

**Molekulare Analyse der Penetration von
Foamyviren und Konstruktion und
Charakterisierung von Adenovirus-Foamyvirus
Hybridvektoren**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Marcus Picard-Maureau
aus Tübingen

Würzburg, 2003

eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Axel Rethwilm

Gutachter: Prof. Dr. Martin Heisenberg

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Axel Rethwilm, der die Betreuung meiner Promotion übernommen hat und die Entwicklung der Arbeit stets mit großem Interesse verfolgt hat. Durch viele nützliche Anregungen und Hinweise hat er maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Ich danke Prof. Dr. Martin Heisenberg für die Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen, und für sein Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Dirk Lindemann, der mich als Betreuer im Labor in jeder Hinsicht unterstützt hat und ohne dessen Anregungen und Hinweise diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Durch zahlreiche gute Ideen hat er meine Projekte maßgeblich vorangebracht.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Martin Heinkelein, der mir als Betreuer des Adenovirus-Foamyvirus Hybridvektorenprojekts stets zur Seite stand. Des weiteren danke ich unseren Kooperationspartnern Florian Kreppel und Prof. Dr. Stephan Kochanek, die die Adenovirus Vektoren konstruiert und das Verpackungsverfahren entwickelt haben.

Ich möchte auch meinen Kollegen und den Betreuern des Europäischen Graduiertenkollegs „Gene regulation in and by microbial pathogenes“ an der Universität Würzburg danken.

Auch meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor der Arbeitsgruppen Rethwilm und Lindemann, besonders Daniel Lüftenegger, gilt mein Dank für freundschaftliche Zusammenarbeit und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders möchte ich meiner Verlobten Verena Buschbacher danken, die mich während der Promotion mit viel Verständnis begleitet und unterstützt hat.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Retroviren	1
1.1.1 Taxonomie und Systematik der Retroviren	1
1.1.2 Morphologie und Genom der Retroviren	3
1.1.3 Der retrovirale Replikationszyklus	6
1.2 Spumaviren	7
1.2.1 Klassifizierung und Taxonomie der Spumaviren	7
1.2.2 Morphologie und Genexpression	9
1.2.3 Der foamyvirale Replikationszyklus	14
1.3 Virale Penetration	17
1.3.1 Möglichkeiten viraler Penetration	17
1.3.2 Endocytotische Eintrittswege	19
1.3.3 Möglichkeiten der Analyse viraler Penetration	20
1.4 Adenovirale Vektoren und Gentherapie	21
1.4.1 Virale Vektoren und Gentherapie	21
1.4.2 Foamyvirale Vektoren	23
1.4.3 Adenoviren und adenovirale Vektoren	24
1.4.3.1 Morphologie und Genom der Adenoviren	24
1.4.3.2 Die adenovirale Infektion	26
1.4.3.3 Pathogenese	27
1.4.3.4 Adenovirale Erst- und Zweitgenerationsvektoren	27
1.4.3.5 Adenovirale Hochkapazitätsvektoren	28
1.4.4 HC-Ad Hybridvektoren	30
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Geräte und Material	32
2.1.2 Chemikalien	33
2.1.3 Radiochemikalien	34
2.1.4 Enzyme	34
2.1.5 Kits	34

2.1.6	Größen-/Längenstandards	35
2.1.7	Antibiotika und Cytostatika	35
2.1.8	Bakterienstämme	35
2.1.9	Zelllinien	36
2.1.10	Antikörper und Antiseren	36
2.1.10.1	α Foamyvirus Antikörper/Antiseren	36
2.1.10.2	Sonstige Antikörper/Antiseren	37
2.1.10.3	Sekundäre Antikörper	37
2.1.11	Plasmide	37
2.1.11.1	Retrovirale Vektoren	37
2.1.11.2	Adenovirale Vektoren	38
2.1.11.3	Expressionsplasmide	38
2.1.12	Oligonukleotide	39
2.1.13	Puffer und Lösungen	40
2.1.13.1	Bakterienkultur	40
2.1.13.2	Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA	40
2.1.13.3	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	42
2.1.13.4	Zellkultur	44
2.1.13.5	Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden	45
2.1.13.6	Standardlösungen und Puffer	46
2.2	Methoden	47
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.1.1	DNA Agarosegelelektrophorese	47
2.2.1.2	Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	47
2.2.1.3	Spektrometrische Bestimmung der DNA Konzentration	47
2.2.1.4	Restriktionsverdau von DNA	48
2.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	48
2.2.1.6	Phosphorylierung von DNA Fragmenten	49
2.2.1.7	Auffüllen von DNA 5' Überhängen mit Klenow Polymerase	49
2.2.1.8	Präzipitation von DNA	50
2.2.1.9	Phenol-Chloroform Extraktion von DNA	50
2.2.1.10	Ligation von linearen DNA Fragmenten	51
2.2.1.11	Sequenzierung von DNA	51
2.2.1.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52

2.2.1.13	Herstellung von kompetenten E. Coli Bakterien	54
2.2.1.14	Transformation von Plasmiden in E. Coli Bakterien	55
2.2.1.15	Plasmidpräparation aus E. Coli durch alkalische Lyse	56
2.2.1.16	Präparation genomischer DNA aus Kulturzellen	57
2.2.1.17	Präparation genomischer DNA aus Adenoviren	58
2.2.1.18	Southern Blot	58
2.2.2	Zellbiologische und Proteinbiochemische Methoden	61
2.2.2.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien	61
2.2.2.2	Einzelzellklonierung durch limitierende Verdünnung	62
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	62
2.2.2.4	Transfektion	62
2.2.2.5	Durchflusscytometrische Analyse und Zellsortierung	65
2.2.1.6	Herstellung von Zelllysaten zur Proteingelektrophorese	65
2.2.1.7	Prokaryotische Proteinexpression und Aufreinigung	66
2.2.1.8	Tricine SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	68
2.2.1.9	Coomassie Färbung von Acrylamidgelen und Gelrocknung	69
2.2.1.10	Western Blot	70
2.2.1.11	Histochemische β -Galactosidase Färbung	71
2.2.3	Virologische Methoden	71
2.2.1.1	Herstellung und Titration infektiöser Retroviruspartikel	71
2.2.1.2	Infektionsanalyse	72
2.2.1.3	pH-abhängige Fusionsanalyse	73
3.	Ergebnisse	74
3.1	Analyse der foamyviralen Penetration	74
3.1.1	Foamyvirale Hüllproteinexpressionskonstrukte	74
3.1.1.1	Die Herstellung von FV Env spezifischen Antiseren	76
3.1.1.2	Nachweis der FV Env Expression	77
3.1.2	Analyse der pH-Abhängigkeit der FV Infektion	79
3.1.2.1	Die Abhängigkeit der PFV Infektion von lysosomotropen Agenzien	79
3.1.2.2	Die Abhängigkeit der FV Infektion von lysosomotropen Agenzien	85
3.1.2.3	Die Stabilität von FV Env pseudotypisierten MuLV Partikeln in Gegenwart von lysosomotropen Agenzien	88

3.1.3	Analyse der pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität des FV Hüllproteins	91
3.1.3.1	Analyse der Induktion der Fusionsaktivität	91
3.1.3.2	Kinetik der Induktion der Fusionsaktivität	95
3.2	Konstruktion und Charakterisierung von Adenovirus-Foamyvirus Hybridvektoren	97
3.2.1	Ad-FV Hybridvektoren	97
3.2.1.1	Konstruktion von Ad-FV Hybridvektoren	97
3.2.1.2	Analyse der Vektorgenome und der Genexpression	101
3.2.1.3	Infektionsanalyse	103
3.2.2	Tet Promotor regulierte Ad-FV Hybridvektoren	106
3.2.2.1	Konstruktion von Ad-FV Tet Hybridvektoren	106
3.2.2.2	Analyse der viralen Genexpression	109
3.2.2.3	Infektionsanalyse	111
3.2.2.4	Die Gentransferaktivität von Ad-FV Tet Hybridvektoren in HuH7 Leberzellen	115
3.2.2.5	Integratanalyse	117
4.	Diskussion	121
4.1	Die pH-Abhängigkeit der FV Env vermittelten Penetration	121
4.1.1	Die Abhängigkeit von lysosomotropen Agenzien der FV Env vermittelten Infektion	121
4.1.2	Die pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität des FV Hüllproteins	124
4.1.3	Die foamyvirale Penetration	126
4.2	Konstruktion und Analyse von Ad-FV Hybridvektoren	127
4.2.1	Funktionalität der Ad-FV Hybridvektoren ohne regulierbare Expression	128
4.2.2	Funktionalität von Ad-FV Hybridvektoren mit regulierbarer Expression	129
4.2.3	Vorteile und Einsetzbarkeit der Ad-FV Hybridvektoren im Vergleich zu anderen Hybridvektor Systemen	134
5.	Literaturverzeichnis	139
6.	Anhang	150
6.1	Zusammenfassung	150
6.2	Summary	151

6.3	Abkürzungsverzeichnis	153
6.4	Abbildungsverzeichnis	154
6.5	Tabellenverzeichnis	155
6.6	Erklärungen	156
6.7	Lebenslauf	157
6.8	Publikationsliste	158

1. Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren bilden eine eigene Familie innerhalb der RNA Viren. Sie unterscheiden sich von anderen Viren hauptsächlich durch die Fähigkeit zur reversen Transkription, die den Retroviren ihren Namen gab, und die stabile Integration der revers transkribierten DNA in das Genom der Wirtszelle. Die Reverse Transkriptase wurde 1970 zum ersten Mal beschrieben (Temin & Mizutani, 1970; Baltimore, 1970) und widerlegte damit das bis dahin gültige Dogma der Molekularbiologie, dass nur DNA als Matrize für RNA dienen kann, jedoch nicht in umgekehrter Richtung eine Abschrift erfolgt. Das erste Retrovirus, das aus humanem Gewebe isoliert wurde, gehörte zum Genus Spumavirus (Achong et al., 1971). Die Retrovirus Forschung wurde allerdings erst mit der Isolation von Retroviren, die humane Krankheiten erregen, zu einem der größten virologischen Arbeitsgebiete. Die Beschreibung des ersten humanpathogenen Retrovirus HTLV (Poiesz et al., 1980) und die Isolation des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) als Erreger von AIDS (Barre-Sinoussi et al., 1983) leiteten den Beginn der humanen Retrovirologie ein. Trotz weitreichender Forschung sind viele Aspekte des retroviralen Lebenszyklus bis heute nicht eindeutig verstanden. Die Fähigkeit von Retroviren, in Zielzellen zu integrieren, macht sie zu einem sehr nützlichen Werkzeug bei der Entwicklung von Vektorsystemen zur Genterapie.

Man geht davon aus, dass außerdem bisher nicht entdeckte Retroviren direkt oder indirekt mit humanen Erkrankungen in Zusammenhang stehen, die bisher als Autoimmunerkrankungen klassifiziert sind (Chermann, 2001).

1.1.1 Taxonomie und Systematik der Retroviren

Die Familie der Retroviren umfasst umhüllte Partikel mit einem als Homodimer vorliegenden, einzelsträngigen RNA Genom mit einer Größe von 7-12 kB. Retroviren unterscheiden sich von anderen Viren hauptsächlich durch zwei besondere Merkmale: Zum einen durch die reverse Transkription (Synthese einer doppelsträngigen DNA von einer einzelsträngigen RNA Matrize), zum anderen durch die Fähigkeit, das virale Genom als reverses Transkript in das Genom der Zielzelle zu integrieren (Pro-

virusgenese). Das Wirtsspektrum der Retroviren erstreckt sich über die gesamten Säugetiere bis zu den Invertebraten. Das Wirtsspektrum einzelner viraler Spezies ist jedoch meist begrenzt. Man unterscheidet einfache Retroviren, die nur die Leseraster gag, pol und env besitzen, sowie komplexe Retroviren, die über weitere akzessorische Leseraster verfügen. Retroviren können endogen (in die Keimbahn des Wirtsgenoms integriert) oder exogen sein. Endogene Retroviren, zumeist in nicht-funktionaler Form, finden sich in fast jedem Genom im Tierreich (Boeke & Stoye, 1997).

Subfamilie	Genus	Spezies (Beispiel)	Genom
Orthoretrovirinae	Alpharetrovirus	ALV (Avian Leukosis Virus)	einfach
	Betaretrovirus	MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus)	einfach
	Gammaretrovirus	MuLV (Murine Leukemia Virus)	einfach
	Deltaretrovirus	BLV (Bovine Leukemia Virus) HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus)	komplex
	Epsilonretrovirus	WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus)	komplex
	Lentivirus	HIV-1 (Human Immune Deficiency Virus 1)	komplex
Spumaretrovirinae	Spumavirus	PFV (Prototype Foamy Virus)	komplex

Tab. 1: Taxonomie und Klassifizierung der Retroviren (nach Regenmortel et al., 2000).

