6. und 1.2.7. beschrieben, reguliert die VPS-Maschinerie die Endozytose ubiquitiniertes zellulärer Proteine in das MVB-Vesikelsystem. Eine direkte Interaktion der ubiquitinierten Gag-Moleküle mit Komponenten der VPS-Maschinerie wäre demnach theoretisch möglich gewesen. Dadurch hätte, alternativ zum regulären Freisetzungsweg, über Endozytose und vesikulären Transport der Kapside eine Abschnürung in Form von VLPs ohne die Notwendigkeit einer Interaktion mit dem PFV Glykoprotein stattfinden können. Wie jedoch im 4-Plasmid-System mittels WB- sowie FACS-Analyse gezeigt werden konnte, fand weder eine zelluläre Freisetzung der *gag*-Substitutionsmutanten in Form von VLPs statt noch besaßen diese die Fähigkeit zur Pseudotypisierung mit heterologem Env-Protein. Auch hinsichtlich des Exportes durch eine PFV *env*-Mutante, in welcher alle fünf potentiellen Ubiquitinierungsstellen innerhalb des LP mutiert waren, unterschieden sich die Substitutionsmutanten nur unwesentlich vom WT. Einzig die Mutante M145, welche in unmittelbarer Nähe des PSAP-Motivs ubiquitiniert wird, wies einen

Diskussion

geringfügig effizienteren Partikelexport durch die LP-Ubiquitinmutante als durch das WT Env-Protein auf.

Die Ursache für die zusätzliche Gag-Prozessierung im Falle der Mutante M144 konnte nicht geklärt werden. Die Generierung einer zusätzlichen Proteaseschnittstelle infolge der R266,268K-Substitution würde zu einem N-terminalen Fragment mit einem Molekulargewicht von etwa 42 kDa und nicht wie beobachtet von 55-60 kDa ergeben, zudem würde solch eine Prozessierung auch im proviralen Kontext von pczHSRV2 M144 stattfinden. Die Größe der prozessierten Bande ließ den Schluß zu, daß diese *gag*-Mutante C-terminal der eingeführten Substitution gespalten wurde. Die Tatsache, daß dies nur im 4-Plasmid-System, nicht jedoch im pczHSRV2-Kontext stattfand, könnte in einer Überexpression der Strukturproteine und damit von Pol begründet sein, welche im Kontext des proviralen Konstrukts nicht auftrat.

Durch diesen Versuch wurde deutlich, daß die Modifikation der neu in Gag eingeführten Lysinreste mit Ubiquitin keinen Einfluß auf die Env-Restriktion des PFV-Kapsidexportes aus der Zelle hatte. Es war daher zu vermuten, daß die Ubiquitinierung als unspezifischer Nebeneffekt der Aktivität ubiquitinübertragender Enzyme zu einem späten Zeitpunkt des Buddings stattfand und damit keinen Einfluß auf die zuvor stattfindende Gag-Env-Interaktion hatte. In diesem Zusammenhang erscheint es zudem unwahrscheinlich, daß die Lysin-zu-Arginin-Transitionen während der foamyviralen Evolution mit einem Wechsel der Morphogenese-strategie von einer den Orthoretroviren vergleichbaren Fähigkeit zur Env-unabhängigen Freisetzung hin zu einem Env-restringierten Partikelexport einherging.

Im Gegensatz zu PFV konnten weder in der FFV WT-Probe noch in den Proben der FFV Gag-Mutanten nach Inkubation mit dem polyklonalen α -HA Antikörper ubiquitiniertes Gag detektiert werden. Darüber hinaus konnten auch keine ubiquitinierten Formen des Env LP detektiert werden. Die zytoplasmatische Domäne des FFV LP enthält wie jenes von PFV fünf Lysinreste (K10,19,23,45,49), welche potentiell ubiquitiniert werden können. Zwar ist bisher in der Literatur keine Ubiquitinierung des FFV Env LP beschrieben worden, trotzdem war das Fehlen jeglicher ubiquitinspezifischer Proteinbanden in diesem Versuch unerwartet. Jedoch konnte auch nach Transfektion von 293T-Zellen mit pChatul-3, darauffolgender Infektion von CrFK-Zellen und Ernte des Virusüberstandes mit anschließender WB-Analyse keine Ubiquitinierung sowohl des FFV Env LP als auch anderer viraler

Diskussion

Proteine detektiert werden (Dirk Lindemann, pers. Mitteilung). Da Ubiquitin in Eukaryonten stark konserviert ist (nur drei As Unterschied in der Sequenz zwischen Mensch und Hefe, Jentsch et al., 1991) und nach bisherigen Erkenntnissen in allen Säugern die identische Aminosäuresequenz aufweist (<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?KEY=06%2F040129&IA=EP2005010932&DISPLAY=DESC>), ist eine Inkompatibilität zwischen dem von pBJ5 exprimierten humanen Ubiquitin und der Ubiquitinierungsmaschinerie in Katzenzellen als Grund für die fehlende Ubiquitinierung unwahrscheinlich. Abb. 34 zeigt ein Proteinalignment (http://mbs.cbrc.jp/papia-cgi/mul_menu.pl) eines Großteils der zytoplasmatischen Domänen der Env LP verschiedener FV-Isolate mit allen darin enthaltenen Lysinen. Wie zu erkennen ist, sind K15 sowie K34 innerhalb aller in diesem Alignment aufgeführten Affen-FV-Isolate konserviert, K14, K18 sowie K53 kommen außer im LP von PFV im LP mindestens eines weiteren Affen-FV-Isolats vor. Im Gegensatz dazu ist keines der fünf Lysine der zytoplasmatischen FFV LP-Domäne innerhalb der FV konserviert. Somit wäre es theoretisch möglich, daß im Falle von FFV keine Regulation der SVP-Freisetzung mittels LP-Ubiquitinierung stattfindet, wie sie beispielsweise für PFV beschrieben wurde (Stanke et al., 2005, Stange et al., 2008).

PFV	1	MAPP--MTLQQWI IWKRMNK AHEALQNTT VTEQQKEQI ILDIQN-EEV-QPTRRDKFRY 56
SFVcpz	1	MAPP--MTLQQWI IWNKMNKAHEALQNSTT VTDQQKEQI ILEIQN-EEV-RPTRKDKIRY 56
SFVmac	1	MAPP--MTLEQWLLWKKMSQAHQALENVTTLTEEQKQQVIIDIQH-EDV-VPTRMDKIKY 56
SFVspm	1	MAPP--LTLQEWMLWNKKRNLETWTNNSALTSEAKQMLLDEAEDINNLGKPTLKHRFSY 58
FFV	1	MEQEHVMTLKEWMEWNAHKQLQQLQ LTHPELH-VDIPEDIHSV-P-EKV--PLKM-RMRY 54
BFV	1	MAPP--MTLQQWLQWRYNLETNLLQMNPKMESVCLPDFDPPG-D-EEV--SLRI-RCKY 53
EFV	1	MTPP--MTLPEWMQWRYRQNVNKIREAIPDVQ-IDLPVYNPDM-T-KPL--PLCL-RIKY 52

Abb. 34: Zytoplasmatische Domänen der LP verschiedener FV-Isolate mit den darin vorhandenen Lysinen

Wahrscheinlicher als Ursache für die fehlende FFV Gag- sowie LP- Ubiquitinierung in 293T-Zellen sind jedoch Unterschiede in den Komponenten der Ubiquitinierungsmaschinerie zwischen humanen Zellen und Katzenzellen (ubiquitinaktivierende und -konjugierende Enzyme bzw. Ubiquitinligasen). Somit sollte die Analyse einer möglichen Ubiquitinierung der neu in FFV Gag eingeführten Lysine in Katzenzellen als Produktionszellen durchgeführt werden.

In früheren Veröffentlichungen wurde eine Inhibition der foamyviralen Replikation durch Applikation von verschiedenen IFN auf virusinfizierte Zellen beschrieben. So konnten Rhodes-Feuillette et al., 1990 anhand einer humanen Epithelzelllinie eine drastische Reduktion des durch SFV1 induzierten CPE durch exogene Applikation von rekombinantem INF- α oder - γ erreichen. Gleiches wurde von Sabile et al., 1996

Diskussion

für PFV anhand der INF- α , - β sowie - γ gezeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Applikation der INF- α sowie - γ auf MRC-5-Zellen, einer primären humanen Lungenfibroblasten-Zelllinie, ebenso eine Reduktion des durch PFV induzierten CPEs herbeigeführt werden. Im Falle der mit INF- α behandelten Zellen wurden in den mit WT, M141, M142 sowie M143 infizierten Kulturen nach fünf Tagen noch sehr vereinzelte CPEs beobachtet, im Falle der übrigen Proben waren keine Anzeichen einer produktiven Virusreplikation mehr zu erkennen. Die Behandlung der Zellkulturen mit INF- γ zeigte einen noch stärkeren Effekt, da in sämtlichen Proben fünf Tage nach Infektion kein CPE zu beobachten war. Die Hemmung der Virusreplikation wurde anhand der ermittelten infektiösen Titer deutlich. Die Behandlung mit INF- α führte in allen Proben zu einer Titerreduktion, jedoch replizierten nur die Mutanten M143 und M142 sowie M141 (in Relation zur entsprechenden Kontrolle) vergleichbar dem WT. Die Mutante generierten Titer, welche um drei Größenordnungen niedriger waren als jene der entsprechenden Positivkontrollen, die Replikation der Mutanten M154 (M143+M145) sowie M158 war beinahe vollständig gehemmt. Die Inkubation der MRC-5-Zellen in Gegenwart von INF- γ unterdrückte die Virusreplikation nahezu vollständig, da nur für das WT-Virus sowie die Mutanten M142, M143, M144 sowie M145 eine sehr geringe Infektiösität nachgewiesen werden konnte. Somit erwies sich INF- γ in diesem Experiment als weitaus potenterer Inhibitor der foamyviralen Replikation als INF- α . Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß IFN-vermittelte Abwehrmechanismen eine Rolle während der positiven Selektion der Lysin-zu-Arginin-Substitutionsmutanten gespielt haben könnten. Dabei war die Replikation jener Mutanten besonders stark inhibiert, deren Substitutionen im zentralen Abschnitt von Gag lokalisiert waren (M144, M145, M154 sowie M158). Substitutionen, welche näher am N-Terminus lokalisiert waren (M142 sowie M143), hatten verglichen mit dem WT hingegen nur einen geringen Einfluß auf die Replikationsfähigkeit in der Gegenwart von IFN.

Für die Mutante M158 konnte in den vorgenommenen Transfektions- und Infektionsversuchen in immortalisierten Zellen keine vom WT abweichende Partikelfreisetzung sowie Infektiösität festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war die Replikation dieser Mutante in der primären MRC-5-Zelllinie nahezu vollständig inhibiert. Somit könnte das singuläre Lysin in PFV Gag *in vivo* eine essentielle Funktion übernehmen, was jedoch weiterer Untersuchungen bedarf. Aufgrund dieser

Diskussion

eingeschränkten Replikationsfähigkeit konnten keine Aussagen hinsichtlich der Interferonsensitivität dieser Mutante gemacht werden.

In mehreren Veröffentlichungen wurden verschiedene Mechanismen, über welche IFN ihre antiretrovirale Wirkung vermitteln, postuliert. Wie bereits erwähnt, gingen Shirazi und Pitha, 1992 von einer inhibitorischen Wirkung während eines frühen Zeitpunkts der Replikation zwischen Zelleintritt und der Integration aus, wohingegen Meylan et al., 1993 von einem späten Zeitpunkt durch eine Hemmung des Assemblys und der Freisetzung postulierten. Sabile et al., 1996 wiesen eine Verminderung der viralen RNA- sowie Proteinexpression und eine Herunterregulation der Synthese von Provirus-DNA nach. Aufgrund der unterschiedlichen IFN-Sensitivität der Substitutionsmutanten im Vergleich zum WT wie auch untereinander ist der letztgenannte Mechanismus als Ursache der Inhibition jedoch unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit wäre eine IFN-induzierte übermäßige Gag-Ubiquitinierung (Polyubiquitinierung) mit daran anschließender proteasomaler Degradation. Wie in Kap. 1.2.7. beschrieben, benötigen orthoretrovirale Kapside für das Budding ein bestimmtes Mittelmaß an Ubiquitinierung (Oligoubiquitinierung). Wird dies durch kumulative Deletion von Lysinen verhindert, so führt dies zu einem Buddingdefekt (Gottwein und Kräusslich, 2005, Gottwein et al., 2006). Auf der anderen Seite führt eine Gag-Polyubiquitinierung zu dessen proteasomaler Degradation. Im Falle von FV erfolgt die Regulation der Partikelfreisetzung aufgrund der Lysinarmut ihrer Gag-Proteine über die Ubiquitinierung des LP (s. Kap. 1.2.3.3.). Es wäre vorstellbar, daß eine IFN-vermittelte Aktivierung von Komponenten der Ubiquitinierungsmaschinerie zu einer Polyubiquitinierung der neu in *gag* eingeführten Lysine und dadurch zu einer proteasomalen Degradation der *gag*-Mutanten führte. Das WT-Virus wäre demnach aufgrund des Vorhandenseins nur eines Lysinrestes in Gag vor dieser Degradation geschützt. Die Unterschiede in der IFN-Sensitivität der verschiedenen Mutanten könnten dadurch begründet sein, daß Lysine in bestimmten Gag-Abschnitten weniger gut für Ubiquitin-konjugierende Enzyme zugänglich waren als solche in anderen Gag-Abschnitten. Eine weitere Erklärung wäre, daß ein zellulärer Restriktionsfaktor, welcher über einen IFN-vermittelten Signalweg aktiviert wird, direkt mit dem foamyviralen Gag-Protein interagiert. Die Mutation von Lysin-spezifisierenden zu Arginin-spezifisierenden Kodons in foamyviralen *gag*-Genen könnte demnach dazu gedient haben, diese Interaktion zu verhindern oder zumindest abzuschwächen. Auf die Funktion von Restriktionsfaktoren sowie weitere

Aspekte der Lysin-zu-Arginin-Substitutionen im Kontext der foamyviralen Evolution soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

4.2.2. Betrachtung der Lysin-Arginin-Transitionen im evolutionären Kontext

Abschließend sollen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate der funktionellen Analyse basischer Aminosäurereste in FV Gag im Kontext der foamyviralen Evolution betrachtet werden.

Im Genom des Zweizehen-Faultiers, *Choloepus hoffmanni*, konnten foamyvirale Sequenzabschnitte identifiziert werden (Katzourakis et al., 2009). Die Konsensussequenz des SloEFV (Sloth endogenous foamy virus, endogenes Faultierfoamyvirus) weist mehrere für FV typische Charakteristika auf wie das große Genom (etwa 11400 bp), das Vorhandensein von LTRs und einer Primerbindungsstelle sowie eine Gag-unabhängige Pol-Expression. Das Gag-Protein von SloEFV besitzt wie jenes von exogenen FV drei GR-Boxen zeichnet sich ebenso durch die Abwesenheit von Cystein-Histidin-Boxen aus (Katzourakis et al., 2009). Bemerkenswerterweise wird wie im Falle der Gag-Proteine exogener FV auch in SloEFV Gag der überwiegende Anteil basischer As durch Arginin vertreten. Der gag-ORF von SloEFV kodiert für 503 As. Die Anzahl der Arginine beträgt 28 (5,6 %, exogene FV: 8,9 %), die der Lysine 4 (0,8 %, exogene FV: 0,4 %). Als weitere Übereinstimmung wird in SloEFV Gag wie im Falle exogener FV (60,1 %) der überwiegende Anteil der Arginine (78,6 %) durch AGG- und AGA-Kodons, welche über eine Einzelmutation aus Lysin-Kodons hervorgegangen sein könnten, spezifiziert. Die Unterordnung der Faultiere divergierte von den übrigen Säugerordnungen vor etwa 105 Mio Jahren (Bininda-Emonds et al., 2007). Zudem fand eine geographische Isolation infolge der Abspaltung Südamerikas vom Urkontinent statt. Als Zeitfenster der erstmaligen Integration eines exogenen Faultier-FV in die Keimbahn wurde ein Zeitraum von vor 34 bis 45 Mio Jahren ermittelt. Aufgrund dieser Tatsachen sowie dem ersten Auftreten anderer als Wirte für FV fungierenden Säugetiere auf diesem Kontinent vor etwa 30 Mio Jahren (Huchon et al., 2000) kann eine Übertragung von FV durch andere Spezies auf Faultiere ausgeschlossen werden. Demzufolge zirkulierten FV bereits vor der Abspaltung der Ordnung der Faultiere vor etwa 105 Mio Jahren innerhalb der frühen Säugetiere (Katzourakis et al., 2009). Aufgrund der oben erwähnten Gemeinsamkeiten von

SloEFV Gag und dem Gag-Protein exogener FV hinsichtlich der bevorzugten Verwendung von Arginin anstelle Lysin sowie dessen überwiegenden AGG- und AGA-Kodierung wird zudem ersichtlich, daß auch die potentiellen Lysin-zu-Arginin-Transitionen in Gag vor mehr als 105 Mio Jahren in den Vorfahren der heutigen FV stattgefunden haben müssen. Über die Hintergründe dieser Mutationen und deren Etablierung in der Subfamilie der *Spumaretrovirinae* kann nur spekuliert werden, höchstwahrscheinlich spielt jedoch die Koevolution zwischen FV und ihren Wirten eine entscheidende Rolle. Wie alle Infektionserreger sind auch FV in ihren Wirten einem Selektionsdruck ausgesetzt. Dieser wird sowohl durch extrazelluläre immunologische Mechanismen wie auch durch intrazelluläre Restriktionsfaktoren vermittelt. SloEFV weist Sequenzabschnitte auf, welche den *tas*- und *bet*-Genen exogener FV ähneln (Katzourakis et al., 2009). Wie in Kap. 1.2.3.4. beschrieben, verhindert FV Bet die Dimerisierung von APOBEC3 und damit dessen Inkorporation in das Viruspartikel (Perkovic et al., 2008). Koevolution zwischen Wirten und Infektionserregern zeichnet sich durch eine Abfolge von Abwehrmechanismen des befallenen Organismus und anschließender Antagonisierung dieser Abwehr durch den Erreger aus, die Interaktion zwischen FV Bet und APOBEC3 stellt demnach eine evolutionär sehr frühzeitig etablierte Wechselwirkung zwischen Wirt und Erreger dar. Zudem konnte für Bet gezeigt werden, daß es Zellen, in welchen es exprimiert wird, vor einer Superinfektion schützt (Bock et al., 1998). Durch die Inhibition einer produktiven Replikation in einem frühen Stadium vor der Integration des viralen Genoms (Bock et al., 1998) ist dieses akzessorische Protein wahrscheinlich an der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung der Persistenz im infizierten Wirt beteiligt (Saib et al., 1995). Somit könnte Bet dafür verantwortlich sein, daß FV im Gegensatz zu allen anderen Retroviren keine Pathogenität *in vivo* zeigen.

Einen weiteren antiretroviral wirksamen zellulären Restriktionsfaktor stellt Trim5 α (tripartite motif protein 5, α -Isoform) dar (Newman et al., 2006). Dieses Protein wurde ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit, Zellen von Altweltaffen vor einer HIV-1-Infektion schützen zu können, identifiziert (Stremlau et al., 2004, Yap et al., 2004). Neben Lentiviren werden auch Gammaretroviren (Lilly, 1970) sowie FV (Yap et al., 2008) durch Trim5 α restringiert. Für FV konnte eine spezie-spezifische Trim5 α -vermittelte Restriktion nachgewiesen werden. So wurden beispielsweise PFV und SFVmac durch Trim5 α -Proteine aus den meisten getesteten Neuweltaffen restringiert, nicht jedoch durch solche aus großen Primaten oder Altweltaffen. Bis auf

Diskussion

Trim5 α aus dem braunen Kapuzineraffen zeigten die gegen PFV und SFVmac wirksamen Proteine keine inhibitorische Wirkung gegenüber FFV. FFV wiederum wurde durch Trim5 α -Proteine restringiert, welche mit Ausnahme von jenem aus dem braunen Kapuzineraffen keinen inhibitorischen Effekt auf die Replikation von PFV und SFVmac zeigten (Yap et al., 2008). Pacheco et al., 2010 konnten anhand der Beispiele dreier Neuweltaffen zeigen, daß SFVs aus Neuweltaffen nicht durch die Trim5 α -Proteine ihrer eigenen Wirte restringiert wurden, diese jedoch die Replikation von FV-Isolaten aus mindestens einer anderen Spezies inhibierten. Somit scheint eine Koevolution zwischen SFVs und jeweils einem oder einer begrenzten Anzahl von Wirtsspezies sowie deren jeweiligen endogenen Trim5 α -Proteinen stattgefunden zu haben (Schweizer und Neumann-Haefelin, 1995, Switzer et al., 2005). Die Funktion von Trim5 α könnte demnach darin bestehen, eine häufige Übertragung von FV zwischen verschiedenen Spezies zu beschränken.

Als Angriffspunkt dieses Restriktionsfaktors dient das orthoretrovirale CA-Protein (Dodding et al., 2005) bzw. der foamyvirale Gag-Abschnitt N-terminal der ersten sekundären Spaltstelle (₃₁₀IR↓SV₃₁₃ im Falle von PFV Gag) (Yap et al., 2008). Die Sequenz von Trim5 α weist zum einen große Variationen (Polymorphismen) innerhalb einer Spezies sowie zwischen verschiedenen Spezies auf. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß bestimmte Polymorphismen in den Trim5 α -Proteinen verschiedener Altweltaffen über Millionen von Jahren hinweg konserviert wurden. Daher ist es wahrscheinlich, daß der gesamte *trim5 α* -Genlocus und insbesondere konservierte Polymorphismen im Laufe der Wirts-Erreger-Koevolution unter einer positiven Selektionierung durch Retroviren stand (Newman et al., 2006). Asaoka et al., 2005 konnten eine durch IFN- α , - β sowie - γ induzierte verstärkte Trim5 α mRNA-Synthese nachweisen. Zudem befanden sich die Substitutionen jener Mutanten, welche in der vorliegenden Arbeit eine besonders hohe IFN-Sensitivität aufwiesen, N-terminal der ersten sekundären Spaltstelle und somit in jenem Bereich, welcher als Angriffspunkt von Trim5 α identifiziert wurde (Yap et al., 2008). Es wäre somit möglich, daß die positive Selektionierung der FV *gag* Lysin-Arginin-Substitutionsmutanten durch diesen zellulären Restriktionsfaktor zustande kam. Neben Trim5 α konnte eine Reihe weiterer Mitglieder dieser Proteinfamilie mit antiviralen Funktionen identifiziert werden. So wirkt beispielsweise Trim25 als Ubiquitinligase, welche den N-Terminus der als Sensor für virale RNAs fungierenden RNA-Helikase retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) ubiquitiniert (Gack et al., 2007).