Die Familie der Retroviren wird in zwei Subfamilien unterteilt. Den Orthoretroviren gehören alle Gattungen außer den Spumaviren an, die wegen ihrer besonderen Eigenschaften eine eigene Subfamilie bilden (Tab. 1). Die Gattungen Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Lentivirus und Spumavirus gehören zu den komplexen Retroviren (Regenmortel et al., 2000). Die einfachen Retroviren und die Deltaretroviren bezeichnet man auch als Onkoviren, da sie maligne Tumore induzieren können. Einfache Retroviren können Onkogene in ihr Genom aufnehmen und diese im Provirus in das Genom der Zielzelle integrieren, und/oder durch den Ort der Integration die zelluläre Proteinexpression beeinflussen. Bekannte Vertreter der Onkoviren sind das Rous Sarcoma Virus (RSV), das das *src* Onkogen trägt, und das humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV) (Vogt, 1997[a]). Die Lentiviren verursachen langsam fortschreitende inflammatorische und degenerative Erkrankungen; das bekannteste ist das humane Immundefizienzvirus (HIV), das zur erworbenen Immunschwäche (AIDS) führt. Die Spumaviren, für die in vivo keine Pathogenität bekannt ist (Linial, 2000; Meiering &

Linial, 2001), unterscheiden sich in vielen Merkmalen von anderen Retroviren (Rethwilm, 1996; Yu et al., 1996[a]; Linial, 1999). Sie werden derzeit der Familie der Retroviren zugeordnet, die Bildung einer eigenen Familie wird jedoch diskutiert (Linial, 1999; Lecellier & Saib, 2000).

1.1.2 Morphologie und Genom der Retroviren

Retroviren sind sphärische Partikel mit einer Größe von 100-200 nm, die von einer Lipidmembran umhüllt sind (Fig. 1). In der Hüllmembran verankert befindet sich das

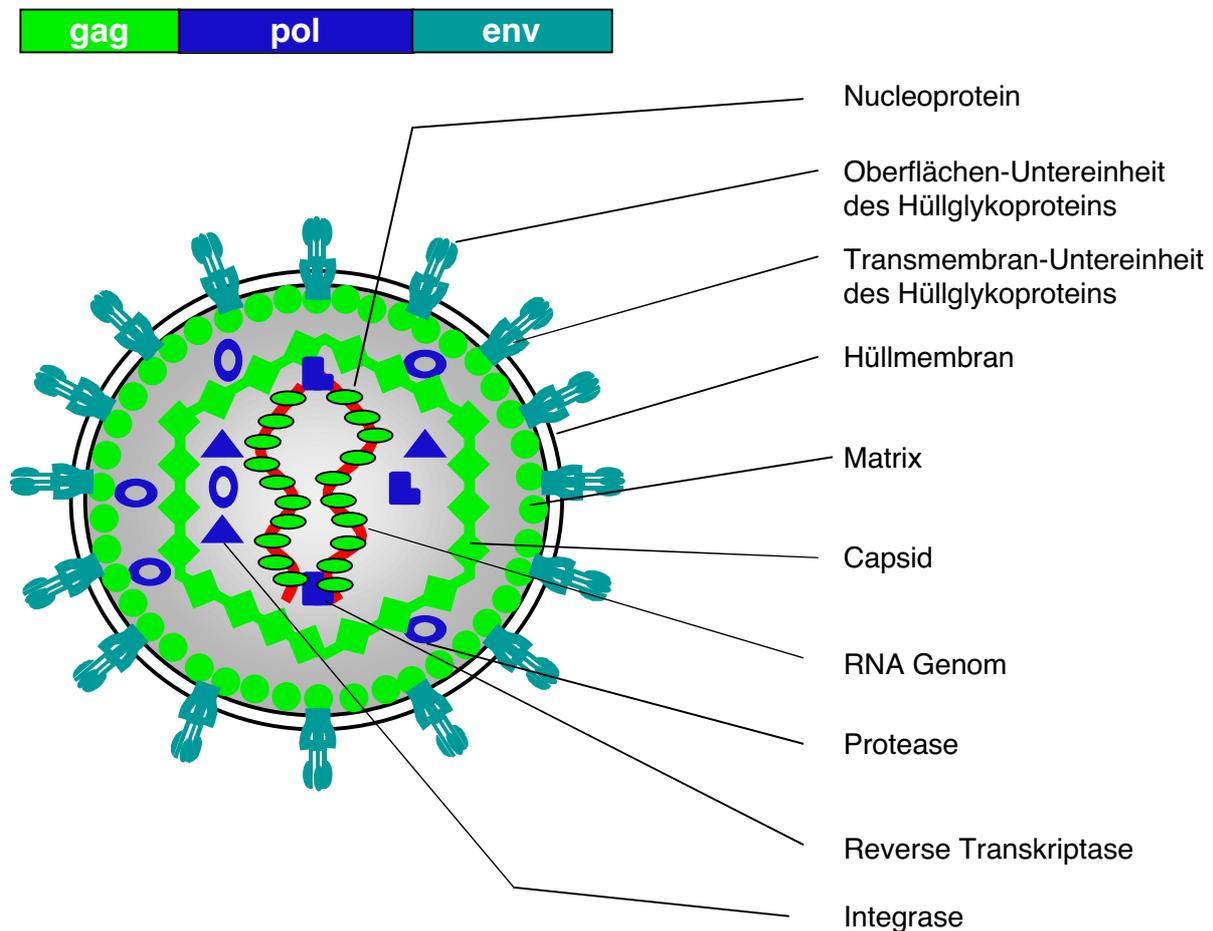


Fig. 1: Aufbau eines einfachen Retrovirus (nach Vogt, 1997[b]).

Die Offenen Leseraster des viralen Genoms, die für die jeweiligen Proteine codieren, sind farblich markiert. Erläuterungen im Text.

virale Hüllprotein (Env). Das Virus erhält eine Hüllmembran bei der Knospung von der Wirtszelle. Das Innere des Partikels besteht aus dem Capsid einer sphärisch bis konisch geformten elektronendichten Proteinhülle, die aus Monomeren des Capsidproteins (CA) besteht. Das Capsid enthält die einzelsträngige virale genomische RNA, die diploid in positiver Orientierung vorliegt. Die genomische RNA wird von Nucleoproteinen stabilisiert und ist am 3' Ende polyadeniliert.

Das Capsid enthält auch virale Proteine, die zur Provirusgenese notwendig sind, die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN) sowie einen an die PBS (Primer-Bindungsstelle) angelagerten tRNA Primer zur Initiation der reversen Transkription. Das Capsid ist von der Matrix umgeben, die das Bindeglied zwischen dem Capsid und der Transmembran-Untereinheit des Hüllproteins bildet (Fig. 1). Die virale Protease (PR), die bei den meisten Retroviren das Partikel durch Spaltung der Gag und Pol Vorläuferproteine zur Reife bringt, liegt in- und außerhalb des Capsids im Partikel (Vogt, 1997[b]).

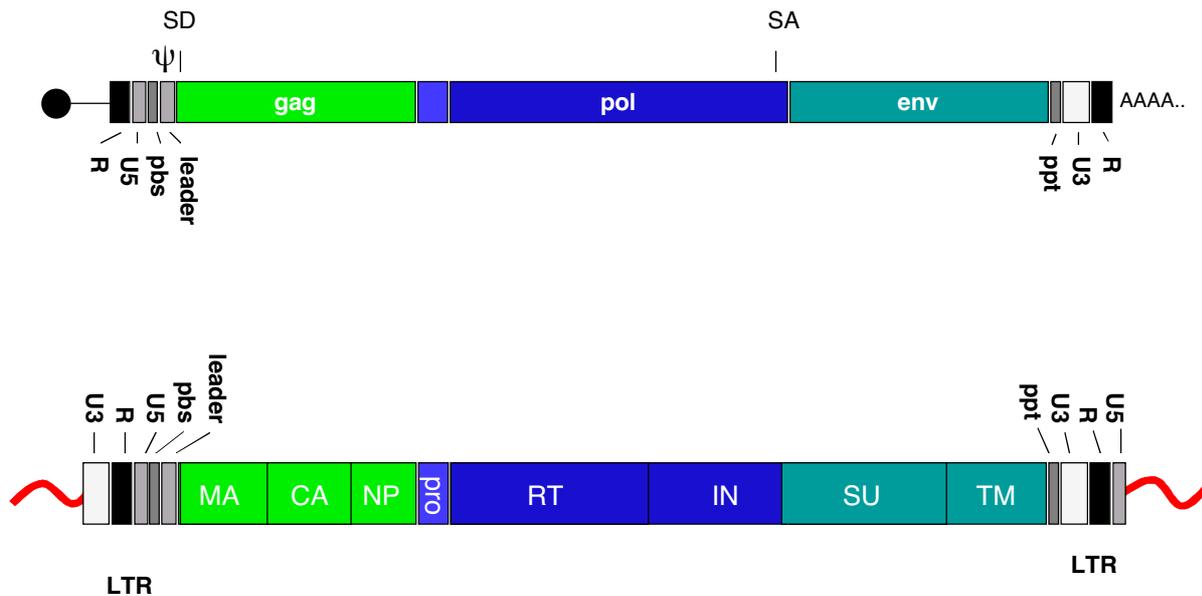


Fig. 2: Genomische RNA und Provirus eines einfachen Retrovirus (nach Vogt, 1997[b]). Die RNA hat am 5' Ende eine methylierte Cap Struktur und ist am 3' Ende polyadeniliert. Die drei ORF sind in hellgrün, blau und meergrün dargestellt, die nicht codierenden Elemente in Weiß- und Grautönen. Die genomische DNA der Wirtszelle ist rot dargestellt. (SD) Spleißdonor; (SA) Spleißakzeptor; (Ψ) Verpackungssignal; (gag, pro, pol, env) Offene Leseraster; (R) R-Region; (U3) 3' einmaliger Bereich; (U5) 5' einmaliger Bereich; (PBS) Primer Bindungsstelle; (PPT) Polypurintrakt; (LTR) Long Terminal Repeat; (MA) Matrixprotein; (CA) Capsidprotein; (NP) Nucleoprotein; (Pro) Protease; (RT) Reverse Transkriptase; (IN) Integrase; (SU) Oberflächen-Untereinheit des Hüllproteins; (TM) Transmembran-Untereinheit des Hüllproteins.

Das Provirus ist von den LTR Regionen (Long terminal Repeats) flankiert, die regulatorische Sequenzen enthalten und für die reverse Transkription und die Integration essentiell sind (Fig. 2). Im U3 Bereich (3' Bereich der viralen RNA) sind zahlreiche Sequenzen zur Kontrolle der Replikation und Genexpression (Promotor und Enhancer) vorhanden. Die U5 Region enthält bei vielen Retroviren für die Reverse Transkription und Verpackung notwendige Sequenzen. Die Bindungssignale für die Integrase befinden sich an den Enden des revers transkribierten DNA Genoms im U5 und U3 Bereich. Der R-Region kommt eine wichtige Rolle bei der reversen Transkription zu. An die PBS Region bindet der zelluläre tRNA Primer für die Minusstrangsynthese der reversen Transkription. Die ppt Region (Polypurine Trakt), die eine charakteristische Sequenz von neun A und G Nukleotiden enthält, dient als Primer der Plusstrangsynthese.

Das Genom eines einfachen Retrovirus, am Beispiel des typischen Vertreters MuLV (Murines Leukämievirus), enthält drei Offene Leseraster, die für Strukturproteine und Enzyme codieren (Fig. 2). Das gag ORF (gruppenspezifisches Antigen) wird durch einen ribosomalen Leserasterwechsel als Vorläuferprotein zusammen mit dem Pol Vorläuferprotein von der genomischen RNA exprimiert. Da der ribosomale Leserasterwechsel zur Regulation der Genexpression dient, passiert dies allerdings zu einem Anteil von weniger als zehn Prozent der gag Transkription. Das Gag Vorläuferprotein wird im viralen Reifungsprozess von der viralen Protease in verschiedene Proteine geschnitten. Neben dem Matrixprotein, dem Capsidprotein und dem Nucleoprotein werden bei einigen Retroviren noch mehrere zusätzliche kleine Proteine prozessiert, deren genaue Funktion unbekannt ist. Der pro/pol ORF (Protease /Polymerase) codiert für die virale Protease, die Reverse Transkriptase mit RNase H Aktivität und die Integrase. Gag, Pro und Pol werden als Polyprotein translatiert, das von der viralen Protease geschnitten wird.

Env dagegen wird unabhängig von einer gespleißten subgenomischen RNA exprimiert und als Env Vorläuferprotein translatiert, das von zellulären Proteasen in eine Oberflächen-Untereinheit (SU) und eine Transmembran-Untereinheit (TM) geschnitten wird. Die Env Proteine werden im rauen ER glykosiliert. Die Aufgabe der Kohlenhydratseitenketten besteht in der Stabilisierung des Hüllproteins, im Schutz gegen proteolytische Enzyme und in der Maskierung potentieller Epitope neutralisierender Antikörper (Vogt, 1997[b]). Env Proteine sind in oligomeren Komplexen zu

drei oder vier SU-TM Heterodimeren angeordnet, die TM-Domäne ist vermutlich für die Oligomerisierung verantwortlich (Einfeld & Hunter, 1988).

Das virale Verpackungssignal (Ψ), das die Verpackung viraler Genome in Capside bewirkt, kann je nach Spezies in verschiedenen Regionen der LTRs vorhanden sein. Komplexe Retroviren enthalten weitere akzessorische Proteine (Cullen, 1991; Vogt, 1997[b]), die die Replikation des Provirus regulieren, durch Interaktionen mit der Wirtszelle die Immunantwort des Wirtes behindern und die Verbreitung des Virus erleichtern (Emermann & Malim, 1998).