Diskussion

Diese Modifikation führt zur Aktivierung des RIG-I-Signaltransduktionsweges und damit zur Produktion von Typ I-Interferon (IFN- α und - β) (u.a. Kato et al., 2005, Kawai et al., 2005). Wie Trim5 α unterliegt auch dieser Restriktionsfaktor einem von Erregern ausgeübten Selektionsdruck. Gack et al., 2009 konnten zeigen, daß das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) des Influenza A-Virus die TRIM25-vermittelte RIG-I-Ubiquitinierung inhibiert, sodaß der RIG-I-Signaltransduktionsweg und damit die IFN- α und - β -Produktion unterdrückt werden. Ein möglicher Einfluß von Trim25 auf die foamyvirale Replikation wurde bisher nicht untersucht, jedoch ist auch eine Beteiligung dieses Restriktionsfaktors bei der positiven Selektionierung der FV *gag* Lysin-Arginin-Substitutionsmutanten vorstellbar. Interferone sind jedoch nicht nur an der Induktion von Restriktionsfaktoren wie Trim5 α oder APOBEC3G (Peng et al., 2006) beteiligt, sondern verstärken auch die Expression von MHC- (major histocompatibility complex-) Klasse I-Molekülen (Janeway et al., 2002). Diese Moleküle werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren cytotoxischen CD8-T-Zellen (virale) Antigene (Janeway et al., 2002). Colas et al., 1995 wiesen eine Hochregulation der Synthese von MHC-Klasse I-Molekülen innerhalb der ersten 24 h nach der Infektion mit PFV nach, gefolgt von einer Verminderung der Expression. Gleichzeitig wurde jedoch darauf hingewiesen, daß diese Mechanismen wahrscheinlich nicht über die Induktion von IFN vermittelt werden. Zudem wurde in mehreren Veröffentlichungen nachgewiesen, daß FV keine IFN induzieren (u.a. Sabile et al., 1996). Eine positive Selektionierung der Substitutionsmutanten infolge einer weniger effizienten Präsentation durch MHC-Klasse I-Moleküle scheint demzufolge fraglich. Neben den bereits erwähnten Restriktionsfaktoren könnten auch bisher unbekannte zelluläre, antiviral wirksame Proteine die foamyvirale Replikation während eines frühen Stadiums der FV-Wirts-Koevolution restringiert haben. Die Substitution von Lysin gegen Arginine in den foamyviralen Gag-Proteinen könnte dazu gedient haben, eine Interaktion mit diesen zellulären Proteinen zu modifizieren oder zu verhindern. Die Basis hierfür stellen unterschiedliche kovalente Modifikationen dieser As dar.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ubiquitinierung der ϵ -Aminogruppe von Lysin stellt nur eine solche Modifikation dar. In der Literatur sind bisher mehr als 200 posttranslationale Proteinmodifikationen beschrieben worden (Chen et al., 2007). Diese sind reversibel und dienen als Mittel zur Regulation der biologischen Aktivität, Stabilität, subzellulären Lokalisation und Wechselwirkung mit anderen

Diskussion

zellulären Proteinen (Übersicht in Walsh et al., 2005). Weitere Beispiele für posttranslationale Modifikationen von Lysin sind Azetylierung, Methylierung, Sumoylierung (SUMO, small ubiquitin-like modifier) und Phosphorylierung (Chen et al., 2007). Bereits in den 1960er Jahren wurde die Azetylierung der Seitenketten von Lysin- wie auch Argininresten in Histonen als Regulationsmechanismus der Transkription von Genen beschrieben (Allfrey et al., 1964, Vidali et al., 1968). Als weitere, komplementierende Transkriptionskontrolle dient die Methylierung von Lysin- und Argininseitenketten in Histonen, wobei abhängig von der Position der modifizierten As sowie der Anzahl der angehängten Methylgruppen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden (Walsh et al., 2005). Desweiteren werden auch Nicht-Histonproteine mittels Lysinmodifikation reguliert. Ein Beispiel hierfür ist das Tumorsuppressor-Protein p53 (Übersicht in Carter und Vousden, 2009). So verstärkt beispielsweise die Mono- oder Polyubiquitinierung bestimmter Lysinreste innerhalb der p53 DNA-Bindungsdomäne den nukleären Export und bewirkt so eine Akkumulation dieses Transkriptionsfaktors im Zytoplasma. Eine Polyubiquitinierung eines anderen Lysinrestes hingegen bewirkt eine proteasomale Degradation von p53. Ein weiteres Beispiel für die Regulation von p53 ist die Lysinmethylierung, welche abhängig von der Position des modifizierten Lysinrestes entweder zu einer Aktivierung oder Hemmung von p53 führt. Die Azetylierung von Lysinresten wurde mit einer Stabilisierung und Aktivitätssteigerung von p53 in Verbindung gebracht. Diese Beispiele veranschaulichen, daß die kovalente Modifikation von Lysin wie auch der meisten anderen As abhängig von der Art, der Anzahl sowie der Position der Modifikation Proteine und damit Signaltransduktions- und Stoffwechselwege in vielfältiger und komplexer Weise regulieren. Somit kann spekuliert werden, daß der Austausch von Lysin gegen Arginin stattfand, um eine bestimmte kovalente Modifikation wie beispielsweise eine Ubiquitinierung zu verhindern oder die Argininreste mit einer anderen Modifikation zu versehen und damit eine direkte Interaktion mit zellulären Restriktionsfaktoren zu inhibieren. Für die Gesamtkonformation des Gag-Proteins war dieser Austausch aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften der beiden As sowie deren vergleichbarer Größe tolerierbar, wie die mit dem WT vergleichbaren infektiösen Titer der meisten Substitutionsmutanten zeigten (s. Kap. 3.2.2.).

Neben APOBEC-Proteinen stellen ADARs (adenosine deaminases that act on double-stranded RNA) weitere zelluläre Nukleinsäure-modifizierende Proteine dar.

Diskussion

Dabei handelt es sich um dsRNA-editierende Enzyme, welche den Austausch von Adenosin zu Inosin katalysieren. Dieses wird während der Translation als Guanosin erkannt, wodurch es letztlich zu einer A-zu-G-Transition kommt (Bass, 2002). Eine bestimmte Isoform (ADAR 1 p150) ist wie bereits erwähnt IFN-induzierbar (Patterson und Samuel, 1995). Über ihre RNA-editierende Aktivität sind ADARs an der Regulation der Genexpression einer Reihe von negativ-strängigen RNA-Viren wie Hepatitis D (Casey, 2006) oder dem Masernvirus (Cattaneo et al., 1988) beteiligt. Doria et al., 2009 konnten einen positiven Einfluß von ADAR1 auf die Replikation von HIV-1 nachweisen. So führte eine Überexpression dieser Isoform zu einer verstärkten Freisetzung sowie einer erhöhten Infektiosität der Partikel. Im Gegensatz zu APOBEC-Proteinen, welche über eine G-zu-A-Hypermuation eine Degradation der retroviralen genomischen DNA bewirken, üben ADARs sowohl über das A-zu-G-Editing viraler RNAs als auch über editing-unabhängige Mechanismen wichtige Funktionen während der Replikation sowohl von Retroviren als auch anderer Viren aus (Doria et al., 2009). Eine Beteiligung von ADARs an der Regulation der foamyviralen Genexpression wurde bisher nicht untersucht. Vergleicht man das durchschnittliche A:G-Verhältnis der kodierenden RNA-Stränge der *gag*-ORFs von FV und Orthoretroviren, so fällt auf, daß dieses bei FV mit 1,49 höher ausfällt als bei Orthoretroviren mit 1,31. Somit ist es durchaus vorstellbar, daß ADARs über das A-zu-G-Editing in doppelsträngigen Abschnitten der prägenomischen foamyviralen RNA an der Transition von Lysin-spezifisierenden zu Arginin-spezifisierenden Kodons in den *gag*-ORFs beteiligt waren. Auch für eine bestimmte ADAR-Isoform (ADAR 1 p150) konnte eine Induktion durch IFN- α nachgewiesen werden (Patterson und Samuel, 1995).

Abschließend ist festzustellen, daß die angenommenen Substitutionen von Lysinen gegen Arginine in den foamyviralen Gag-Proteinen vermutlich nicht in ursächlichem Zusammenhang mit den Charakteristika des foamyviralen Replikationsverhaltens wie der reversen Transkription in der Produktionszelle oder dem Env-abhängigen Partikelexport stehen. Wahrscheinlicher ist vielmehr eine positive Selektionierung dieser Transitionsmutanten infolge der Aktivität zellulärer antiviraler Restriktionsfaktoren.

5. Literaturverzeichnis

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

Aguzzi, A., Wagner, E.F., Netzer, K.O., Bothe, K., Anhauser, I., and Rethwilm, A. (1993). Human foamy virus proteins accumulate in neurons and induce multinucleated giant cells in the brain of transgenic mice. *Am J Pathol* 142, 1061-1071.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.

Anatskaya, O.V., and Vinogradov, A.E. (2007). Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics* 89, 70-80.

Asaoka, K., Ikeda, K., Hishinuma, T., Horie-Inoue, K., Takeda, S., and Inoue, S. (2005). A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1950-1956.

Baglioni, C. (1979). Interferon-induced enzymatic activities and their role in the antiviral state. *Cell* 17, 255-264.

Baldwin, D. N. and 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.

Banday, A.A., Lau, Y.S., and Lokhandwala, M.F. (2008). Oxidative stress causes renal dopamine D1 receptor dysfunction and salt-sensitive hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 51, 367-375.

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

Bass, B.L. (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* 71, 817-846.

Baunach, G., Maurer, B., Hahn, H., Kranz, M., and Rethwilm, A. (1993). Functional analysis of Human Foamy Virus accessory reading frames. *J. Virol.* 67, 5411 - 5418.

Beck, J., and Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13, 48-64.

Literaturverzeichnis

- Bender, A., van Dooren, G.G., Ralph, S.A., McFadden, G.I., and Schneider, G. (2003). Properties and prediction of mitochondrial transit peptides from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 132, 59-66.
- Berg, J. M., Tymoczko, und J. L., Stryer, L. (2003). *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag
- Berkowitz, R., Fisher, J., and Goff, S.P. (1996). RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 177-218.
- Bieniasz, P.D., Rethwilm, A., Pitman, R., Daniel, M.D., Chrystie, I., and McClure, M.O. (1995). A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from a gorilla. *Virology* 207, 217-228.
- Bininda-Emonds, O.R., Cardillo, M., Jones, K.E., MacPhee, R.D., Beck, R.M., Grenyer, R., Price, S.A., Vos, R.A., Gittleman, J.L., and Purvis, A. (2007). The delayed rise of present-day mammals. *Nature* 446, 507-512.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., and Malim, M.H. (2006). Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol* 80, 8450-8458
- Bittner, J. J. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary tumor incidence in mice. *Science* 84, 162-169
- Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (1998). Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* 250, 194-204.
- Bodem, J., Krausslich, H.G., and Rethwilm, A. (2007). Acetylation of the foamy virus transactivator Tas by PCAF augments promoter-binding affinity and virus transcription. *J Gen Virol* 88, 259-263.
- Boneva, R.S., Grindon, A.J., Orton, S.L., Switzer, W.M., Shanmugam, V., Hussain, A.I., Bhullar, V.B., Chamberland, M.E., Heneine, W., Folks, T.M., *et al.* (2002). Simian foamy virus infection in a blood donor. *Transfusion* 42, 886-891.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.
- Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 523-527.
- Cain, D., Erlwein, O., Grigg, A., Russell, R.A., and McClure, M.O. (2001). Palindromic sequence plays a critical role in human foamy virus dimerization. *J Virol* 75, 3731-3739.
- Cartellieri, M. (2005). Untersuchungen zum Gag- und Pol-Protein des Prototypischen Foamyvirus (PFV) (Dissertation).

Literaturverzeichnis

- Cartellieri, M., Herchenroder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2005a). N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol* **79**, 12464-12476.
- Cartellieri, M., Rudolph, W., Herchenroder, O., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2005b). Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology* **2**, 44.
- Carter, S., and Vousden, K.H. (2009). Modifications of p53: competing for the lysines. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 18-24.
- Casey, J.L. (2006). RNA editing in hepatitis delta virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **307**, 67-89.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Baczko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. (1988). Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* **55**, 255-265.
- Chen, Y., Sprung, R., Tang, Y., Ball, H., Sangras, B., Kim, S.C., Falck, J.R., Peng, J., Gu, W., and Zhao, Y. (2007). Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics* **6**, 812-819.
- Choi, G., Park, S., Choi, B., Hong, S., Lee, J., Hunter, E., and Rhee, S.S. (1999). Identification of a cytoplasmic targeting/retention signal in a retroviral gag polyprotein. *J Virol* **73**, 5431-5437
- Coffin, J.M. (1986). Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* **46**, 1 - 4.
- Cullen, B.R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* **93**, 685-692.
- Colas, S., Bourge, J.-F., Wybier, J., Chelbi-Alix, M.K., Paul, P., and Emanoil-Ravier, R. (1995). Human foamy virus infection activates class I major histocompatibility complex antigen expression. *J Gen Virol* **76**, 661-667.
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J.P., and Schwartz, O. (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* **80**, 605-614.
- Delelis, O., Lehmann-Che, J., and Saib, A. (2004). Foamy viruses-a world apart. *Curr Opin Microbiol* **7**, 400-406.
- Delelis, O., Saib, A., and Sonigo, P. (2003). Biphasic DNA synthesis in Spumaviruses. *J Virol* **77**, 8141-8146
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-15628.
- Dodding, M.P., Bock, M., Yap, M.W., and Stoye, J.P. (2005). Capsid processing requirements for abrogation of Fv1 and Ref1 restriction. *J Virol* **79**, 10571-10577.

Literaturverzeichnis

- Doria, M., Neri, F., Gallo, A., Farace, M.G., and Michienzi, A. (2009). Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection. *Nucleic Acids Res* 37, 5848-5858.
- Duda, A., Stange, A., Lüftenegger, D., Stanke, N., Westphal, D., Pietschmann, T., Eastman, S. W., Linial, M. L., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2004). Prototype Foamy Virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity. *J. Virol.* 78, 13865 - 13870.
- Eastman, S.W., and Linial, M.L. (2001). Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly. *J Virol* 75, 6857-6864.
- Ellermann, V., and Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46, 595 - 609.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., and Rethwilm, A. (1997). Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* 71, 7312-7317.
- Enssle, J., Jordan, I., Mauer, B., and Rethwilm, A. (1996). Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4137-4141.
- Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., and Rethwilm, A. (1999). An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J Gen Virol* 80, 1445-1452.
- Erlwein, O., Bieniasz, P.D., and McClure, M.O. (1998). Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J Virol* 72, 5510-5516.
- Falcone, V., Leupold, J., Clotten, J., Urbanyi, E., Herchenroder, O., Spatz, W., Volk, B., Bohm, N., Toniolo, A., Neumann-Haefelin, D., *et al.* (1999). Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology* 257, 7-14.
- Falcone, V., Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (2003). Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 161-180.
- Falcone, V., Schweizer, M., Toniolo, A., Neumann-Haefelin, D., and Meyerhans, A. (1999). Gamma interferon is a major suppressive factor produced by activated human peripheral blood lymphocytes that is able to inhibit foamy virus-induced cytopathic effects. *J Virol* 73, 1724-1728.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Muller, J.G., and Rethwilm, A. (1998). Foamy virus particle formation. *J Virol* 72, 1610-1615.

Literaturverzeichnis

- Flügel, R.M., and Pfrepper, K.I. (2003). Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 63-88.
- Freed, E.O. (2002). Viral late domains. *J Virol* 76, 4679-4687.
- Friedmann, T., and Yee, J.K. (1995). Pseudotyped retroviral vectors for studies of human gene therapy. *Nat Med* 1, 275-277.
- Gack, M.U., Albrecht, R.A., Urano, T., Inn, K.S., Huang, I.C, Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J.U., and Garcia-Sastre, A. (2009). Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 5, 439-449
- Gack, M.U., Shin, Y.C., Joo, C.H., Urano, T., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S. Chen, Z., Inoue, S., and Jung, J.U. (2007). TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916-920
- Gallo, R.C. (1981). Growth of human normal and leukemic T cells: T-cell growth factor (TCGF) and the isolation of a new class of RNA tumor viruses (HTLV). *Blood Cells* 7, 313-329.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., and Safai, B. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500 - 503.
- Ganem, D. (1991). Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol* 168, 61-83.
- Ganem, D., and Prince, A.M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350, 1118-1129.
- Garrett, E.D., He, F., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (1993). Transcriptional trans activators of human and simian foamy viruses contain a small, highly conserved activation domain. *J Virol* 67, 6824-6827.
- Gattenloehner, S., Chuvpilo, S., Langebrake, C., Reinhardt, D., Muller-Hermelink, H.K., Serfling, E., Vincent, A., and Marx, A. (2007). Novel RUNX1 isoforms determine the fate of acute myeloid leukemia cells by controlling CD56 expression. *Blood* 110, 2027-2033.
- Gärtner, K., Wiktorowicz, T., Park, J., Mergia, A., Rethwilm, A., and Scheller, C. (2009). Accuracy estimation of foamy virus genome copying. *Retrovirology* 6, 32.
- Geiselhart, V., Bastone, P., Kempf, T., Schnolzer, M., and Lochelt, M. (2004). Furin-mediated cleavage of the feline foamy virus Env leader protein. *J Virol* 78, 13573-13581.
- Geiselhart, V., Schwantes, A., Bastone, P., Frech, M., and Lochelt, M. (2003). Features of the Env leader protein and the N-terminal Gag domain of feline foamy virus important for virus morphogenesis. *Virology* 310, 235-244.

Literaturverzeichnis

Gerlich, W. H., and Kann, M. (2005). Hepatitis B. In B.W.J. Mahy and V. ter Meulen (ed.), *Tobley and Wilson's microbiology and microbial infections 2*, ASM Press, 1226-1268

German, A.C., Harbour, D.A., Helps, C.R., and Gruffydd-Jones, T.J. (2008). Is feline foamy virus really apathogenic? *Vet Immunol Immunopathol* 123, 114-118.

Giron, M. L., Colas, S., Wybier, J., Rozain, F., and Emanoil, R. R. (1997). Expression und maturation of Human Foamy Virus Gag precursor polypeptides. *J. Virol.* 71, 1635 - 1639.

Giron, M.D., Vargas, A.M., Suarez, M.D., and Salto, R. (1998). Sequencing of two alternatively spliced mRNAs corresponding to the extracellular domain of the rat receptor for advanced glycosylation end products (RAGE). *Biochem Biophys Res Commun* 251, 230-234.

Goepfert, P. A., Shaw, K. L., 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., Bansal, A., Edwards, B.H., and Mulligan, M.J. (1999). An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* 73, 7210-7217.

Göttlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3195-3199.

Gottwein, E., Bodem, J., Muller, B., Schmechel, A., Zentgraf, H., and Krausslich, H.G. (2003). The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release. *J Virol* 77, 9474-9485.

Gottwein, E., Jager, S., Habermann, A., and Krausslich, H.G. (2006). Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect. *J Virol* 80, 6267-6275.

Gottwein, E., and Krausslich, H.G. (2005). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. *J Virol* 79, 9134-9144.

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

Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2002a). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J Virol* 76, 3774-3783.

Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H., and Rethwilm, A. (2002b). Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* 76, 10069-10073.

Literaturverzeichnis

- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J., and Rethwilm, A. (1998). Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors. *J Virol* 72, 6307-6314.
- Heneine, W., Switzer, W.M., Sandstrom, P., Brown, J., Vedapuri, S., Schable, C.A., Khan, A.S., Lerche, N.W., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., *et al.* (1998). Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nat Med* 4, 403-407.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E.K., Murthy, K.K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P.A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* 201, 187-199.
- Hill, C. L., Bieniasz, P. D., and 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., Chou, S., Howk, R., Lewis, M., and Gajdusek, D. C. (1973). Isolation of a new Simian Foamy Virus from a spider monkey brain culture. *Infect. Immun.* 8, 804 - 813.
- Hooks, J.J., and Gibbs, C.J., Jr. (1975). The foamy viruses. *Bacteriol Rev* 39, 169-185.
- Huchon, D., Catzeflis, F.M., and Douzery, E.J. (2000). Variance of molecular datings, evolution of rodents and the phylogenetic affinities between Ctenodactylidae and Hystricognathi. *Proc Biol Sci* 267, 393-402.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). *Immunobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag
- Jentsch, S., Seufert, W., and Hauser, H.-P. (1991). Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1089,127-139.
- Johnston, P. B. (1961). A second immunologic type of Simian Foamy Virus: monkey throat infections and unmasking by both types. *J. Infect. Dis.* 109: 1-9.
- Johnston, M.I., and Torrence, P.F. (1984). The role of interferon induced proteins, dsRNA and 2',5'-oligoadenylate in the interferon-mediated inhibition of viral translation. *Interferons*, R.M. Friedman (ed.), Elsevier Science Publishers 3, 189-298.
- Jordan, I., Enssle, J., Guttler, E., Mauer, B., and Rethwilm, A. (1996). Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA. *Virology* 224, 314-319.
- Juretzek, T., Holm, T., Gärtner, K., Kanzler, S., Lindemann, D., Herchenröder, O., Picard-Maureau, M., Rammling, M., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2004). Foamy virus integration. *J Virol* 78, 2472-2777.

Literaturverzeichnis

- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23,19–28.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 893-905.
- Katzourakis, A., Gifford, R.J., Tristem, M., Gilbert, M.T., and Pybus, O.G. (2009). Macroevolution of complex retroviruses. *Science* 325, 1512.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., et al. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6, 981–988
- Keller, A., Partin, K. M., Löchelt, M., Bannert, H., Flügel, R. M. and Cullen B. R. (1991). Characterization of the transcriptional trans activator of Human Foamy Retrovirus. *J. Virol.* 65, 2589 - 2594.
- Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., Buchberger, M., and Wagner, E. (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 4, 409-418.
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Miyauchi, Y., Iwai, K., and Uchiyama, T. (2005). Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem* 280, 18573-18578.
- Konvalinka, J., Lochelt, M., Zentgraf, H., Flugel, R.M., and Krausslich, H.G. (1995). Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J Virol* 69, 7264-7268.
- Kupiec, J.J., Tobaly-Tapiero, J., Canivet, M., Santillana-Hayat, M., Flugel, R.M., Peries, J., and Emanoil-Ravier, R. (1988). Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res* 16, 9557-9565.
- Kuroki, K., Russnak, R., and Ganem, D. (1989). Novel N-terminal amino acid sequence required for retention of a hepatitis B virus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4459-4466
- Lecellier, C.H., and Saib, A. (2000). Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology* 271, 1-8.
- Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1982). The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies. *Virology* 121, 157-167.
- Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1982). The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibodies to nonneutralizing and cross-reactive epitopes of Indiana and New Jersey serotypes. *Virology* 121, 168-174.