1.1.3 Der retrovirale Replikationszyklus

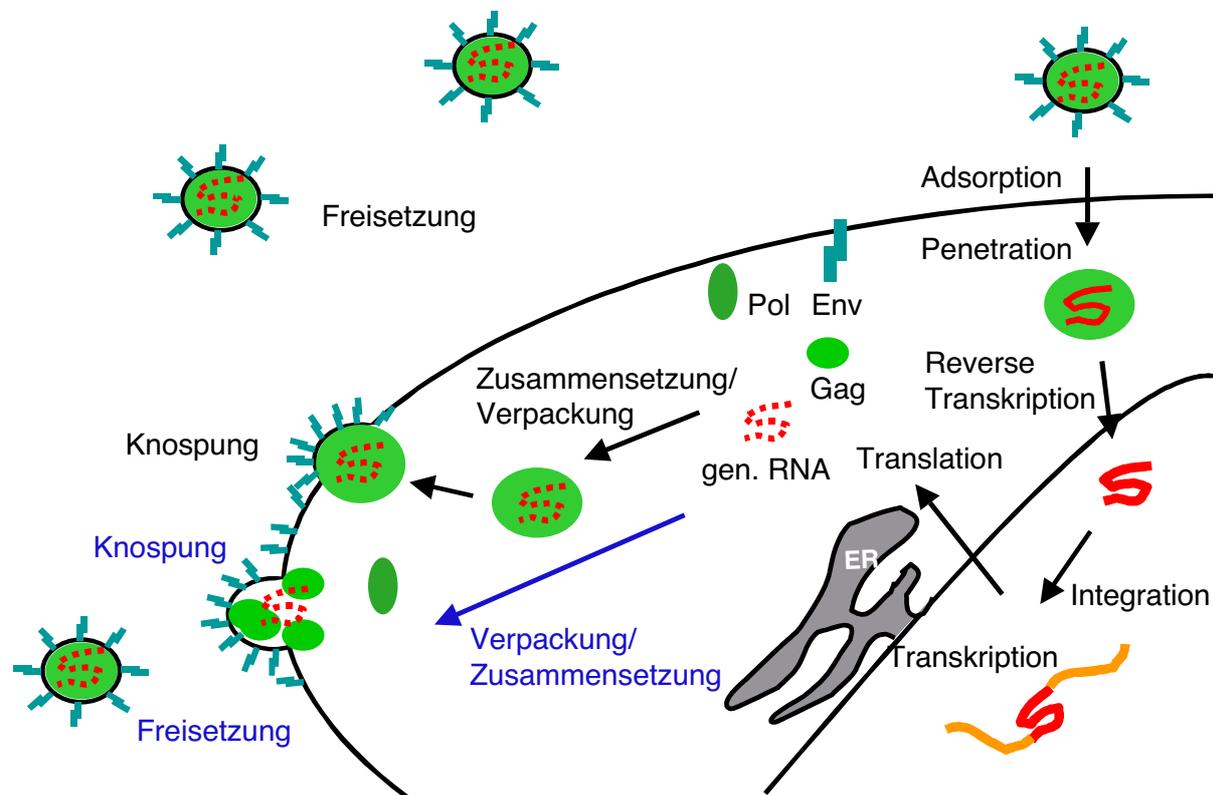


Fig. 3: Der retrovirale Replikationszyklus am Beispiel eines einfachen Retrovirus. Die Morphogenese von C-Typ Retroviren ist blau dargestellt, während die Morphogenese von B/D-Typ Retroviren schwarz dargestellt ist.

Der retrovirale Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des Virus an den Rezeptor auf der Zielzelle. Die SU-Untereinheit des Hüllproteins bindet dabei an das Rezeptormolekül, was zu einer Aufnahme des Virus in die Zielzelle führt. Die Penetration kann durch direkte Fusion der viralen Membran mit der Membran der Zielzelle eingeleitet werden, das Capsid wird dabei in das Cytoplasma freigesetzt. Eine andere Möglichkeit ist ein endocytotischer Eintrittsweg, die virale Membran fusioniert in einem endocytotischen Vesikel mit der Membran des Vesikels und setzt das Capsid in das Cytoplasma frei (Russell and Marsh, 2001). Man ging bisher von einer direkten Fusion als Eintrittsweg für Retroviren aus, in neuester Zeit zeigte sich allerdings, dass viele Retroviren auch endocytotische Eintrittswege benutzen können (Weiss, 2002). Die virale RNA wird nach der Penetration revers transkribiert, die einzelsträngigen RNA Genome werden mit Hilfe der Reversen Transkriptase über einen zweifachen Wechsel der Matrize sowie Hydrolyse der RNA im DNA-RNA Hybrid zu doppelsträngiger DNA transkribiert. Das doppelsträngige DNA Genom gelangt in den Zellkern und wird, katalysiert durch die virale Integrase, unter Duplikation von 4-6 Basenpaaren der benachbarten zellulären genomischen DNA, in das Genom der Zielzelle als Provirus integriert.

Die Transkription des Provirus beginnt nach dem Promotor in der U3 Region und verläuft bis zum Polyadenilierungssignal in der 3' gelegenen R-Region. Bei der viralen Morphogenese unterscheidet man nach der alten Taxonomie B/D-Typ Viren, bei denen sich das Capsid im Cytoplasma formt, und C-Typ Viren, bei denen die Zusammensetzung des Capsids an der Plasmamembran erfolgt (Fig. 3). Zu den B/D-Typ Viren gehören die Betaretroviren und Spumaviren, während alle anderen Gattungen das Capsid an der Zellmembran bilden (Regenmortel et al., 2000).

1.2 Spumaviren

1.2.1 Klassifizierung und Taxonomie der Spumaviren

Die Spuma- oder Foamyviren (FV) zeigen als Hauptmerkmal einen ausgeprägten cytophatischen Effekt (CPE) *in vitro* (Fig. 4 C), der der Unterfamilie Spumavirus den Namen gab. Infizierte Zellen fusionieren *in vitro* zu großen vakuolisierenden Riesenzellen (Syncytien) (Fig. 4), die nur kurzzeitig überlebensfähig sind. *In vivo* etablieren Foamyviren persistierende Infektionen, die jedoch ohne jede Pathogenität verlaufen

(Linial, 2000). Foamyviren wurden aus verschiedenen Spezies isoliert (Tab. 2), so dass man von einer weiten Verbreitung ausgehen kann (Linial, 1999). Unter anderem

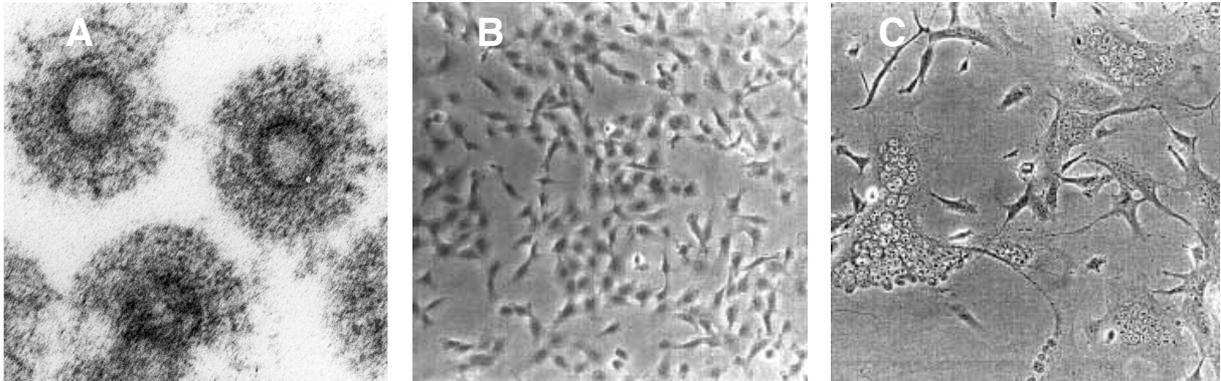


Fig. 4: (A) EM Aufnahme von Spumaviren (H. Zentgraf); (B) uninfizierte humane Fibroblasten; (C) PFV infizierte humane Fibroblasten, der cytopathische Effekt ist deutlich sichtbar.

wurden FV Isolate aus Primaten (Bieniasz et al., 1995; Mergia & Wu, 1998), Katzen (Winkler et al., 1997; Helps & Harbour, 1997), Rindern (Johnson et al., 1983; Renshaw et al., 1991), Pferden (Tobaly-Tapiero et al., 2000; Lecellier et al., 2002[b]) und Menschen isoliert. Das humane Isolat wurde aus einem an einem Nasopharynxkarzinom erkrankten Patienten in Kenia isoliert (Achong et al., 1971). Dieses Isolat wurde als Humanes Foamyvirus (HFV) bezeichnet, spätere Sequenzanalysen ergaben jedoch, dass aus diesem Patienten ein Primatenfoamyvirus (SFVcpz(hu)) isoliert wurde (Herchenröder et al., 1994). Man geht davon aus, dass dieser Patient durch eine Transspezies-Infektion infiziert wurde, allerdings kann eine Laborkontamination bei der Virusisolation nicht ausgeschlossen werden (Meiering & Linial, 2001). Nach neuerer Taxonomie wird dieses Isolat als PFV (Prototype Foamy Virus) bezeichnet. Mehrere solcher Transspezies-Infektionen des Menschen sind bekannt (Heneine et al., 1998; Brooks et al., 2002), während sich keine Hinweise für natürlich auftretende Infektionen bei Menschen gefunden haben (Schweizer et al., 1995; Ali et al., 1996). Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Relation zwischen Foamyviren und humanen Erkrankungen konnte bisher kein eindeutiger Hinweis auf ein humanpathogenes Potential von Foamyviren gefunden werden (Linial, 2000; Meiering & Linial, 2001). Auch konnte eine Virusübertragung von FV infizierten Patienten auf andere Menschen in Langzeitstudien nicht nachgewiesen werden (Boneva et al., 2002).

Ihre offensichtliche Apathogenität macht Foamyviren zu interessanten Objekten für die Entwicklung von retroviralen Vektoren für die Gentherapie (Russell & Miller, 1996; Nestler et al., 1997; Hill et al., 1999; Lindemann et al., 2000; Trobridge et al., 2002[a]).

Virusisolat	Spezies	Jahr der Isolation	Verbreitung (%)
SFV-1, SFV-2	Rhesusaffe	1955	10-100
SFV-3	Grüne Meerkatze	1964	28-93
SFV-6, SFV-7	Schimpanse	1967	75-90
SFV-11	Orang Utan	1994	26-100
SFVgg	Gorilla	1995	nicht bekannt
BFV	Rind	1969	40-85
FFV	Katze	1969	33-76
EFV	Pferd	1999	nicht bekannt
PFV (HFV)	Mensch	1971	zoonotische Transmission

Tab. 2: Übersicht über Foamyvirusisolate (nach Meiering & Linial, 2001).

1.2.2 Morphologie und Genexpression

FV Viruspartikel haben eine sphärische Form mit einem Durchmesser von 120 nm. Die mit dem Env Glykoprotein besetzte Hüllmembran birgt eine, bei PFV meist zentral liegende (Wilk et al., 2001), in reifen Capsiden sphärische Capsidstruktur (Fig. 4 A) mit einem Durchmesser von 50-70 nm; in unreifen Partikeln ist die Capsidstruktur eher pentagonal (Morozov et al., 1997). Das Genom von PFV gehört mit einer Proviruslänge von 13,25 kB und einer Länge der genomischen RNA von 11,68 kB zu den längsten retroviralen Genomen. FV haben ein komplexes Genom, sie verfügen neben den gag, pol und env ORFs über zwei weitere akzessorische ORFs (Rethwilm, 1995) (Fig. 5).