Literaturverzeichnis

Lehmann-Che, J., Renault, N., Giron, M.L., Roingeard, P., Clave, E., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Toubert, A., de The, H., and Saib, A. (2007). Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells. *PLoS Pathog* 3, e74.

Lewinski, M.K., and Bushman, F.D. (2005). Retroviral DNA integration-mechanism and consequences. *Adv Genet* 55, 147-181.

Lilly, F. (1970). Fv-2: identification and location of a second gene governing the spleen focus response to Friend leukemia virus in mice. *J Natl Cancer Inst* 45, 163-169.

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

Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2001). A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* 75, 5762-5771.

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

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

Löchelt, M., Aboud, M., and Flügel, R. M. (1993). Increase in the basal transcriptional activity of the Human Foamy Virus internal promoter by the homologous long terminal repeat promoter in cis. *Nucleic. Acids Res.* 11, 4226 - 4230.

Löchelt, M., and Flügel, R.M. (1996). The human foamy virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein. *J Virol* 70, 1033-1040.

Löchelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y.B., Truyen, U., Rosler, U., Battenberg, M., Saib, A., *et al.* (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7982-7987.

Lüftenegger, D., Picard-Maureau, M., Stanke, N., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2005). Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation. *J Virol* 79, 7664-7672.

Malmquist, W.A., Van der Maaten, M.J., and 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.

Martin-Serrano, J. (2007). The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traffic* 8, 1297-1303.

Literaturverzeichnis

McClure, M. O., Bieniasz, P. D., Schulz, T. F., Chrystie, I. L., Simpson, G., Aguzzi, A., Hoad, J. G., Cunningham, A., Kirkwood, J., and Weiss, R. A. (1994). Isolation of a new foamy retrovirus from orangutans. *J. Virol.* *68*, 7124 - 7130.

Meiering, C.D., and Linial, M.L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* *14*, 165-176.

Mergia, A., Leung, N. J., and Blackwell, J. (1996). Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J Med Primatol* *25*, 2-7.

Modrow, S. Falke, D. und Truyen, U. (2003). *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag

Meylan, P.R., Guatelli, J.C., Munis, J.R., Richman, D.D., and Kornbluth, R.S. (1993). Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* *193*, 138-148.

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

Muranyi, W., and Flugel, 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., Picker, L.J., Axthelm, M.K., Hudkins, K., Alpers, C.E., and Linial, M.L. (2008). Replication in a superficial epithelial cell niche explains the lack of pathogenicity of primate foamy virus infections. *J Virol* *82*, 5981-5985.

Netzer, K.O., Schliephake, A., Maurer, B., Watanabe, R., Aguzzi, A., and Rethwilm, A. (1993). Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology* *192*, 336-338.

Newman, R.M., Hall, L., Connole, M., Chen, G.L., Sato, S., Yuste, E., Diehl, W., Hunter, E., Kaur, A., Miller, G.M., *et al.* (2006). Balancing selection and the evolution of functional polymorphism in Old World monkey TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 19134-19139.

Ott, D.E., Coren, L.V., Copeland, T.D., Kane, B.P., Johnson, D.G., Sowder, R.C., 2nd, Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L.O., and Henderson, L.E. (1998). Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* *72*, 2962-2968.

Pacheco, B., Finzi, A., McGee-Estrada, and Sodroski, J. (2010). Species-specific inhibition of foamy viruses from south american monkeys by new world monkey TRIM5 α proteins. *J Virol* *84*, 4095-4099

Parker, S.D., and Hunter, E. (2001). Activation of the Mason-Pfizer monkey virus protease within immature capsids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14631-14636.

Literaturverzeichnis

Patterson, J.B., and Samuel, C.E. (1995). Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Mol Cell Biol* 15, 5376-5388.

Peng, G., Lei, K.J., Jin, W., Greenwell-Wild, T., and Wahl, S.M. (2006). Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *JEM* 203, 41-46

Perkovic, M., Schmidt, S., Marino, D., Russell, R.A., Stauch, B., Hofmann, H., Kopietz, F., Kloke, B.P., Zielonka, J., Strover, H., *et al.* (2009). Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J Biol Chem* 284, 5819-5826.

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

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

Petit, C., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., De The, H., and Saib, A. (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci* 116, 3433-3442.

Pfeiffer, P., and Hohn, T. (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. *Cell* 33, 781-789.

Pfrepfer, K.I., Lochelt, M., Rackwitz, H.R., Schnolzer, M., Heid, H., and Flugel, R.M. (1999). Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus. *J Virol* 73, 7907-7911.

Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* 77, 4722-4730.

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

Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2000). An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the Foamy Virus envelope protein controls fusion activity. *J. Virol.* 74, 4474 - 4482.

Puffer, B.A., Parent, L.J., Wills, J.W., and Montelaro, R.C. (1997). Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J Virol* 71, 6541-6546.

Literaturverzeichnis

- Purdy, J.G., Flanagan, J.M., Ropson, I.J., Rennoll-Bankert, K.E., and Craven, R.C. (2008). Critical role of conserved hydrophobic residues within the major homology region in mature retroviral capsid assembly. *J Virol* 82, 5951-5961.
- Putterman, D., Pepinsky, R.B., and Vogt, V.M. (1990). Ubiquitin in avian leukosis virus particles. *Virology* 176, 633-637.
- Rethwilm, A. (1995). Regulation of Foamy Virus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, 1 - 24.
- Rethwilm, A. (2007b). Foamy Viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 277.
- Rhee, S.S., Hui, H.X., and Hunter, E. (1990). Preassembled capsids of type D retroviruses contain a signal sufficient for targeting specifically to the plasma membrane. *J Virol* 64, 3844-3852.
- Rhee, S.S., and Hunter, E. (1987). Myristylation is required for intracellular transport but not for assembly of D-type retrovirus capsids. *J Virol* 61, 1045-1053.
- Rhee, S.S., and Hunter, E. (1990a). A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell* 63, 77-86.
- Rhee, S.S., and Hunter, E. (1990b). Structural role of the matrix protein of type D retroviruses in gag polyprotein stability and capsid assembly. *J Virol* 64, 4383-4389.
- Riggs, J.L., Oshirls, Taylor, D.O., and Lennette, E.H. (1969). Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* 222, 1190-1191.
- Rizvi, T.A., Lew, K.A., Murphy, E.C., Jr., and Schmidt, R.D. (1996). Role of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) in the propagation of MPMV vectors by genetic complementation using homologous/heterologous env genes. *Virology* 224, 517-532.
- Rizvi, T.A., Schmidt, R.D., and Lew, K.A. (1997). Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) functions in a position-dependent manner. *Virology* 236, 118-129.
- Rogers, N. G., Basnight, M., Gibbs, C. J., and Gajdusek, D. C. (1967). Latent viruses in chimpanzees with experimental kuru. *Nature* 216, 446 - 449.
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13, 397 - 411.
- Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., Gartner, K., Bock, M., Herchenroder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2003). Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol* 77, 11324-11331.
- Russell, R.A., Wiegand, H.L., Moore, M.D., Schafer, A., McClure, M.O., and Cullen, B.R. (2005). Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* 79, 8724-8731.

Literaturverzeichnis

Sabile, A., Rhodes-Feuillette, A., Jaoui, F.Z., Tobaly-Tapiero, J., Giron, M.L., Lasneret, J., Peries, J., and Canivet, M. (1996). In vitro studies on interferon-inducing capacity and sensitivity to IFN of human foamy virus. *Res Virol* 147, 29-37.

Saib, A., Koken, M.H., van der Spek, P., Peries, J., and de The, H. (1995). Involvement of a spliced and defective human foamy virus in the establishment of chronic infection. *J Virol* 69, 5261-5268.

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

Sakalian, M., and Hunter, E. (1999). Separate assembly and transport domains within the Gag precursor of Mason-Pfizer monkey virus. *J Virol* 73, 8073-8082.

Sandstrom, P.A., Phan, K.O., Switzer, W.M., Fredeking, T., Chapman, L., Heneine, W., and Folks, T.M. (2000). Simian foamy virus infection among zoo keepers. *Lancet* 355, 551-552.

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

Schmitt, A.P., Leser, G.P., Morita, E., Sundquist, W.I., and Lamb, R.A. (2005). Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. *J Virol* 79, 2988-2997.

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

Schmidt, M., and Rethwilm, A. (1995). Replicating Foamy Virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* 20, 167 - 178.

Schmidt, R.D., Mustafa, F., Lew, K.A., Browning, M.T., and Rizvi, T.A. (2003). Sequences within both the 5' untranslated region and the gag gene are important for efficient encapsidation of Mason-Pfizer monkey virus RNA. *Virology* 309, 166-178.

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

Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (1995). Phylogenetic analysis of primate foamy viruses by comparison of pol sequences. *Virology* 207, 577-582.

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

Sfakianos, J.N., LaCasse, R.A., and Hunter, E. (2003). The M-PMV cytoplasmic targeting-retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic* 4, 660-670.

Literaturverzeichnis

- Shirazi, Y., and Pitha, P.M. (1992). Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J Virol* 66, 1321-1328.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* 23, 628 - 633.
- Spidel, J.L., Craven, R.C., Wilson, C.B., Patnaik, A., Wang, H., Mansky, L.M., and Wills, J.W. (2004). Lysines close to the Rous sarcoma virus late domain critical for budding. *J Virol* 78, 10606-10616.
- Stange, A., Luftenegger, D., Reh, J., Weissenhorn, W., and Lindemann, D. (2008). Subviral particle release determinants of prototype foamy virus. *J Virol* 82, 9858-9869.
- Stange, A., Mannigel, I., Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Gottlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H., and Lindemann, D. (2005). Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J Virol* 79, 5466-5476.
- Stanke, N., Stange, A., Luftenegger, D., Zentgraf, H., and Lindemann, D. (2005). Ubiquitination of the prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide regulates subviral particle release. *J Virol* 79, 15074-15083.
- Stansell, E., Apkarian, R., Haubova, S., Diehl, W.E., Tytler, E.M., and Hunter, E. (2007). Basic residues in the Mason-Pfizer monkey virus gag matrix domain regulate intracellular trafficking and capsid-membrane interactions. *J Virol* 81, 8977-8988.
- Stansell, E., Tytler, E., Walter, M.R., and Hunter, E. (2004). An early stage of Mason-Pfizer monkey virus budding is regulated by the hydrophobicity of the Gag matrix domain core. *J Virol* 78, 5023-5031.
- Stiles, G. E., Bittle, J. L., and Cabasso, V. J. (1964). Comparison of Simian Foamy Virus strains including a new serological type. *Nature* 201, 1350 - 1351.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Göttlinger, H.G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689-699.
- Strack, B., Calistri, A., and Göttlinger, H.G. (2002). Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol* 76, 5472-5479.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848-853.
- Swanstrom, R., and Wills, J.W. (1997). Synthesis, assembly and processing of viral proteins. *Retroviruses*, J.M. Coffin (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press , 263-335.

Literaturverzeichnis

- Switzer, W.M., Bhullar, V., Shanmugam, V., Cong, M.E., Parekh, B., Lerche, N.W., Yee, J.L., Ely, J.J., Boneva, R., Chapman, L.E., *et al.* (2004). Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol* **78**, 2780-2789.
- Switzer, W.M., Salemi, M., Shanmugam, V., Gao, F., Cong, M.E., Kuiken, C., Bhullar, V., Beer, B.E., Vallet, D., Gautier-Hion, A., *et al.* (2005). Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature* **434**, 376-380.
- Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Lehmann-Che, J., Delelis, O., Giron, M.L., de The, H., and Saib, A. (2008). Chromatin tethering of incoming foamy virus by the structural Gag protein. *Traffic* **9**, 1717-1727.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M.C., Lecellier, C.H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M.L., de The, H., *et al.* (2000). Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* **74**, 4064-4073.
- Tobaly-Tapiero, J., Kupiec, J.J., Santillana-Hayat, M., Canivet, M., Peries, J., and Emanoil-Ravier, R. (1991). Further characterization of the gapped DNA intermediates of human spumavirus: evidence for a dual initiation of plus-strand DNA synthesis. *J Gen Virol* **72** (Pt 3), 605-608.
- Trobridge, G., and Russell, D.W. (2004). Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J Virol* **78**, 2327-2335.
- Trobridge, G., Vassilopoulos, G., Josephson, N., and Russell, D.W. (2002). Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol* **346**, 628-648.
- Vidali, G., Gershey, E.L., and Allfrey, V.G. (1968). Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J Biol Chem* **243**, 6361-6366.
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto, Jr., G. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, Wiley-VCH Verlag, 7342-7372
- Wiktorowicz, T., Peters, K., Armbruster, N., Steinert, A. F., and Rethwilm, A. (2009). Generation of an improved foamy virus vector by dissection of *cis*-acting sequences. *Journal of General Virology* 2009 *J Gen Virol* **90**, 481-487.
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (2000). The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol* **74**, 2885-2887.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S.D., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (2001). Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J Virol* **75**, 7995-8007.

Literaturverzeichnis

- Winkler, I., Bodem, J., Haas, L., Zemba, M., Delius, H., Flower, R., Flügel, M., and Löchelt, M. (1997). Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins shows distinct features different from those of primate spumaviruses. *J. Virol* **71**, 6727-6741
- Wu, M., Chari, S., Yanchis, T., and Mergia, A. (1998). cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* **72**, 3451-3454.
- Xiang, Y., Cameron, C.E., Wills, J.W., and Leis, J. (1996). Fine mapping and characterization of the Rous sarcoma virus Pr76gag late assembly domain. *J Virol* **70**, 5695-5700.
- Yang, P., Zemba, M., Aboud, M., Flügel, R. M., and Löchelt, M. (1997). Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the Human Foamy Virus. *Virus Genes* **15**, 17 - 23.
- Yap, M.W., Lindemann, D., Stanke, N., Reh, J., Westphal, D., Hanenberg, H., Ohkura, S., and Stoye, J.P. (2008). Restriction of foamy viruses by primate Trim5alpha. *J Virol* **82**, 5429-5439.
- Yap, M.W., Nisole, S., Lynch, C., and Stoye, J.P. (2004). Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10786-10791.
- Yasuda, J., and Hunter, E. (1998). A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-independent role in virion release. *J Virol* **72**, 4095-4103.
- Yu, S.F., Eastman, S.W., and Linial, M.L. (2006). Foamy virus capsid assembly occurs at a pericentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag. *Traffic* **7**, 966-977.
- Yu, S.F., Edelmann, K., Strong, R.K., Moebes, A., Rethwilm, A., and Linial, M.L. (1996). 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, Q., Konig, R., Pillai, S., Chiles, K., Kearney, M., Palmer, S., Richman, D., Coffin, J. M., and Landau, N. R. (2004). Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minusstrand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 435-442.
- Yu, S.F., Sullivan, M.D., and Linial, M.L. (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* **73**, 1565-1572.
- Yuan, X., Yu, X., Lee, T.H., and Essex, M. (1993). Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol* **67**, 6387-6394.
- Zhadina, M., McClure, M.O., Johnson, M.C., and Bieniasz, P.D. (2007). Ubiquitin-dependent virus particle budding without viral protein ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20031-20036.

6. Anhang

6.1. Zusammenfassung

Foamyviren (FV) weisen eine Reihe von Merkmalen auf, welche sie von Orthoretroviren unterscheidet, die sie jedoch gleichzeitig mit den Hepadnaviren teilen. Dies betrifft neben der Genomorganisation, der Proteinexpression sowie dem Replikationsverhalten auch die Partikelmorphogenese. Die zentrale Komponente in diesem Prozeß stellt das Gag-Protein dar. FV benötigen im Gegensatz zu Orthoretroviren und vergleichbar den Hepadnaviren die Koexpression des homologen Glykoproteins für den zellulären Partikelexport.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mittels eines chimären Konstruktes aus den Gag-Proteinen von MPMV und PFV versucht, ein Env-interagierendes Motiv sowie die für die Interaktion mit dem Glykoprotein essentiellen As in PFV Gag zu identifizieren. Dabei wiesen die chimären Gag-Proteine Gemeinsamkeiten mit PFV Gag auf, wie eine perinukleäre Akkumulation, eine Voraussetzung für das Assembly sowohl von PFV als auch MPMV. Desweiteren waren die Gag-Chimären für einen zellulären Export auf die Koexpression des homologen Glykoproteins angewiesen. Dies deutete auf die Integrität und Funktionalität des dafür notwendigen PFV Gag N-Terminus hin. Die chimären Gag-Moleküle multimerisierten jedoch nicht zu Kapsiden oder vergleichbaren partikulären Strukturen, vermutlich aufgrund massiver sterischer Zwänge infolge der Beteiligung heterologer Proteindomänen, weswegen sie kein geeignetes System zur funktionellen Analyse der PFV Gag-Env-Interaktion darstellten.

Eine weitere Besonderheit foamyviraler Gag-Proteine ist ihr äußerst geringer Lysinanteil. Im Gegensatz zu den Gag-Proteinen der Orthoretroviren wird der überwiegende Anteil basischer Aminosäuren (As) durch Arginin vertreten. Da über 60 % der Arginin-spezifisierenden Kodons über eine Einzelmutation aus Lysin-Kodons hervorgegangen sein könnten, ist es wahrscheinlich, daß im Verlauf der foamyviralen Evolution eine positive Selektionierung von Gag-Mutanten mit einer Lysin-zu-Arginin-Substitution stattfand. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde anhand der Beispiele von PFV sowie FFV der Frage nachgegangen, welche Funktionen Arginine in foamyviralen Gag-Proteinen während der Replikation übernehmen. Dazu wurde in infektiösen PFV- sowie FFV-Klonen eine Reihe von Argininen gegen Lysine

Anhang

substituiert. Zusätzlich wurde das singuläre Lysin in PFV Gag gegen Arginin substituiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß sämtliche PFV- sowie FFV-Mutanten replikationskompetent waren. Das singuläre Lysin in PFV Gag war für dessen Replikation in immortalisierten Zellen entbehrlich, in einer primären Zelllinie wies die entsprechende Mutante jedoch eine stark eingeschränkte Replikationsfähigkeit auf. Eine PFV-Substitutionsmutante (M141) induzierte in transfizierten 293T-Zellkulturen einen CPE, ein Hinweis auf eine Beteiligung dieses Gag-Abschnittes an der Interaktion mit dem PFV Glykoprotein.

Nach zehnmahliger Zellkultur-Passagierung der PFV Gag-Mutanten traten weder Revertanten noch Pseudorevertanten auf, was jedoch aufgrund der kurzen Zeitspanne des Experimentes nur eine begrenzte Aussagekraft bezüglich der genetischen Stabilität der Mutanten zuließ.

Mittels der Applikation von AZT, eines Inhibitors der foamyviralen reversen Transkription, entweder auf die virusproduzierenden Zellen oder die zur Infektion verwendeten Zielzellen konnte gezeigt werden, daß sich die PFV Gag-Lysinmutanten hinsichtlich ihrer Replikationsstrategie nicht von WT-Viren unterscheiden und ihre genomische RNA größtenteils noch in der Produktionszelle revers transkribieren. Desweiteren konnte mittels quantitativer real-time PCR nachgewiesen werden, daß die PFV- und FFV-Mutanten wie für FV üblich sowohl DNA als auch RNA in ihre Partikel verpacken. Die infektiöse Natur foamyviraler genomischer DNA konnte bereits in früheren Veröffentlichungen gezeigt werden. Auch in dieser Arbeit konnte nach Transfektion von Zellen mit aufgereinigter Virionen-DNA und anschließendem Überstandtransfer ein CPE in den infizierten Indikatorzellen induziert werden, was die Produktion infektiöser Viruspartikel bewies.

Die ϵ -Aminogruppe von Lysin fungiert als potentieller Ubiquitinakzeptor. Für das singuläre Lysin im WT Gag-Protein von PFV konnte wie in früheren Veröffentlichungen keine Ubiquitinierung festgestellt werden, im Gegensatz dazu wurde bei vier der fünf PFV Substitutionsmutanten eine Ubiquitinierung der neu eingeführten Lysine detektiert. Diese kovalente Modifikation hatte jedoch keinen Einfluß auf die Env-Restriktion des PFV-Kapsidexportes aus der Zelle. Für FFV konnte sowohl für den WT als auch die Substitutionsmutanten weder eine LP- noch eine Gag-Ubiquitinierung festgestellt werden. Als wahrscheinliche Ursache dafür kommen Unterschiede in den Komponenten der Ubiquitinierungsmaschinerie zwischen humanen Zellen und Katzenzellen in Frage, weshalb die Analyse einer

möglichen Ubiquitinierung der neu in FFV Gag eingeführten Lysine in Katzenzellen als Produktionszellen durchgeführt werden sollte.

Die Replikationsfähigkeit mehrerer Substitutionsmutanten der Gegenwart von IFN- α und - γ war im Vergleich zum WT stark eingeschränkt. Dies deutete darauf hin, daß IFN-vermittelte Abwehrmechanismen eine Rolle während der positiven Selektion der Lysin-zu-Arginin-Substitutionsmutanten gespielt haben könnten.

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate zeigten, daß sich die PFV- sowie FFV-Lysinmutanten in ihrem Replikationsverhalten nicht von WT-Viren unterscheiden. Im Kontext einer über Millionen von Jahren andauernden Wirts-Erreger-Koevolution stellt jedoch der durch zelluläre Restriktionsfaktoren vermittelte Selektionsdruck auf das Virus einen wichtigen Aspekt dar. Demnach könnte die Substitution von Lysin gegen Arginin beispielsweise über eine veränderte kovalente Modifikation eine Interaktion mit antiretroviralen Restriktionsfaktoren der Wirtszelle modifiziert oder inhibiert haben, wodurch diese Mutanten im Verlauf der foamyviralen Evolution positiv selektioniert wurden.

6.2. Summary

Foamyviruses (FV) harbour several features which distinguishes them from orthoretroviruses and which they share with the hepadnaviruses. Beside differences in the genomic organization, the protein expression and the replication strategy this refers to the morphogenesis of viral particles, in which the Gag protein plays the key role. In contrast to orthoretroviruses and like hepadnaviruses, cellular egress of FV capsids depends on the presence of cognate Env protein.

In the first part of this work it was tried to identify an Env-interacting motif as well as essential amino acids (aa) involved in the recognition of the glycoprotein in PFV Gag. Therefore a chimeric construct containing parts of the Gag proteins of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) and PFV was constructed. Like PFV Gag, the chimeric Gag proteins showed a perinuclear accumulation, a feature of PFV and MPMV assembly. Additionally, cellular export of the Gag chimerics was PFV Env restricted. This pointed to the integrity and functionality of the PFV Gag N-terminus in the chimeric construct. Nevertheless, chimeric Gag molecules didn't multimerize to capsids or comparable particle structures. This was probably caused by massive sterical disorders, due to the involvement of heterologous protein domains. Therefore, the

Gag chimerics didn't represent an appropriate system for the functional analysis of the PFV Gag-Env interaction.