Im Gegensatz zu anderen Retroviren haben Foamyviren neben dem U3 LTR Promotor einen Internen Promotor (IP) in der 5' Region des env ORF vor den akzessorischen Leserastern (Fig. 5) (Löchelt et al., 1993; Löchelt et al., 1994). Der IP hat eine höhere Basalaktivität als der LTR Promotor und ist im Verlauf einer Infektion zu-

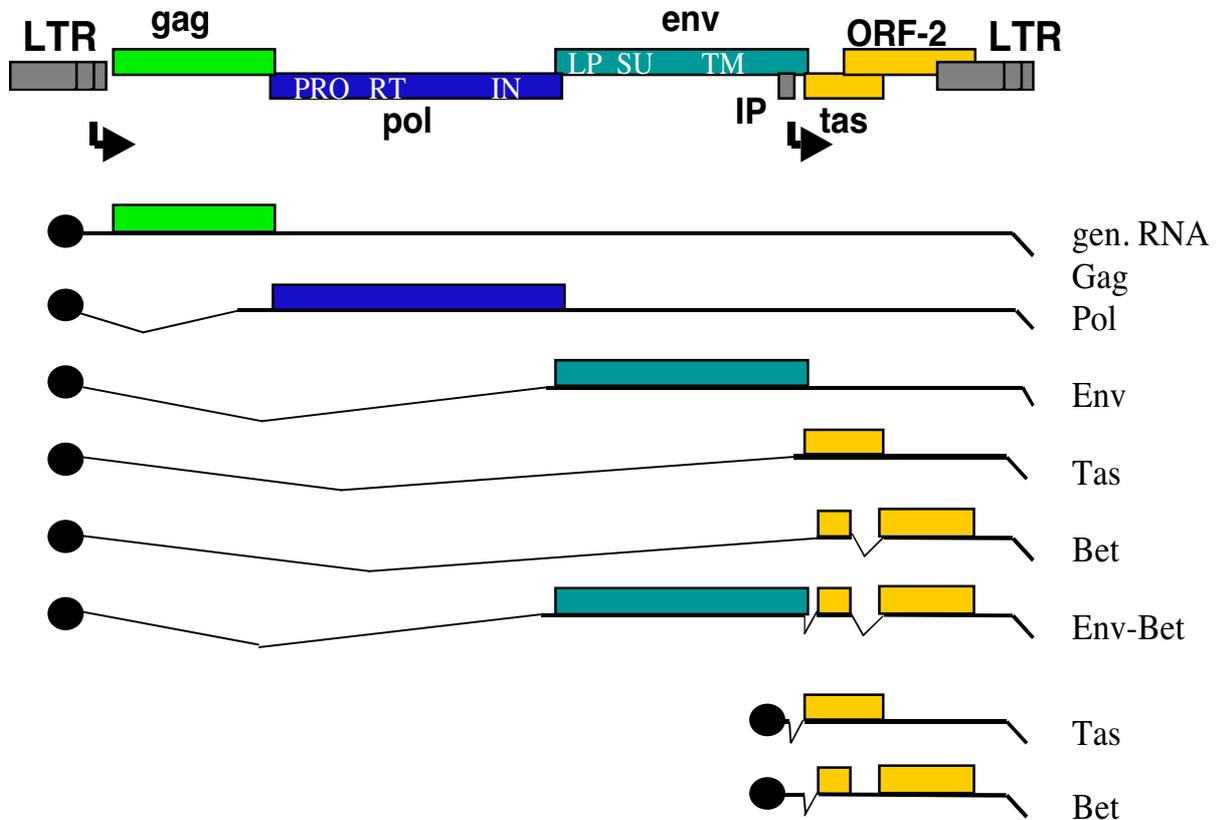
erst aktiv. Das vom IP exprimierte Tas Protein transaktiviert den U3 LTR Promotor, unter dessen Kontrolle die genomische RNA sowie die Strukturproteine und akzesorischen Proteine exprimiert werden (Fig. 5). Der IP ist für die foamyvirale Replikation essentiell (Löchelt et al., 1995).

Strukturproteine

Das FV Gag Protein wird von einer ungespleißten mRNA als Vorläuferprotein translatiert (p71) (Fig. 5), das von der viralen Protease zu einem 68 kD und einem 3 kD Protein prozessiert wird (Netzer et al., 1990). Obwohl die prozessierten und unprozessierten Formen p68 und p71 zu gleicher Menge in der Zelle vorkommen, kann das Capsid von p68 allein gebildet werden (Fischer et al., 1998). Allerdings sind Partikel, deren Capsid nur aus p68 besteht, deutlich weniger infektiös (Konvalinka et al., 1995; Enssle et al., 1997; Zemba et al., 1998). Ein coiled-coiled Motiv in der N-terminalen Gag Domäne ist vermutlich für die Oligomerisierung von Gag Proteinen zur Capsidbildung verantwortlich (Tobaly-Tapiero et al., 2001). Weitere funktionelle Gag Spaltprodukte wie bei anderen Retroviren (Matrix- oder Nucleoprotein) scheint es nicht zu geben. Allerdings wurden mehrere putative Spaltstellen in p71 entdeckt, die jedoch nicht alle und nicht immer von einer Protease geschnitten werden (Pfrepper et al., 1999). Es gibt jedoch elektronenmikroskopische FV Aufnahmen, die möglicherweise eine Matrix-ähnliche Struktur zeigen (Wilk et al., 2001). Im Gegensatz zu anderen Retroviren wird das FV Gag Protein in den Zellkern transportiert (Schliephake & Rethwilm, 1994). Das FV Gag Protein hat die Fähigkeit, DNA und RNA zu binden (Yu et al., 1996[b]), eine Eigenschaft, die an das multifunktionale Hepadnavirus Core Protein erinnert, das ebenfalls RNA und DNA binden kann (Nassal & Schaller, 1993).

Der FV pol ORF wird im Gegensatz zu anderen Retroviren unabhängig vom gag ORF über eine subgenomische RNA exprimiert (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Yu et al., 1996[a]) (Fig. 5). Das 127 kD Vorläuferprotein (p127) wird in eine 80 kD Protease/Reverse Transkriptase/RNaseH und eine 40 kD Integrase gespalten (Netzer et al., 1990; Pfrepper et al., 1999). Eine von der Polymerase abgespaltene Protease konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die FV Polymerase ist, im Gegensatz zu den meisten anderen retroviralen Polymerasen, die Mg^{2+} -abhängig sind, Mn^{2+} -abhängig (Parks & Todaro, 1971). Eine aktive virale Protease ist ebenso

wie eine aktive Integrase und Polymerase zur Bildung infektiöser Partikel notwendig (Konvalinka et al., 1995; Enssle et al., 1999). Die FV Pol Proteine werden ebenso wie die Gag Proteine in den Zellkern transportiert, eine Eigenschaft, die möglicherweise



im Zusammenhang mit dem intrazellulären Replikationszyklus der Foamyviren steht (Imrich et al., 2000).

Fig. 5: Genom und Genexpression eines Foamyvirus (PFV).

(IP) Interner Promotor; (LTR) Long Terminal Repeat; (ORF) Offenes Leseraster.

Die 5' Cap Struktur ist als schwarze Kugel, die Transkriptionsstartpunkte sind durch schwarze Pfeile dargestellt. (IN) Integrase; (LP) Env Leaderpeptid; (PRO) Protease; (RT) Reverse Transkriptase/RNaseH; (SU) Env Oberflächen-Untereinheit; (TM) Env Transmembran-Untereinheit.

Akzessorische Proteine

Der foamyvirale Transaktivator (Tas) wird unter Kontrolle des IP und des U3 LTR Promotors exprimiert (Fig. 5). Das 36 kD Phosphoprotein bindet direkt an die DNA der Erkennungssequenz und weist keine Homologie zu anderen retroviralen Transaktivatoren auf (He et al., 1996; Linial, 1999). Tas aktiviert den foamyviralen U3

LTR Promotor (Erlwein & Rethwilm, 1993) und den IP (He et al., 1996). Das Tas Protein ist für die Replikation von FV essentiell (Baunach et al., 1993; Yu & Linial, 1993). Foamyviren exprimieren noch ein weiteres akzessorisches Protein, das Bet Protein, das von einer mehrfach gespleißten mRNA aus dem tas und bel-2 ORF gebildet wird (Muranyi & Flügel, 1991) (Fig. 5). Die ersten 88 AS stammen von dem tas ORF. Die genaue Funktion des 60 kD Phosphoproteins, das in vitro für die Replikation nicht notwendig ist (Yu & Linial, 1993), ist noch unklar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Bet in infizierten Zellen stark exprimiert (Hahn et al., 1994) und von den Zellen sekretiert wird, im reifen Partikel allerdings nicht vorhanden ist (Lindemann & Rethwilm, 1998). Andere Zellen können das sekretierte Bet Protein aufnehmen (Giron et al., 1998), das sowohl in das Cytoplasma als auch in den Zellkern befördert wird (Lecellier et al., 2002[a]). Zellen, die das Bet Protein exprimieren, sind auch resistent gegen foamyvirale Superinfektion (Bock et al., 1998). Man geht davon aus, dass das Bet Protein eine wichtige Rolle in der Etablierung der foamyviralen Persistenz spielt (Lecellier et al., 2002[a]). Allerdings konnte auch eine persistierende FV Infektion in vivo ohne funktionales Bet Protein nachgewiesen werden (Callahan et al., 1999). In neuesten Arbeiten wurde eine Rolle des Bet Proteins bei der Regulation der Basalaktivität foamyviraler Promotoren gezeigt (Meiering & Linial, 2002).

Das FV Hüllglykoprotein (Env)

Das FV Hüllglykoprotein (Env) (Fig. 6) nimmt eine zentrale Stellung in dieser Arbeit ein und wird aus diesem Grund in einem eigenen Absatz besprochen. Das FV Env Protein unterscheidet sich in vielen Eigenschaften von den Hüllproteinen anderer Retroviren, die hervorstechendsten besonderen Merkmale sind die Notwendigkeit des Hüllproteins für die Freisetzung von Capsiden (Baldwin & Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999), ein ER-Retentionssignal, das zur Lokalisierung des Env Proteins im ER führt (Goepfert et al., 1995; 1997; 1999), und eine wichtige Rolle des Env Leaderpeptids bei der Morphogenese der Foamyviren (Lindemann et al., 2001). Das FV Hüllprotein ist auch, von der Länge der Aminosäuren betrachtet, das größte retrovirale Hüllprotein (Wang & Mulligan, 1999).

Das Env Protein wird als 130 kD Vorläuferprotein (gp130) von einer gespleißten subgenomischen RNA transkribiert (Rethwilm, 1995) (Fig. 5). Das Vorläuferprotein wird vermutlich während des intrazellulären Transports von einer zellulären Furinprotease

in eine 80 kD Oberflächen-Untereinheit (SU) und eine 48 kD Transmembran-Untereinheit geschnitten (Goepfert et al., 1997; Lindemann et al., 1997) (Fig. 6). Das FV Hüllprotein liegt zu Trimeren oligomerisiert in der Hüllmembran vor (Wilk et al., 2000).

Durch mehrfache Spleißvorgänge wird außerdem ein 170 kD Env-Bet Fusionsprotein exprimiert, das aus der extrazellulären Env Domäne und dem gesamten Bet Protein besteht (Lindemann & Rethwilm, 1998; Giron et al., 1998). Es wird wie das Bet Protein sekretiert, allerdings nicht von benachbarten Zellen aufgenommen (Giron et al., 1998). Das 170 kD Vorläuferprotein und seine prozessierten Spaltprodukte gp110^{TM-Bet} und gp80^{SU} können im Lysat und Überstand infizierter Zellen nachgewiesen werden, in Partikeln jedoch nur gp80^{SU} (Lindemann & Rethwilm, 1998). Für dieses Protein ist die genaue Funktion nicht bekannt; da es jedoch für Infektionen in vitro nicht notwendig scheint, vermutet man eine Funktion des Env-Bet Proteins in vivo (Lindemann & Goepfert, 2003).

Durch ein ER-Retentionssignal in der TM Domäne lokalisiert das FV Hüllprotein größtenteils im ER (Goepfert et al., 1995; 1997). Das ER-Retentionssignal ist maßgeblich für die mehrheitliche Knospung der FV in das ER verantwortlich. Mutanten ohne ER-Retentionssignal knospen größtenteils wie andere Retroviren an der Plasmamembran (Goepfert et al., 1999). Allerdings wird dadurch keine erhöhte Partikelfreisetzung bewirkt. Das ER-Retentionssignal ist bei PFV nicht essentiell für die Bildung infektiöser Partikel (Goepfert et al., 1999; Pietschmann et al., 1999). Das Hüllprotein des erst kürzlich beschriebenen equinen Foamyvirus (EFV) benutzt allerdings kein ER-Retentionssignal und EFV Knospung wird nur an der Plasmamembran beobachtet (Lecellier et al., 2002[b]).

Das Leaderpeptid (LP) des FV Hüllproteins ist essentiell für die Partikelfreisetzung (Lindemann et al., 2001). Das bei PFV 18 kD und FFV 16,5 kD Glykoprotein wird posttranslational geschnitten, vermutlich in zeitlicher Nähe zu der SU-TM Spaltung (Lindemann et al., 2001). Das Fehlen der ersten 15 AS des Signalpeptids, der so genannten Knospungsdomäne, verhindert zwar nicht die Einschleusung des Env Proteins in den Sekretionsweg, wohl aber die Partikelfreisetzung (Lindemann et al., 2001). Das LP kann im Zelllysate und in infektiösen Partikeln nachgewiesen werden (Lindemann et al., 2001; Wilk et al., 2001).

Da zum einen Foamyviren keine Capside ohne Hüllproteine freisetzen können (Baldwin & Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999), interessanter-

weise aber Membranvesikel, die nur Hüllproteine enthalten (Shaw et al., 2003), zum anderen die ersten 15 AS des LP essentiell zur Partikelfreisetzung sind (Lindemann et al., 2001), geht man von einer direkten Interaktion der Leaderpeptidomäne des Env Proteins mit dem Capsid beziehungsweise der Matrixdomäne des Gag Proteins aus (Lindemann & Goepfert, 2003). Diese Annahme wird unterstützt durch den Be-

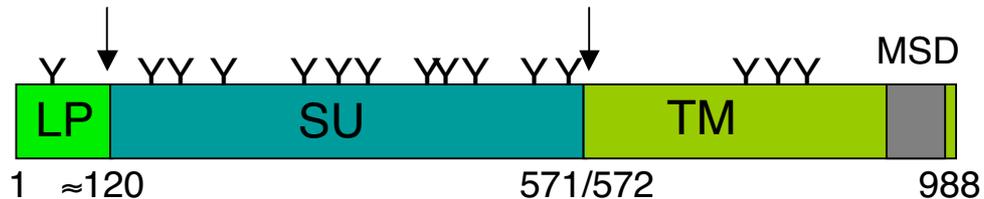


Fig. 6: Schematische Zeichnung des PFV Hüllproteins. (LP) Leaderpeptid; (SU) Oberflächen-Untereinheit; (TM) Transmembran-Untereinheit; (MSD) Membranspannende Domäne; (Y) N-Glykosolierungsstelle. Angabe der AS unten. Die Spaltstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet, für die LP/SU Spaltstelle ist die genaue Position nicht bekannt.

fund, dass die Pseudotypisierbarkeit von retroviralen Capsiden mit FV Hüllproteinen direkt von der Art des FV Signalpeptids abhängig ist (Jarmy et al., 2003; unveröffentlichte eigene Ergebnisse).