Another peculiarity of foamyviral Gag proteins is their extremely low lysine content. In contrast to orthoretroviral Gag proteins, the main part of basic aa is represented by arginines. Due to the fact that more than 60 % of the arginine-specifying codons could have evolved out of lysine-specifying codons over a single point mutation, a positive selection of Gag mutants with a lysine-to-arginine substitution in the course of foamyviral evolution is likely. In the second part of this work, functions of arginines in foamyviral Gag proteins during replication were studied by using infectious molecular clones of PFV and FFV. Therefore several arginines were substituted for lysines. Additionally the single lysine in PFV Gag (K396) was mutated to arginine. All PFV as well as FFV mutants were replication-competent. Additionally, the single lysine in PFV Gag was non-essential for replication in immortalized cell culture, whereas replication was strongly inhibited in a primary cell line. One PFV substitution mutant (M141) induced an CPE in transfected 293T-cell culture, an indication of an involvement of this part of Gag in the interaction with the PFV glycoprotein. Upon ten cell-free passages of PFV Gag mutants in cell culture, neither revertants nor pseudorevertants appeared, indicating genetic stability during a short-term cell culture experiment.

By application of AZT, an inhibitor of the foamyviral reverse transcription, on producer cells or target cells it was shown that the reverse transcription of the genomic RNA of the PFV Gag lysine mutants occurred mainly in the producer cell and that they therefore didn't differ from wild-type (wt) virus with respect to replication strategy. By quantitative real-time PCR it was shown that PFV and FFV mutants incorporate DNA as well as RNA in particles. Like in recent publications, the infectiousness of foamyviral genomic DNA could be demonstrated in this work. By transfecting cells with extracted virion DNA and following supernatant transfer a CPE could be induced in the infected target cells, showing the production of infectious virus.

The ϵ -aminogroup of lysine functions as a potential ubiquitin acceptor. Like in recent publications, no ubiquitination of the single lysine in PFV wt Gag could be detected. In contrast, four out of five PFV substitution mutants showed ubiquitination of the introduced lysines. Nevertheless, Gag mutants with this covalent modification didn't have the ability to generate virus like particles (VLPs) or to be pseudotyped by heterologous Env. For FFV wt and mutants, neither Env leader peptide nor Gag

ubiquitination could be detected. Differences in components of the ubiquitination machinery between human cells and feline cells are a probable reason for this. Therefore the analysis of ubiquitination of the newly introduced lysines in FFV Gag should be carried out in feline cells as producer cells.

Replication of several substitution mutants was strongly inhibited compared to wt virus in the presence of IFN- α and - γ . These results indicated that IFN mediated defense mechanisms could have played a role in the positive selection of the lysine-to-arginine substitution mutants.

These results show that the PFV and FFV mutants didn't differ from wt viruses with respect to their replication strategy. In the context of the long-term host-pathogen coevolution the selection pressure on the virus mediated by cellular restriction factors represents an important aspect. The mutation from lysines to arginines implying an altered covalent modification of Gag could have led to a modification or inhibition of the interaction with antiretroviral restriction factors of the host cell, leading to a positive selection of these mutants during foamyviral evolution.

6.3. In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmidname	Beschreibung
pDM1	CMV-Promotor getriebenes PFV/ MPMV-Hybrid-expressionsplasmid
pDM2	CMV-Promotor getriebenes MPMV-Expressionsplasmid
pDM3 (Δ 2-20)	Basierend auf pDM1, Deletion des PFV <i>gag</i> -ORF zwischen As 2-20
pDM4 (Δ 80-120)	Basierend auf pDM1, Deletion des PFV <i>gag</i> -ORF zwischen As 80-120 (diese Arbeit)
pDM5 (Δ C197)	Basierend auf pDM1, Deletion des PFV <i>gag</i> -ORF zwischen As 198-303
pDM6 (Δ C132)	Basierend auf pDM1, Deletion des PFV <i>gag</i> -ORF zwischen As 133-303
pDM7 (Δ C65)	Basierend auf pDM1, Deletion des PFV <i>gag</i> -ORF zwischen As 66-303
pDM8 (SGS)3-5(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As S3, G4, S5 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF

Anhang

pDM9 (NVE)6-8(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As N6, V7, E8 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM10 (EYE)9-11(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As E9, Y10, E11 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM11 (LDV)12-14(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L12, D13, V14 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM12 (EAL)15-17(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As E15, A16, L17 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM13 (VVI)18-20(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As V18, V19, I20 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM14 (LRD)21-23(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L21, R22, D23 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM15 (RNI)24-26(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As R24, N25, I26 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM16 (PRN)27-29(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As P27, R28, N29 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM17 (PLH)30-32(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As P30, L31, H32 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM18 (GEV)33-35(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As G33, E34, V35 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM19 (IGL)36-38(AAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der As I36, G37, L38 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM20 (RLTE)39-42(AAAA)	Basierend auf pDM1, Substitution der R39, L40, T41, E42 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM21 (L12A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L12 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM22 (D13A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As D13 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM23 (V14A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As V14 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM24 (E15A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As E15 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pDM25 (L17A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L17 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF

Anhang

pDM26 (L17S)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L17 durch Serin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM27 (G33A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As G33 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM28 (E34A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As E34 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM29 (V35A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As V35 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM30 (I36A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As I36 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM31 (G37A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As G37 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM32 (L38A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L38 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM33 (R39A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As R39 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM34 (L40A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L40 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM35 (T41A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As T41 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM36 (E42A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As E42 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pDM37 (L56,58A)	Basierend auf pDM1, Substitution der As L56,58 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M141 (R22,24K)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As R22,24 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M142 (R68,70K)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As R68,70 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M143 (R169,172,173K)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As R169,172,173 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M144 (R266,268K)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As R226,268 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M145 (R272,274,275,276K)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As R272, 274,275,276 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF

Anhang

pczHSRV2 M146	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M141+M142
pczHSRV2 M147	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M141+M143
pczHSRV2 M148	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M141+M144
pczHSRV2 M149	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M141+M145
pczHSRV2 M150	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M142+M143
pczHSRV2 M151	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M142+M144
pczHSRV2 M152	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M142+M145
pczHSRV2 M153	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M143+M144
pczHSRV2 M154	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M143+M145
pczHSRV2 M155	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M144+M145
pczHSRV2 M156	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M146+M144
pczHSRV2 M157	Basierend auf pczHSRV2, Kombination der Mutanten M156+M143
pczHSRV2 M158	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As K396 durch Arginin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M159 (E15A)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As E15 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M160 (G33A)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As G33 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M161 (E34A)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der As E34 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF
pczHSRV2 M162 (L38A)	Basierend auf pczHSRV2, Substitution der L38 durch Alanin im PFV <i>gag</i> -ORF

Anhang

pChatul-3 M1 (R32K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R32 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M2 (R43K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R43 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M3 (R74K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R74 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M4 (R87K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R87 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M5 (R97,101K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R97,101 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M6 (R109K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R109 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M7 (R139,143K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R139,143 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M8 (R151K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R151 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M9 (R159K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R159 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M10 (R182K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R182 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M11 (R201K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R201 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pChatul-3 M12 (R220K)	Basierend auf pChatul-3, Substitution der As R220 durch Lysin im FFV <i>gag</i> -ORF
pClgag2 M141 (R22,24K)	Basierend auf pClgag2, Substitution der As R22,24 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pClgag2 M142 (R68,70K)	Basierend auf pClgag2, Substitution der As R68,70 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pClgag2 M143 (R169,172,173K)	Basierend auf pClgag2, Substitution der As R169,172,173 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pClgag2 M144 (R266,268K)	Basierend auf pClgag2, Substitution der As R226,268 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF
pClgag2 M145 (R272,274,275,276K)	Basierend auf pClgag2, Substitution der As R272,274,275,276 durch Lysin im PFV <i>gag</i> -ORF

pDM38	Expressionplasmid für MPMV Env, CMV Promotor getrieben
pDM39	DNA-Sonde mit Teil des PFV <i>pol</i> -ORF für RT/ real-time-PCR, basierend auf TOPO pCR® II
pDM40	DNA-Sonde mit Teil des FFV <i>pol</i> -ORF für RT/ real-time-PCR, basierend auf TOPO pCR® II

6.4. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genomorganisation und Genexpression von PFV.....	6
Abb. 2: Morphologie orthoretroviraler (A) und foamyviraler (B) Partikel (Dissertation Nowrouzi, 2007).....	11
Abb. 3: Schematischer Ablauf des foamyviralen Replikationszyklus (Delelis et al., 2004).....	14
Abb. 4: Strategien der retroviralen Partikelmorphogenese mit charakteristischen Vertretern (verändert nach Swanstrom und Wills, 1997).....	16
Abb. 5: Organisation des PFV Gag-Proteins.....	18
Abb. 6: Organisation des MPMV Gag-Proteins pr78 (verändert nach Sakalian und Hunter, 1999).....	70
Abb. 7: Übersicht über das PFV/MPMV-Hybridplasmid (pDM1), das MPMV-WT-Plasmid (pDM2) sowie das Expressionsplasmid für MPMV Env (pDM38) mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen.....	74
Abb. 8: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung chimärer Gag-Proteine von pDM1 bzw. MPMV Gag von pDM2.....	75
Abb. 9: Übersicht über die im PFV <i>gag</i> -ORF eingeführten Deletionen.....	78
Abb. 10: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV <i>gag</i> -Deletionsmutanten.....	79
Abb. 11: Übersicht über die im PFV <i>gag</i> -ORF eingeführten Alaninsubstitutionen zwischen den As 1-20.....	80
Abb. 12: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV <i>gag</i> -Alaninmutanten.....	81
Abb. 13: Übersicht über die im PFV <i>gag</i> -ORF eingeführten Alaninsubstitutionen zwischen As 21-42.....	82

Anhang

Abb. 14: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV <i>gag</i> -Alaninmutanten.....	82
Abb. 15: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der PFV <i>gag</i> -Alaninmutanten.....	83-84
Abb. 16: IF-Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit pczHSRV2, pDM1+pCenv1 sowie verschiedenen Alaninmutanten+pCenv1.....	86-87
Abb. 17: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pczHSRV2 <i>gag</i> -Alaninmutanten.....	89
Abb. 18: IF-Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit pczHSRV2 wt sowie verschiedenen Alaninmutanten.....	91-92
Abb. 19: EM-Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit pczHSRV2 wt sowie verschiedenen Alaninmutanten.....	93-94
Abb. 20: Alignment und der Gag-Proteine von PFV und FFV und Mutagenese der entsprechenden <i>gag</i> -Sequenzen.....	97
Abb. 21: Schematische Darstellung der infektiösen PFV- bzw. FFV- Klone mit den für die Klonierung verwendeten Schnittstellen.....	98
Abb. 22: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von PFV Gag und EGFP.....	99
Abb. 23: Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung transfizierter 293T-Zellkulturen.....	100
Abb. 24: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pczHSRV2 <i>gag</i> -Mutante M158.....	101
Abb. 25: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von FFV Gag und EGFP	103
Abb. 26: Applikationsschema von AZT zur Untersuchung des Zeitpunktes der reversen Transkription (verändert nach Moebes et al., 1997).....	107
Abb. 27: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von PFV Gag und EGFP.....	108
Abb. 28: Amplifizierte Abschnitte der PFV (oben) und FFV (unten) <i>pol</i> -ORFs für die Sondenklonierung bzw. während der real-time PCR.....	110
Abb. 29: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von PFV Gag und EGFP parallel zur Nukleinsäureextraktion.....	112
Abb. 30: Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression von FFV Gag und EGFP parallel zur Nukleinsäureextraktion.....	114