Der 32 AS membranspannenden Domäne (MSD) (Fig. 6) kommt neben der Verankerung des Hüllproteins eine wichtige Rolle in der intrazellulären Verteilung des Hüllproteins zu (Pietschmann et al., 2000). Für die Verankerung des Env Proteins in der Zellmembran reichen die ersten 15 AS der MSD aus, allerdings ist die gesamte MSD zur Freisetzung von infektiösen Partikeln notwendig (Pietschmann et al., 2000). Die wichtigste Aufgabe des Hüllproteins ist die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor, die zur Aufnahme des Virus in die Zielzelle führt. Man geht davon aus, dass das FV Env Fusionspeptid, das nach der Rezeptorbindung die Membranfusion aktiviert, als α -helikale Struktur am N-Terminus der TM-Untereinheit vorliegt (Wang & Mulligan, 1999; Lindemann & Goepfert, 2003).

1.2.3 Der foamyvirale Replikationszyklus

Der Text in diesem Abschnitt bezieht sich, wenn nicht anders angegeben auf PFV, da die meisten Untersuchungen dieses Virus als Modell verwenden.

Der Replikationszyklus der Foamyviren kann, für Retroviren einzigartig, in einen intrazellulären und einen extrazellulären Replikationszyklus unterteilt werden (Hein-

kelein et al., 2000) (Fig. 7). Die reverse Transkription im viralen Partikel erfolgt noch in der Wirtszelle (Moebes et al., 1997). Aus freigesetzten PFV Partikeln wurde 80% RNA und 20% DNA isoliert. Die RNA enthaltenden Partikel sind allerdings nicht infektiös, so dass wahrscheinlich infektiöse Partikel die Wirtszelle mit einem kompletten doppelsträngigen DNA Genom verlassen, bei dem wohl nur noch die Polypurin-trakt Regionen einzelsträngiger DNA bestehen (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1996[b]; Yu et al., 1999). Diese Regionen werden vermutlich nach der Penetration

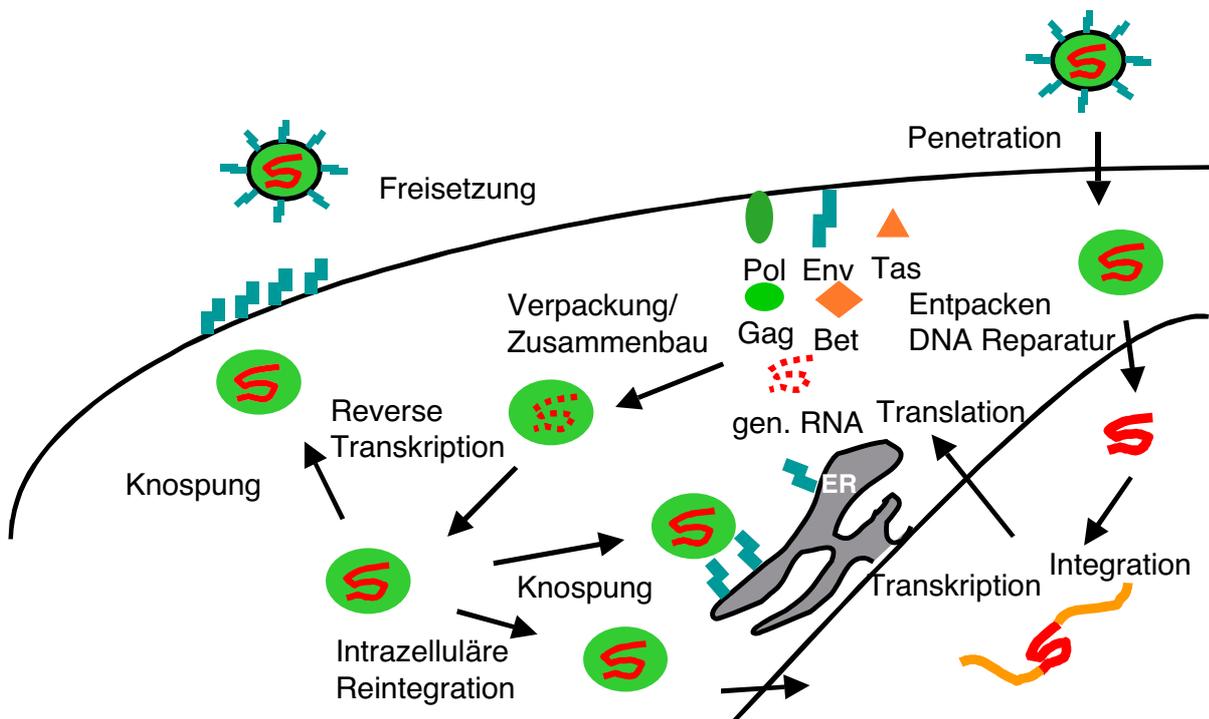


Fig. 7: Der Foamyvirale Replikationszyklus am Beispiel von PFV. Die genomische RNA ist als rote Linie, die genomische DNA dagegen als rote punktierte Linie dargestellt. (ER) Endoplasmatisches Retikulum.

zellen ergänzt (DNA Reparatur). Der frühe RT Schritt in der FV Replikation ermöglicht wahrscheinlich die intrazelluläre Reintegration.

Der Rezeptor der FV ist bisher nicht bekannt, es muss sich jedoch um ein ubiquitäres Molekül handeln, da bisher keine Zelllinie identifiziert werden konnte, die nicht infizierbar ist (Linial, 1999; Lindemann et al., 2000; Lindemann & Goepfert, 2003). Allerdings gibt es zwischen einzelnen Zelllinien durchaus Unterschiede im Grad der Infizierbarkeit (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Das virale Capsid wird nach der

Freisetzung in das Cytoplasma durch Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Saib et al., 1997). Wie der Präintegrationskomplex in den Zellkern gelangt, ist noch unklar, allerdings können FV nur teilungsfähige Zellen infizieren (Bieniasz et al., 1995). Nach erfolgter Integration in das Wirtsgenom wird über den Internen Promotor (Fig. 5), dessen Basalaktivität im Gegensatz zum U3 LTR Promotor zur Tas und Bet Expression ausreicht, die Tas und Bet Proteinexpression getrieben (Löchelt et al., 1993). Tas transaktiviert den U3 LTR Promotor und den Internen Promotor, was zu einer verstärkten Tas und Bet Expression und schließlich zur Expression der Strukturgene und zur Transkription der genomischen RNA führt (Löchelt et al., 1994). In persistierenden Infektionen wird der IP deutlich stärker als der LTR-Promotor aktiviert, in lytischen Infektionen umgekehrt (Meiering et al., 2001). Das Bet Protein wird früh im viralen Infektionszyklus sekretiert und von umliegenden Zellen aufgenommen (Giron et al., 1998; Lecellier et al., 2002[a]), die genaue Funktion ist nicht bekannt; man geht jedoch von einer Rolle für die Etablierung der Persistenz der viralen Infektion aus. Das Gag Vorläuferprotein (Schliephake & Rethwilm, 1994) und die virale Polymerase/Protease/RNaseH sowie die Integrase (Imrich et al., 2000) können im Zellkern und im Cytoplasma lokalisiert werden. Man vermutet eine mögliche Funktion der nuklearen Gag/Pol Lokalisation im intrazellulären Replikationszyklus (Imrich et al., 2000).

Die Gag Proteine p68 und p71 bilden im Cytoplasma Capside, in die die genomische RNA verpackt wird. Zur Verpackung der Pol Proteine ist eine verpackbare RNA notwendig (Heinkelein et al., 2002 [b]). Kurz nach dem Zusammenbau des Capsids findet die reverse Transkription statt, so dass Partikel mit einem doppelsträngigen DNA Genom die Wirtszelle verlassen (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1996; 1999). Die Capside interagieren mit dem hauptsächlich an der ER Membran und auch an der Plasmamembran lokalisierten Hüllprotein (Goepfert et al., 1995; 1997). Das Hüllprotein interagiert vermutlich über das Leaderpeptid des Hüllproteins (Lindemann et al., 2001), das maßgeblich die Interaktion zwischen Hüllproteinen und Capsiden beeinflusst (Lindemann et al., 2001; Jarmy et al., 2003), spezifisch mit dem Capsid. Virale Partikel werden im Gegensatz zu anderen Retroviren nur in Gegenwart eines spezifisch mit dem Capsid interagierenden Hüllproteins freigesetzt (Fischer et al., 1998; Pietschmann et al., 1999). Die Partikel knospen zum größten Teil in das ER und gelangen vermutlich über intrazelluläre Kompartimente an die Oberfläche. Allerdings ist das ER Retentionssignal des Hüllproteins und die Knospung in das ER zur Frei-

setzung infektiöser Partikel *in vitro* nicht notwendig (Goepfert et al., 1999), so dass man in der Knospung in das ER einen Mechanismus sieht, den Kontakt mit dem Immunsystem zu vermeiden (Lecellier & Saib, 2000).

Über den intrazellulären Replikationszyklus können Reintegrationen erfolgen, was zu multiplen proviralen Kopien im Genom führt. Für den intrazellulären Replikationszyklus ist die Gag und Pol Expression notwendig (Heinkelein et al., 2000). Einige Besonderheiten des foamyviralen Replikationszyklus teilen Gemeinsamkeiten mit den Strategien der Retrotransposons und Hepadnaviren, so dass man vermuten kann, dass die Gattung Spumavirus ein evolutionäres Bindeglied zwischen den Retroviren und den Hepadnaviren darstellt (Lecellier & Saib, 2000).

1.3 Virale Penetration

1.3.1 Möglichkeiten viraler Penetration

Viren werden nach der Bindung an den zellulären Rezeptor durch verschiedene Mechanismen in die Zielzelle aufgenommen. Grundsätzlich unterscheidet man die direkte Fusion der viralen Hüllmembran mit der zellulären Membran mit nachfolgender Freisetzung des Capsids in das Cytoplasma (direkte Fusion) und die Aufnahme des Viruspartikels durch endocytotische Mechanismen (rezeptorvermittelte Endocytose) (Fig. 8). Als Beispiel für direkte Fusion dient HIV, bei dem Kontakt mit dem zellulären Rezeptor eine Konformationsänderung des Hüllproteins auslöst und damit die Fusionsaktivität aktiviert (Russell & Marsh, 2001). In letzter Zeit hat sich allerdings gezeigt, dass auch HIV, für das eine Penetration durch direkte Fusion stark angenommen wurde (McClure et al., 1990), endocytotische Eintrittswege nutzen kann (Weiss, 2002; Matthias Dittmar, persönliche Mitteilung). Bei der rezeptorvermittelten Endocytose wird das Capsid durch Fusion der viralen Hüllmembran mit der Membran des intrazellulären Vesikels, das das Virus umschließt, in das Cytoplasma freigesetzt oder, bei nicht umhüllten Viren, auf bisher nicht genau charakterisiertem Weg. Man unterscheidet bei der rezeptorvermittelten Endocytose pH-abhängige und pH-unabhängige Penetration; sowohl umhüllte als auch nicht umhüllte Partikel können pH-abhängige und pH-unabhängige Eintrittswege nutzen. Die Fusionsaktivität vieler viraler Hüllproteine wird pH-abhängig aktiviert oder verstärkt, so dass in endosomalen Kompartimenten, in denen ein

saures Umfeld (pH 5-6) vorherrscht, die virale Fusionsaktivität aktiviert wird (Klasse et al., 1998; Russell & Marsh, 2001). Am besten charakterisiert ist hier die Penetra-

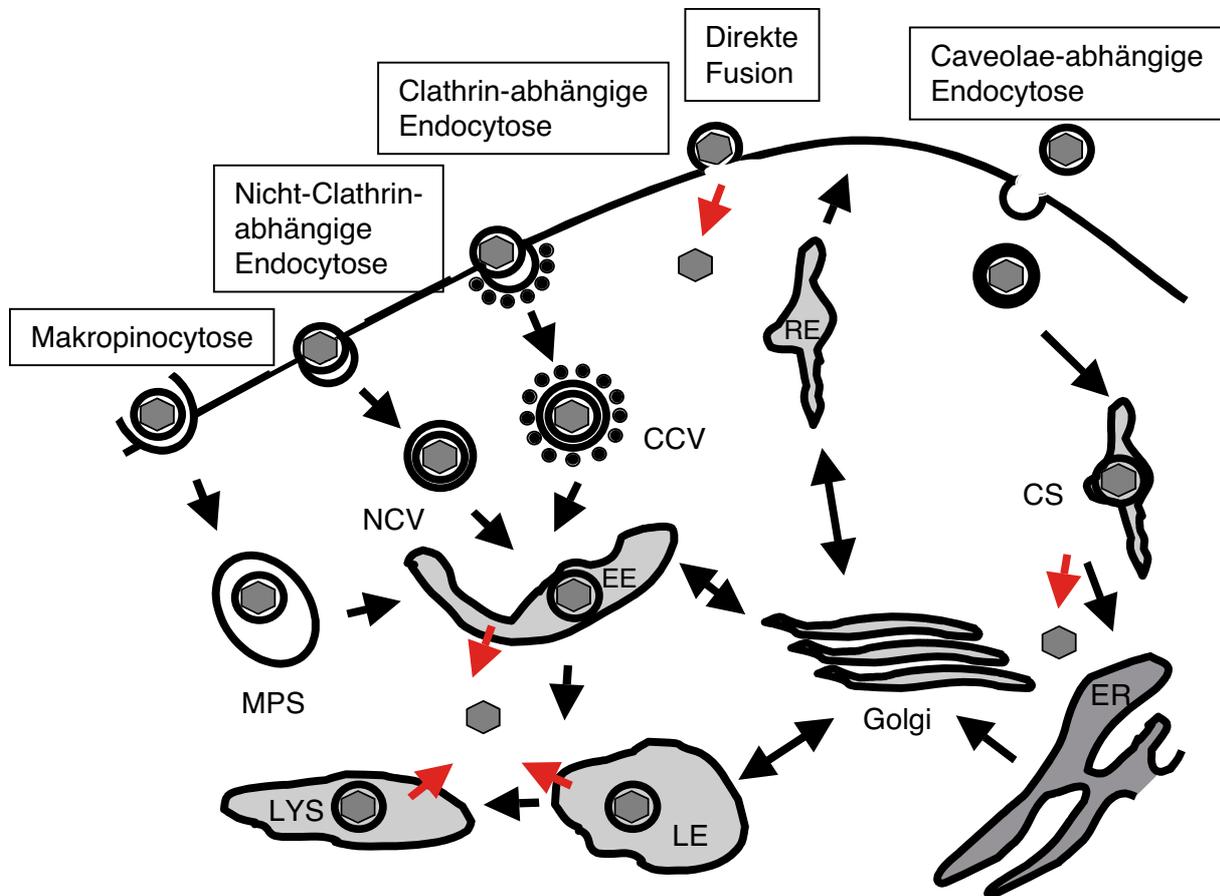


Fig. 8: Eintrittswege von Viren in eukaryotische Zellen, verändert nach Sieczkarski & Whittaker, 2002. Rote Pfeile stellen mögliche Wege der Capsid- bzw. Partikelfreisetzung dar, schwarze Pfeile Wege intrazellulärer Kompartimente.

(CCV) Clathrin-besetztes Vesikel; (CS) Caveosom; (EE) frühes Endosom; (ER) Endoplasmatisches Retikulum; (LE) spätes Endosom; (LYS) Lysosom; (MPS) Makropinosom; (NCV) nicht-Clathrin-besetztes Vesikel; (RE) rezyklierendes Endosom.

tion von Influenza A (Orthomyxoviridae) (Skehel & Wiley, 2000) und Semliki Forest Virus (Togaviridae) (Wahlberg & Garoff, 1992). Das Influenza Haemagglutinin, das mit hoher Spezifität und niedriger Affinität an seinen zellulären Rezeptor N-Acetylneuraminsäure bindet (Hunter, 1997) ändert bei saurem pH die Konformation und wird fusionsaktiv (Nussbaum & Loyter, 1987; Skehel & Wiley, 2000). Es hat sich gezeigt, dass Viren möglicherweise zelltyp-, rezeptor- und milieuhabhängig verschiedene Eintrittswege nutzen können (Sieczkarski & Whittaker, 2002).

1.3.2 Endocytotische Eintrittswege

Unter dem Begriff endocytotische Eintrittswege versteht man alle Mechanismen der Aufnahme des Capsids in die Zelle, bei denen das Partikel durch eine Invagination in ein intrazelluläres Kompartiment aufgenommen wird. Für den Eintritt von Viren in eukaryotische Zellen sind bisher Mechanismen der Clathrin-abhängigen Endocytose, Clathrin-unabhängigen Endocytose, Caveolae-abhängigen Endocytose und Makropinocytose identifiziert worden (Fig. 8) (Russell & Marsh, 2001; Sieczkarski & Whittaker, 2002). Bei der Endocytose verschmilzt das Vesikel mit einem frühen Endosom, das später zu einem späten Endosom und/oder Lysosom wird. Bei späten Endosomen und Lysosomen liegt ein saurer pH vor (pH 5-5,5), der zur Aktivierung saurer Hydrolasen dient. Viele Viren nutzen den sauren pH zur Aktivierung der viralen Fusionsaktivität (Marsh & Pelchen-Matthews, 2000; Russell & Marsh, 2001).

Familie	Spezies	umhüllt	ph-abhängig	Endocytose
Adenoviridae	Adenovirus	nein	ja (1, 2)	dyn, Eps15
Hepadnaviridae	Duck Hepatitis B	ja	nein	ATP-abhängig
Herpesviridae	EBV, HHV6	ja	nein	UCV (EM)
Orthomyxoviridae	Influenza A	ja	ja (1,2) pH 5,5-6,5	CCV und UCV (EM)
Papovaviridae	SV-40	nein	unklar	Caveolae (EM)
Parvoviridae	AAV	nein	ja (1,2)	CCV (EM), dyn
Picornaviridae	HRV-2	nein	ja (2) pH 5,6	
Retroviridae	MMTV	ja	ja (3)	
Rhabdoviridae	VSV	ja	ja (1,2) pH 6,0	CCV und UCV (EM)
Togaviridae	SFV, Sindbis	ja	ja (1,2,4) pH 6,0	CCV (EM), dyn
Totiviridae	Giardia	nein	ja (1)	UCV (EM)

Tab. 3: Penetration von Viren, die vermutlich endocytotische Mechanismen nutzen (Verändert nach Russell & Marsh, 2001).

(1) inhibiert durch lysosomotrope Agenzien; (2) inhibiert durch vakuoläre ATPase Inhibitoren; (3) Fusionsaktivität bei niedrigem pH erhöht; (4) inhibiert durch Carboxylische Ionophoren; (EBV) Epstein-Barr-Virus; (HHV6) Humanes Herpesvirus 6; (SV-40) Simian Virus 40; (AAV) Adeno-Assoziiertes Virus; (MMTV) Mouse Mammary Tumor Virus; (VSV) Vesiculäres Stomatitis Virus; (SFV) Semliki Forest Virus; (CCV) Clathrin-besetzte Vesikel; (UCV) unbesetzte-Vesikel; (dyn) Dynamin-abhängige Infektion; (EM) Elektronenmikroskopie; (Eps15) Eintritt durch dominant negative Eps15 Mutanten inhibiert.

Clathrin-abhängige Endocytose

Bei der Clathrin-abhängigen Endocytose werden die Partikel von Clathrin-besetzten endocytotischen Vesikeln zum frühen Endosom transportiert (Fig. 8). Inzwischen wurden viele Proteine, die in den Clathrin-abhängigen Endocytoseweg involviert sind, identifiziert (Russell & Marsh, 2001; Sieczkarski & Whittaker, 2002). Dieser Eintrittsweg wird zum Beispiel von VSV, SFV und mit hoher Wahrscheinlichkeit von Adenovirus genutzt (Tab. 3).

Clathrin-unabhängige Endocytose

Bei der Untersuchung des Eintrittswegs vieler Viren wurden bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen unbesetzte Vesikel mit internalisierten Partikeln detektiert (Influenza, Sendai Virus) (Tab. 3). Clathrin-unabhängige Eintrittswege sind bisher nicht gut charakterisiert, treten aber zumeist zusammen mit Clathrin-abhängiger Endocytose auf und können alleine nur studiert werden, wenn Clathrin spezifisch inhibiert wird (Sieczkarski & Whittaker, 2002).

Caveolae-abhängige Endocytose

Caveolae sind rundlich-längliche Caveolin-besetzte Membraneinstülpungen, denen Rollen in der Endocytose, Transcytose und Zellkommunikation zukommen (Pelkmans & Helenius, 2002). Caveolare Vesikel werden zum Caveosom, von dort zum ER transportiert (Fig. 8). Für das SV-40 Virus (Simian Virus 40) wurde vor kurzem, als bisher erstes Virus, als Eintrittsweg die Caveolae-abhängige Endocytose nachgewiesen (Pelkmans & Helenius, 2002; Sieczkarski & Whittaker, 2002).

1.3.3 Möglichkeiten der Analyse viraler Penetration

Virale Penetration lässt sich zum einen durch Inhibition putativer viraler Eintrittswege studieren, zum anderen mit Hilfe visueller Lokalisation der Viren während des Eintrittsweges durch mikroskopische Methoden; auch eine Kombination beider Möglichkeiten kann erfolgreich sein (Russell & Marsh, 2001; Sieczkarski & Whittaker, 2002).

Bei der Inhibition viraler Eintrittswege können endocytotische Eintrittswege generell oder spezifisch einzelne Eintrittswege inhibiert werden. Zur generellen Inhibierung bieten sich lysosomotrope Agenzien an, die die Ansäuerung endosomaler Kompartimente verhindern, und damit einen möglichen Fusionsprozess des Virus mit der endosomalen Membran (Helenius et al., 1982; Russell & Marsh, 2001). Auch die Inhibierung vakuolärer ATPasen durch spezielle Agenzien (Palokangas et al., 1994; Perez & Carrasco, 1994) und die Hemmung der Ansäuerung endosomaler Kompartimente durch Carboxylische Ionophoren (Marsh et al., 1982; Iruzun et al., 1997) verursachen einen ähnlichen Effekt. Weitere Möglichkeiten der Hemmung bestehen in spezifischen Temperaturinkubationen, die keine Endocytose ermöglichen (Matlin et al., 1982). Die Hemmung durch Temperaturinkubation hat sich aber in neuester Zeit als zu unspezifisch und daher nicht geeignet erwiesen (Russell & Marsh, 2001).

Für viele endocytotische Eintrittswege sind spezielle Inhibitoren bekannt (Tab. 3); in letzter Zeit setzt sich die Überexpression dominant negativer Mutanten von für die jeweilige Endocytoseart notwendigen Proteinen durch (Sieczkarski & Whittaker, 2002). Allerdings hat sich gezeigt, dass auch die meisten dominant negativen Mutanten nicht nur Auswirkungen auf eine Endocytoseart haben (Russell & Marsh, 2001; Sieczkarski & Whittaker, 2002).

Sowohl pH-abhängige als auch pH-unabhängige Viren können über Endocytose eintreten, und verschiedene Viren können zell- und umständeabhängig sowohl endocytotische Eintrittswege als auch direkte Fusion nutzen. Eine Analyse sollte möglichst viele Faktoren untersuchen.

1.4 Virale Vektoren und Gentherapie

1.4.1 Virale Vektoren und Gentherapie

Gentherapie ist der Versuch, therapeutische Genprodukte in Zielzellen im erkrankten Organismus zu exprimieren, entweder um Fehlfunktionen auszugleichen oder zur direkten oder indirekten Interaktion mit Pathogenen (Lazo & Yunta, 2000). Der Gentransfer kann durch Transfektion (ich möchte unter diesem Begriff das gesamte Spektrum der Versuche, DNA mit Hilfe chemischer und physikalischer Methoden in Zellen einzuschleusen, zusammenfassen), virale und bakterielle Vektoren oder auch

transposable Elemente durchgeführt werden. In neuester Zeit gewinnen Ansätze zur Einschleusung künstlicher humaner Chromosomen und sequenz-spezifische Modifikation genomischer DNA durch Oligonukleotide an Bedeutung (Gruenert et al., 2002).

Viraler Vektor	Vorteile	Nachteile
Retrovirus (MuLV, Lentiviren)	stabile Integration in Zielzellen Vektoren ohne virale Gene Breites Wirtsspektrum durch Pseudotypisierung	niedrige Titer (10^7 U/ml) Insertgröße limitiert (8 kB) nur Infektion teilungsfähiger Zellen (außer bei lentiviralen Vektoren)
Adenovirus (Ad5, Ad2)	hohe Titer (10^{12} U/ml) große Inserts möglich (7-36 kB) starke Genexpression breites Wirtsspektrum	Vektoren mit vielen viralen Genen (außer HC-Ad Vektoren) starke Immunantwort Genexpression transient keine Verpackungszelllinie
Adeno-Assoziiertes Virus	spezifische Integrationsstellen infiziert nicht-replizierende Zellen nicht pathogen	braucht Adenovirus Helfervirus für Replikation Insertgröße limitiert (4,5 kB) keine Verpackungszelllinie
Herpesvirus (HSV)	hohe Titer (10^{11} U/ml) neurotrop (zellspezifisch) große Inserts möglich (>30 kB)	komplexe Konstruktion starke Immunantwort keine Verpackungszelllinie
Vaccinia	effizienter Gentransfer große Inserts möglich (25 kB)	sehr starke lokale und systemische Immunantwort

Tab. 4: Vor- und Nachteile der am meisten verbreiteten viralen Vektoren für gentherapeutische Zwecke (Lazo & Yunta, 2000; Lam & Breakefield, 2000).

Virale Vektoren gewinnen immer mehr an Bedeutung für gentherapeutische Zwecke, da Viren als natürlicher Mechanismus zur Expression fremder genetischer Information in humane Zellen effizienten Gentransfer und komplexe Regulation der Gen-

expression ermöglichen (Lazo & Yunta, 2000). Die verschiedenen viralen Vektorsysteme haben jedoch spezifische Vor- und Nachteile (Tab. 4), so dass die Auswahl des für den jeweiligen therapeutischen Ansatz geeigneten Systems von vielen Faktoren, wie der Art und Größe des Transgens, von der Dauer, dem gewünschten Ort der Expression und der Regulation der Expression abhängt.