Anhang

Abb. 31: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pczHSRV2 <i>gag</i> -Lysinmutanten zur Analyse der Gag-Ubiquitinierung.....	118
Abb. 32: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der pChatul-3 <i>gag</i> -Lysinmutanten zur Analyse der Gag-Ubiquitinierung.....	120
Abb. 33 Exemplarische WB-Analyse der zellulären Expression und Partikelfreisetzung der pClgag2-Lysinmutanten.....	123
Abb. 34: Zytoplasmatische Domänen der LP verschiedener FV-Isolate mit den darin vorhandenen Lysinen.....	145

6.5. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren (verändert nach Modrow et al., 2003, Dissertation Cartellieri, 2005).....	2
Tab. 2: Beispiele für Foamyvirus-Isolate und ihre Wirte (verändert nach Meiering und Linial, 2001).....	4
Tab. 3a: Durchschnittliche Anteile von Lysinen und Argininen in retroviralen Gag-Proteinen.....	21
Tab. 3b: Durchschnittliche Anteile von Lysinen und Argininen in retroviralen Pol- und Env-Proteinen.....	21
Tab. 4: Verwendung von Arginin-Kodons für die Translation retroviraler Gag-Proteine.....	22
Tab. 5: A/T-Gehalt retroviraler <i>gag</i> -Gene.....	23
Tab. 6: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler mindestens dreier unabhängiger Transfektionen für die Arginin-Lysin-Mutanten.....	99
Tab. 7: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen für die Mutante M158.....	102
Tab. 8: Durchschnittliche infektiöse FFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler mindestens dreier unabhängiger Transfektionen für die Arginin-Lysin-Mutanten.....	103
Tab. 9: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen nach zehnmaliger Passagierung auf BHK/LTR(PFV)/ <i>lacZ</i> -Zellen.....	105
Tab. 10: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) mit Standardfehler dreier unabhängiger Transfektionen des AZT-Inhibitions-Assays.....	107

Anhang

Tab. 11: Quantifizierung der Nukleinsäuren aus PFV-Partikeln in Kopienzahl pro ml mit Standardfehler.....	112
Tab. 12: Quantifizierung der Nukleinsäuren aus FFV-Partikeln in Kopienzahl pro ml mit Standardfehler.....	113
Tab. 13: Transfektionsschema zum Nachweis der der Infektiösität von PFV DNA aus extrazellulären Partikeln.....	116
Tab. 14: FACS-Analyse von HT1080-Zellen zur pMD2.G-Funktionalitätskontrolle.	122
Tab. 15: Mittelwert der FACS-Analyse von HT1080-Zellen nach zwei unabhängigen Transduktionen mit Vektorviren.....	125
Tab. 16: Ausprägung des CPEs infizierter MRC-5-Zellkulturen fünf Tage nach Infektion.....	129
Tab. 17: Durchschnittliche infektiöse PFV-Titer (ffu/ml) nach zwei unabhängigen Transfektionen und anschließender Passagierung auf Interferon-behandelten MRC-5-Zellen.....	129

6.6. Abkürzungsverzeichnis

α - = Anti-

Abb. = Abbildung

ADAR = adenosine deaminases that act on double-stranded RNA

AIDS = Aquired Immunodeficiency Syndrome

Ak = Antikörper

APOBEC3 = Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic complex 3

APS = Ammoniumpersulfat

As = Aminosäure

BFV = Bovines Foamy Virus

bp = Basenpaare

BSA = Bovines Serumalbumin

°C = Grad Celsius

CA = retrovirales Kapsidprotein

CAS = cis-aktive Sequenz

cc = coiled-coil

CIAP = Calf Intestine Alkaline Phosphatase

CMV = Cytomegalovirus

Anhang

CTRS = Cytoplasmic Targeting/Retention Signal
ddNTP = Didesoxynukleotid
dest. = destilliert
DMSO = Dimethylsulfoxid
DNA = Desoxyribonukleinsäure
dNTP = Desoxynukleotid
dsDNA = doppelsträngige DNA
E. coli = *Escherichia coli*
EDTA = Ethylendiamin-Tetraacetat
EFV = Equines Foamy Virus
EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein
EM = Elektronenmikroskop(ie)
Env = retrovirales Hüllprotein
ER = Endoplasmatisches Reticulum
ESCRT- I = Endosomal sorting complex required for transport I
FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS = Fötales Kälberserum
FFV = Felines Foamyvirus
FV = Foamyvirus
Gag = retrovirales gruppenspezifisches Antigen
gp = Glykoprotein
GR-Box = Glyzin-Arginin-reiche Box
h = Stunde
HBV = Hepatitis B Virus
HE-Färbung = Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV = Humanes Immundefizienzvirus
HRP = Meerrettich-Peroxidase
HTLV = Humanes T-Zell-Leukämievirus
ICAP = intrazytoplasmatischen A-Typ-Partikel
IFN = Interferon
IN = retrovirale Integrase
IP = interner Promotor
kbp = Kilobasenpaare
kDa = Kilodalton

Anhang

L- (Domäne) = Late-(Domäne)

LP = Leaderpeptid

LTR = long terminal repeat

M = Molar

MA = retrovirales Matrixprotein

MHC- (Moleküle) = major histocompatibility complex- (Moleküle)

min = Minute

ml = Milliliter

mM = Millimolar

M-MLV Moloney Murine Leukemia Virus

MMTV = Maus-Mammtumor-Virus

MOI = multiplicity of infection

MPMV = Mason-Pfizer Monkey Virus

MT = Mikrotubuli

MTOC = Mikrotubuli-Organisationszentrum

mRNA = messenger RNA

MuLV = Murines Leukämievirus

µm = Mikrometer

µl = Mikroliter

NC = retrovirales Nukleokapsidprotein

NES = Nukleäres Exportsignal

NLS = Nukleäres Lokalisationssignal

n. T. = nach Transfektion

OD = optische Dichte

ORF = open reading frame

pbs = Primerbindungsstelle

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

PCR = Polymerasekettenreaktion

PFV = Prototypisches Foamyvirus

PIC = Präintegrationskomplex

PEI = Polyethylenimin

PES = Pol-Enkapsidierungssequenz

Pol = retrovirale Polymerase

PPT = Polypurintrakt

Anhang

PPP = Proteinprobenpuffer

PR = retrovirale Protease

Ψ = Verpackungssignal

RIG-I = retinoic acid-inducible gene-I

RNA = Ribonukleinsäure

RNaseH = RibonukleaseH

rpm = Umdrehungen pro Minute

R-Region = retrovirale redundante Region der LTRs

RSV = Rous-Sarkoma-Virus

RT = retrovirale Reverse Transkriptase

s = Sekunde

SDS = Natriumdodecylsulfat

SFV = Simianes (Affen-) Foamyvirus

SFVagm = Simianes Foamyvirus aus der Afrik. Grünen Meerkatze

SFVcpz = Simianes Foamyvirus aus dem Schimpansen

SFVgor = Simianes Foamyvirus aus dem Gorilla

SFVmac = Simianes Foamyvirus aus dem Rundgesichtsmakkaken

SFVmar = Simianes Foamyvirus aus dem Krallenaffen

SFVora = Simianes Foamyvirus aus dem Orang-Utan

SFVspm = Simianes Foamyvirus aus dem Klammeraffen

SU = Surface

SVP = Subvirales Partikel

Tab. = Tabelle

TAE = Tris-Azetat-Puffer

TM = Transmembran

U = unique (Region der LTRs)

UTR = untranslatierte Region

UV = ultraviolett

ü. N = über Nacht

VLP = virus like particle

VPS = vacuolar protein sorting

6.7. Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Molekulare Untersuchungen zum Gag-Protein der Foamyviren“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, den 12.8.2010

Daniel Matthes

6.8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 14. Oktober 1980

Geburtsort: Görlitz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

09/1987 – 09/1989 Jahn-Grund-Grundschule, Görlitz

10/1989 – 08/1991 Max-Reger-Grundschule, Hof

09/1991 – 06/2000 Johann-Christian-Reinhart-Gymnasium, Hof
Abschluß: Abitur

Studium

10/2000 – 07/2005 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität,
Würzburg, Abschluß: Diplom

10/2005 – 06/2010 Dissertation am Institut für Virologie an der Julius- Maximilians-
Universität, Würzburg, Betreuer: Prof. Dr. Axel Rethwilm

6.9. Publikationsliste

Grun, C., Berger, S., Matthes, D., and Mueller, M.J. (2007). Early accumulation of non-enzymatically synthesised oxylipins in *Arabidopsis thaliana* after infection with *Pseudomonas syringae*. *Functional Plant Biology* 34, 65–71.

Matthes, D., Wiktorowicz, T., Zahn, J., Bodem, J., Stanke, N., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2010). Basic residues in the foamy virus gag protein. Eingereicht bei *J Virol*.

6.10. Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Rethwilm möchte ich für die Bereitstellung des interessanten und bisweilen sehr spannenden Dissertationsthemas sowie die Betreuung meiner Promotion danken. Stets hat er meine Arbeit mit Interesse, freundlicher Unterstützung sowie Geduld begleitet und so für ein sehr angenehmes und produktives Arbeitsklima gesorgt.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Kuhn für das Interesse an meiner Dissertation und die Bereitschaft, diese zu begutachten.

Dr. Tatiana Wiktorowicz möchte ich für Ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie ein angenehmes Arbeitsklima danken. Vor allem in der Schlussphase meiner Promotion war sie mir eine große Hilfe.

Ebenso danke ich Dr. Jochen Bodem, der mir mit seinem Interesse an meiner Arbeit sowie seiner Hilfs- und Diskussionsbereitschaft geholfen hat.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dirk Lindemann. Durch seine wertvollen Ratschläge sowie sein Interesse hat er zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf und seiner Arbeitsgruppe am DKFZ in Heidelberg, allen voran Birgit Hub, danke ich für die Anfertigung der EM-Aufnahmen.

Ebenso danke ich Dr. Benedikt Weißbrich sowie Barbara Scheiner für Ihre Hilfsbereitschaft sowie die Bereitstellung diverser Materialien.

Tanja, Oana und Bianca danke ich für Ihre Fähigkeit, mit ihrer unermüdlichen Hilfsbereitschaft das Leben eines jeden Doktoranden erheblich zu erleichtern. Ebenso bedanke ich mich bei Conrad, Nicole und Simon für ihre Unterstützung und ein stets entspanntes Arbeitsklima sowie bei Dr. Nicole Stanke und Juliane Zahn für die Durchführung zweier Experimente.

Dr. Ali Nowrouzi danke ich für seine große Hilfsbereitschaft in der Anfangszeit meiner Doktorarbeit. Die erfolgreiche Herstellung unzähliger Mutanten ist nicht zuletzt durch meine Einweisung in die Kunst des Klonierens durch ihn zustande gekommen.

Ganz besonders möchte ich meiner Mutter danken, die mich über alle Jahre in jeglicher Hinsicht unterstützt hat. Ebenso danke ich meinem Bruder für die Wertschätzung und das Interesse an meiner Arbeit sowie die nötige Ablenkung davon, Jasmina für Ihre treue Freundschaft während meiner Würzburger Zeit und hoffentlich darüber hinaus.