1.4.2 Foamyvirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind wegen ihrer Fähigkeit zur stabilen Integration des viralen Genoms in das Genom der Zielzelle als Vektoren für gentherapeutische Ansätze besonders interessant. FV Vektoren nehmen wegen ihrer besonderen Eigenschaften innerhalb der retroviralen Vektoren einen wichtigen Platz ein. Die offensichtliche Apathogenität der FV (1.2.1) und ihre Fähigkeit, nahezu jede Zelle (1.2.1), auch Stammzellen zu transduzieren (Trobridge et al., 2002 [a]; Leurs et al., 2003), sowie die Möglichkeit, ruhende Zellen besser als die bisher hauptsächlich gebrauchten Murinen Leukämieviren zu infizieren (Hill et al., 1999; Trobridge et al., 2002[a]), machen sie zu einem viel versprechenden Werkzeug für die Gentherapie. FV können auch im Vergleich zu anderen Retroviren längere therapeutische Gene verpacken (über 9 kB) (Trobridge et al., 2002 [b]). Allerdings können mit FV nur Titer von 10^5 bis 10^7 Partikel/ml erreicht werden, die jedoch mittels Zentrifugation um den Faktor 10-20 aufkonzentriert werden können (Lindemann et al., 2000; C. Leurs, unveröffentlichte Ergebnisse; Trobridge et al., 2002[b]; eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Mit adenoviralen Vektoren können im Gegensatz dazu Titer bis 10^{12} Partikel/ml erreicht werden (Lam & Breakefield, 2000).

Das Wirtsspektrum wird nachhaltig durch die Art des Hüllproteins beeinflusst (Hunter, 1997). Foamyviren können im Gegensatz zu HIV und MuLV Vektoren nicht mit dem VSV (Vesikuläres Stomatitisvirus, Rhabdoviridae) Hüllprotein und anderen fremden Hüllproteinen pseudotypisiert werden (Lindemann et al., 1997; Pietschmann et al., 1999; Hill et al., 1999). Allerdings zeigte sich in neueren Studien, dass die Pseudotypisierbarkeit foamyviraler Capside mit FV Hüllproteinen zum größten Teil von der Beschaffenheit des Leaderpeptids des Hüllproteins abhängt, und somit durch Konstruktion von FV Hüllproteinchimären Pseudotypisierungen ermöglicht werden können. Chimäre heterologe Hüllproteine können zwar in FV Partikel eingebaut werden, die Partikel sind aber nicht infektiös. (Lindemann et al., 2001; Jarmy et al., 2003).

Durch zunehmende Charakterisierung der FV cis-aktiven Sequenzen können sicherere Vektoren hergestellt werden, die weniger virale Sequenzen enthalten und ein größeres Verpackungslimit haben (Heinkelein et al., 2002[a]; Trobridge et al., 2002[b]). Foamyvirale Vektoren können durch Cotransfektion verschiedener Plasmide hergestellt werden. Dabei müssen von den Plasmiden Gag, Pol und Env (1.2.2) und eine verpackbare RNA exprimiert werden (Fig. 9) (Heinkelein et al., 2002[b]; Leurs et al., 2003). Da bei FV Gag unabhängig von Pol exprimiert werden kann (1.2.2), sind Vier-Plasmid Systeme möglich, die eine höhere Sicherheit gewährleisten, da vier Rekombinationen zur Produktion replikationsfähiger Viruspartikel notwendig sind (Heinkelein et al., 2002[a]). Außerdem wurden replikationskompetente FV Vektoren für die antitumorale Therapie bereits erfolgreich *in vitro* und *in vivo* erprobt (Nestler et al., 1997; Lindemann et al., 2000).

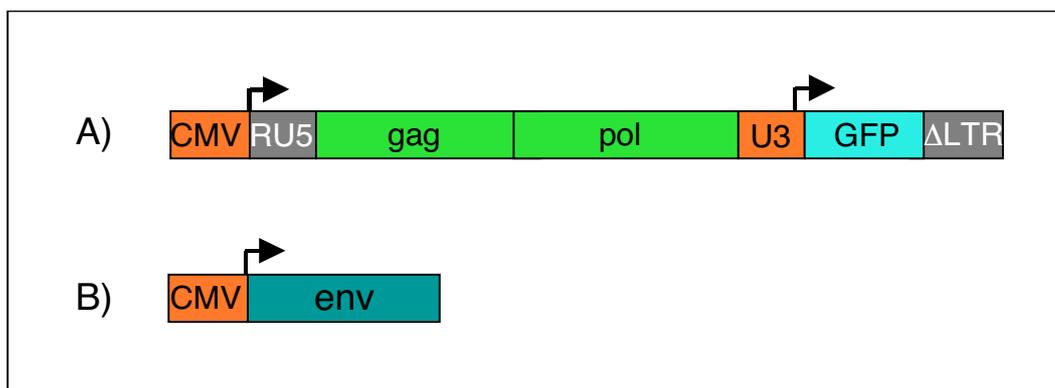


Fig. 9: Foamyvirales Zwei-Plasmid Vektor System. (A) FV Gag/Pol Expressionsplasmid und Transfervektor mit GFP Markergen; (B) Env Expressionsplasmid. (CMV) Cytomegalievirus-Promotor; (GFP) Grün fluoreszierendes Protein; (U3) SFFV U3-Promotor.

1.4.3 Adenoviren und adenovirale Vektoren

1.4.3.1 Morphologie und Genom der Adenoviren

Adenoviren werden in die Genera Aviaadenovirus und Mastadenovirus eingeteilt; zu den Mastadenoviren gehören unter anderem murine, bovine, porcine, equine und 41 humane Adenoviren (Shenk, 2001). Im Folgenden beziehe ich mich auf die humanen Adenoviren 2 und 5, die am besten charakterisiert sind und hauptsächlich als Vektoren verwendet werden.

Adenoviren sind icosaedrische, nicht-umhüllte Partikel mit einem Durchmesser von 70 bis 100 nM. Das Capsid besteht aus 252 Capsomeren, 240 Hexonen und 12 Pentonen. Jedes Penton dient als Basis einer prominenten Stachelstruktur mit einem runden Kopf am Ende (Fig. 10) (Shenk, 2001). Das virale Genom besteht aus einer 36 kB doppelsträngigen DNA die am 5' Ende kovalent an ein 55 kD terminales Protein (TP) gebunden ist. Das TP dient als Primer der DNA Replikation und bindet im Nukleus von Zielzellen an die Matrix des Zellkerns. Das virale Genom enthält an den Enden invertierte terminale Wiederholungen (ITR), die bei der Replikation der Paarung zwischen Einzelsträngen dienen. Die virale DNA ist an das Hauptkernprotein VII, das eine histonähnliche Funktion einnimmt, und an ein kleineres Protein (μ) unbekannter Funktion gebunden (Fig. 10) (Shenk, 2001). Im Partikel befindet sich auch eine virale Protease, die für die Penetration und Prozessierung von Strukturproteinen notwendig ist (Russell, 2000; Shenk, 2001).

Das lineare Genom enthält zwei Replikationsstartpunkte in den ITRs, ein Verpackungssignal, das mehrere hundert Basenpaare vom Chromosomenende entfernt liegen muss, und vier frühe sowie zwei mittlere und eine späte Transkriptionseinheit, die in fünf RNA Familien unterteilt ist. Die frühen Transkriptionseinheiten, die nach einer Infektion zuerst transkribiert werden, codieren für Proteine mit transaktivierenden und mit der Zielzelle interagierenden Funktionen. Sie dienen haupt-

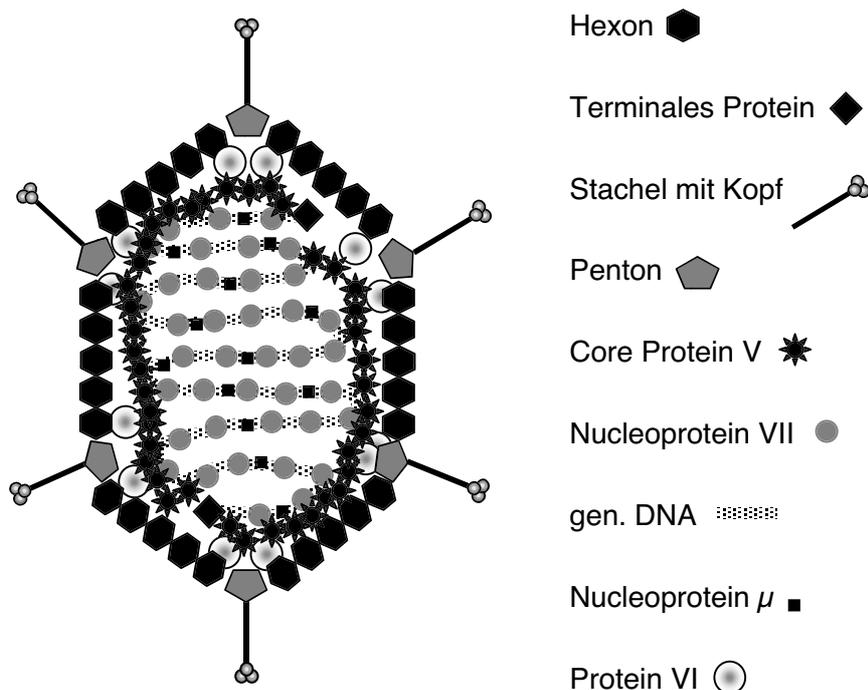


Fig. 10: Aufbau eines Adenovirus (vereinfacht nach Russell, 2000).

sächlich der Manipulation des Zellzyklus, der Inhibierung der Apoptose, der Inhibierung der zellulären Proteinexpression und der Transkriptionsregulation viraler Proteine. Die mittleren Transkriptionseinheiten codieren für Proteine, die hauptsächlich der Regulation der viralen Genexpression dienen, während die späten Transkriptionseinheiten Strukturproteine exprimieren. In verschiedenen Subtypen werden auch ein bis zwei virale RNAs, die mit der Wirtszelle interagieren, transkribiert (Shenk, 2001).

1.4.3.2 Die adenovirale Infektion

Das Virus bindet über den runden Kopf am Ende des Stachels mit hoher Affinität an den zellulären Rezeptor. Der bekannteste Rezeptor ist der CAR Rezeptor (Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor), ein Mitglied der Ig Superfamilie; allerdings wurden in letzter Zeit noch andere Rezeptoren entdeckt (Russell, 2000). Ein RGD Motiv auf dem Basispenton bindet an zelluläre α_v Integrine, die normalerweise der Zelladhäsion dienen. Das Virus wird über rezeptorvermittelte, clathrin-abhängige Endocytose aufgenommen und durch nicht vollständig bekannte Mechanismen aus frühen Endosomen freigesetzt. Die Partikel werden dynein- und mitochondrienabhängig zum Zellkern transportiert. Das Capsid wird durch Mitwirkung der viralen Protease geöffnet und das Genom wird durch die Kernporen transportiert. Im Zellkern bindet das TP an die Zellkernmatrix (Russell, 2000). Zuerst werden die Proteine früher Transkriptionseinheiten exprimiert (Fig. 11 A); das E1A Protein dient unter anderem als Transaktivator und ist für die Expression weiterer viraler Genprodukte essentiell. Durch frühe Genprodukte wird die Zelle in der S-Phase arretiert und der Transport zellulärer Transkripte in das Cytoplasma blockiert (Abschaltung der Wirtszelle). Die nun exprimierten späten Proteine sind hauptsächlich Strukturproteine. Die DNA Replikation startet an den beiden Replikationsstartpunkten in den ITRs, dabei dient das TP als Primer. Das virale Genom wird über eine intermediäre Pfannenstielstruktur repliziert. Die Verpackung beginnt im Zellkern mit der Assoziation von Strukturproteinen mit der viralen DNA. Durch Zerstörung der Kernmembran gelangen die Partikel in das Cytoplasma. Die Freisetzung von Partikeln erfolgt schließlich durch Zerstörung der Wirtszellmembran (Russell, 2000; Shenk, 2001).

1.4.3.3 Pathogenese

Adenoviren sind für ihre Wirte meist in verschiedener Ausprägung pathogen. Humanpathogene Adenoviren können unter anderem akute respiratorische Erkrankungen, Pneumonien, Keratokonjunktivits, Gastroenteritis und Myocarditis verursachen. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion, Flüssigkeiten und kontaminierte Gegenstände. Obwohl 50 Prozent der Infektionen asymptomatisch verlaufen, können Adenoviren lange Zeit in den Tonsillen persistieren und werden über den Speichel ausgeschieden. Das humane Adenovirus 5, das in dieser Arbeit als Vektor dient, kann akute Pharyngitis und Hepatitis in lebertransplantierten Patienten verursachen (Horwitz, 2001).

1.4.3.4 Adenovirale Erst- und Zweitgenerationsvektoren

Adenoviren eignen sich wegen ihres breiten Wirtsspektrums, ihres großen Verpackungslimits und der Möglichkeit, hohe Titer relativ einfach herzustellen, gut als Vektoren für gentherapeutische Zwecke. Die Rezeptorspezifität kann durch Manipulation des Stachelköpfchens verändert werden, womit gewebsspezifische Vektoren hergestellt werden können (Imperiale, 2000).

Die so genannten Erstgenerationsvektoren sind E1 und/oder E3 deletierte Adenoviren (Fig. 11). An der Stelle der Deletionen können Expressionskassetten mit Fremdmaterial bis 6,5 kB eingesetzt werden. Die Viren können in E1 exprimierenden Zellen (z.B. 293) vermehrt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Deletion von E1 nicht ausreichend sicher ist. Bei sehr hohen Titern können E2 Genprodukte auch ohne E1 exprimiert werden und es hat sich gezeigt, dass zelluläre Proteine E1A Funktionen übernehmen können, was zu einer abgeschwächten Expression viraler Proteine führt (Russell, 2000; Imperiale, 2000).

Die Zweit- und Drittgenerationsvektoren (Fig. 11) sind E1 und E2A deletiert, weitere Entwicklungen sind E1, E2A und E3 deletiert. Verbesserte Sicherheit wurde erreicht durch Konstruktion von Verpackungszelllinien, die keine mit den Vektoren überlappenden Sequenzen enthalten und das Risiko von Rekombinationen minimieren. In diese Vektorsysteme können auch größere Transgenkassetten eingebaut werden. Ein großes Problem der Erst- und Zweitgenerationsvektoren ist jedoch eine starke Immunantwort des Wirtes (Russell, 2000).

1.4.3.5 Adenovirale Hochkapazitätsvektoren

Adenovirale Hochkapazitätsvektoren (HC-Ad), auch „gutless“ Vektoren genannt, enthalten keine adenoviralen Sequenzen außer den ITRs und dem Verpackungssignal (Fig. 11) (Russell, 2000; Kochanek et al., 2001; Sato et al., 2002). HC-Ad Vektoren müssen über ein Helfervirus-abhängiges System verpackt werden, da die

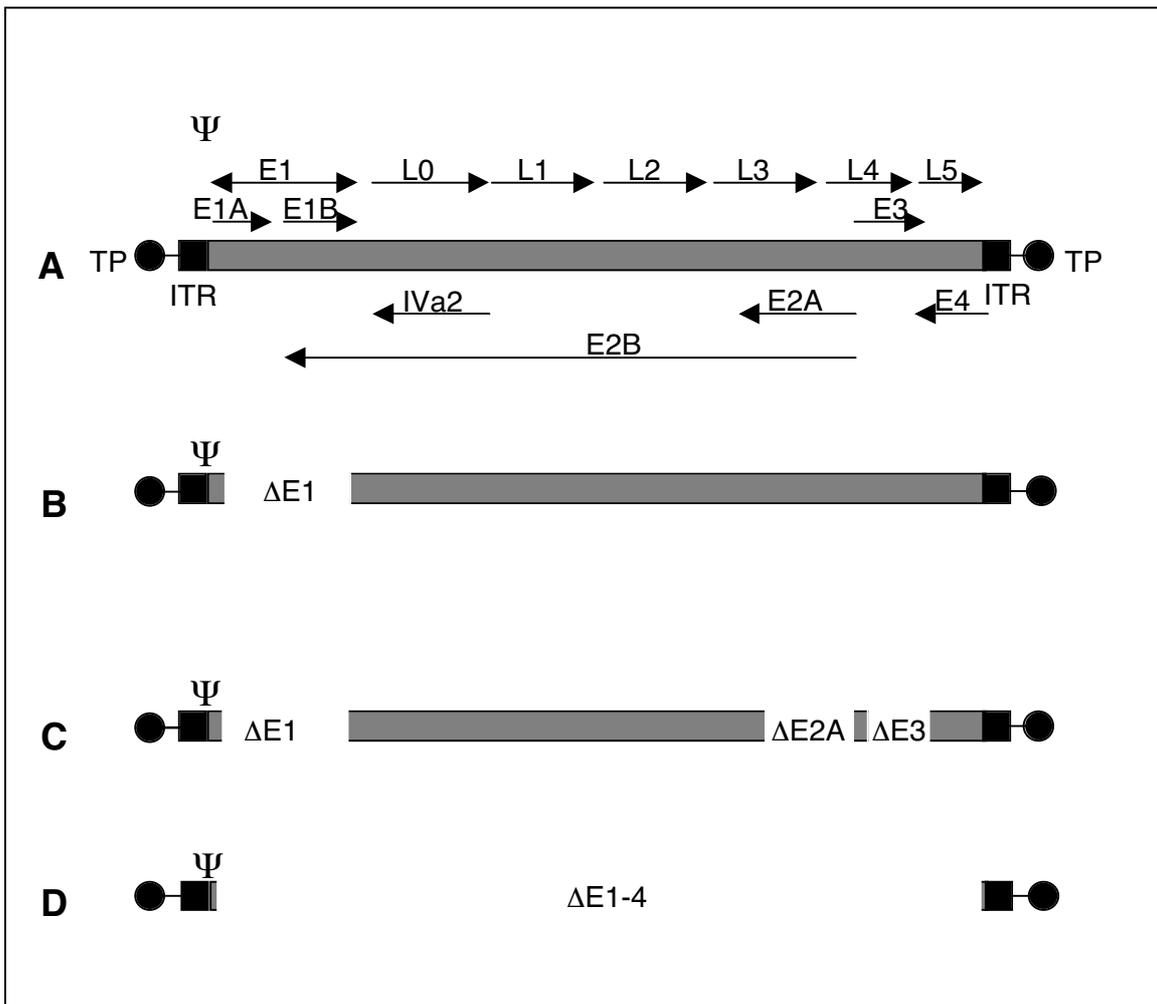


Fig. 11: Adenovirales Genom und adenovirale Vektoren (verändert nach Rooke et al., 2000). (A) Adenovirales Genom, die Transkriptionseinheiten sind durch Pfeile dargestellt. An den Enden befinden sich die ITRs und die terminalen Proteine. (B) Erstgenerationsvektor, nur die E1 Transkriptionseinheit wurde deletiert, an dieser Stelle ist der Einsatz einer Transgenkassette mit bis zu 6,5 kB möglich. (C) Zweit- und Drittgenerationsvektor, zusätzlich zu E1 wurde noch die E2A (Zweitgeneration) und die E3 (Drittgeneration, auch mehr Deletionen möglich) Transkriptionseinheit deletiert. (D) Hochkapazitäts „gutless“ Adenovirusvektor, es sind nur noch die ITRs und das Verpackungssignal an viraler Sequenz vorhanden. Diese Vektoren können Transgenkassetten mit bis zu 36 kB aufnehmen, müssen aber mit Hilfe eines Helfervirus verpackt werden.

Herstellung von Verpackungszelllinien, die alle notwendigen adenoviralen Genprodukte exprimieren, wegen der Toxizität einiger adenoviraler Proteine bisher nicht möglich ist (Kochanek et al., 2001; Sato et al., 2002). Diese Vektoren haben ein Verpackungslimit von 36 kB, benötigen allerdings eine minimale Verpackungsgröße von 28 kB. Werden kleinere Transgenkassetten verwendet, müssen zusätzliche Füllsequenzen, sog. „Stuffer-DNA“ in den Vektor integriert werden (Kochanek et al., 2001; Sato et al., 2002). Die Auswahl der Füllsequenzen ist kritisch für die Funktionalität des Vektors, da selbst Füllsequenzen, die keine regulatorischen Sequenzen enthalten, unter den jeweiligen Bedingungen die Transgenexpression empfindlich beeinflussen können (Kochanek et al., 2001; Schiedner et al., 2002). Des Weiteren können homologe Elemente in dem Vektor und dem Helfervirus oder der Verpackungszelle möglicherweise wegen der Rekombinationsgefahr die Stabilität der Vektoren beeinflussen (Kochanek et al., 2001; Sato et al., 2002). Die am meisten verbreiteten Füllsequenzen stammen aus dem humanen HPRT- (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) Locus (Kochanek et al., 2001; Schiedner et al., 2002). In den ersten Ansätzen wurden die HC-Ad Vektoren durch Transfektion des Vektorplasmids in E1 exprimierende Verpackungszellen (293) und Coinfektion mit einem E1 defizienten Helfervirus (Erstgenerationsvektor) verpackt, die viralen Proteine werden von dem Helfervirus zur Verfügung gestellt. Um eine Verpackung der Helferviren zu verhindern, wurden zuerst Helferviren mit einer Mutation im Verpackungssignal verwendet (Kochanek et al., 1996; Kochanek et al., 2001; Kreppel et al., 2002[b]). Inzwischen hat sich das Cre-loxP Verpackungssystem durchgesetzt, bei dem ein E1 deletiertes Helfervirus verwendet wird, dessen Verpackungssignal von loxP Erkennungssequenzen flankiert ist. In E1 exprimierenden Verpackungszellen, die die Cre Rekombinase (vom Bakteriophagen P1) exprimieren, wird das Verpackungssignal herausgeschnitten (Kochanek et al., 2001; Sato et al., 2002; Kreppel et al., 2002[b]). Dieses System zeichnet sich durch eine niedrigere Helferviruskontamination aus (0,1-0,01%) (Sato et al., 2002). Allerdings ist es bisher mit diesem System trotz Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation zur Aufreinigung nicht möglich, helfervirusfreie Vektoren zu produzieren. Damit können sehr hohe Titer, vergleichbar den Erstgenerationsvektoren, erreicht werden (Kochanek et al., 2001; Sato et al., 2002). Neuere Ansätze in der Verpackungstechnologie, die verbesserte Verpackungszellen und effizientere Aufreinigungen verwenden, ermöglichen es, die Helferviruskontamination zu senken und die Verpackungseffizienz weiter zu steigern

(Kreppel et al., 2002[b]). Inzwischen wurden Methoden etabliert, über Slot-Blot Titration den Anteil infektiöser HC-Ad Vektorenpartikel am Anteil der gesamten Partikel zu bestimmen (Kreppel et al., 2002 [b]). Dies ist eine für klinische Versuche unverzichtbare Technik, da nach gesetzlichen Vorschriften (FDA, USA) der Quotient aus gesamtem Partikeltiter und infektiösem Partikeltiter (inverse Bioaktivität) 30 nicht übersteigen darf (Kreppel et al., 2002 [b]). HC-Ad Vektoren wurden mit verschiedenen Transgenen *in vitro* und *in vivo* erfolgreich verwendet (Kochanek et al., 1996; Morsy et al., 1998; Kochanek et al., 2001, Kreppel et al., 2002 [a]) und werden bereits in klinischen Versuchen getestet (GenStar Therapeutics, USA) (Kochanek et al., 2001).

1.4.4 HC-Ad Hybridvektoren

Man verwendet Hybridvektoren, um die Vorteile zweier oder mehrerer viraler Vektorsysteme zu kombinieren und somit effizientere und sicherere Gentransfersysteme zu erhalten, die zielgewebsspezifisch infizieren und/oder bei denen die Transgenexpression zielgewebsspezifisch reguliert wird (Lam & Breakefield, 2000). HC-Ad Hybridvektoren wurden bereits als Adenovirus-Adeno-Assoziiertes Virus (Lam & Breakefield, 2000; Goncalves et al., 2001; Shayakmetov et al., 2002), Adenovirus-Retrotransposon (Soifer et al., 2001) und Adenovirus-Retrovirus (MuLV) (Feng et al., 1997; Murphy et al., 2002; Soifer et al., 2002) Hybridvektoren beschrieben. Im Fall der HC-Ad-AAV Vektoren wird der Vorteil des großen Adenovirus Verpackungslimits mit dem Vorteil der Möglichkeit von AAV, effizienter zu integrieren, kombiniert. Die Retrovirus- und Retrotransposon-HC-Ad Hybridvektoren kombinieren die Vorteile des hohen Adenovirus Verpackungslimits und die Möglichkeit, Adenoviren in hohen Titern herzustellen, mit der stabilen Integrationsfähigkeit der Retroviren, um eine stabile Genexpression in transduzierten Zellen zu erreichen. Die Adenovirus-Retrovirus Hybridvektoren ermöglichen die Integration zum einen über die Integration von MuLV LTRs flankierten zyklischen Transgenkassetten, die durch Rekombinaseaktivität in der adenoviralen Replikation entstehen und durch virale Integrase integriert werden (Murphy et al., 2002). Diese Möglichkeit besteht für Foamyviren nicht, da die FV Integrase solche zyklischen Genome nicht integrieren kann (Russell et al., 2002). Zum anderen werden auf dem HC-Ad Genom komplette replikationsfähige ecotrope MuLV Vektoren codiert (Soifer et al., 2002). Diese Vektoren funktionieren

relativ gut, bergen allerdings durch die Generation von replikationskompetentem Retrovirus Risiken in der Anwendung. Zur Kombination der Vorteile von Retroviren und Adenoviren wären HC-Ad-FV Hybridvektoren besonders geeignet, da FV apathogen sind und sich der intrazelluläre Replikationszyklus von FV (Heinkelein et al., 2000) für die Transgenintegration möglicherweise nutzen lässt.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Arbeit umfasst sowohl die Analyse der foamyviralen Penetration als auch die Konstruktion und Charakterisierung von Adenovirus-Foamyvirus Hybridvektoren.

Bei der Analyse der foamyviralen Penetration soll primär die Frage geklärt werden, ob FV den Eintrittsweg der direkten Fusion oder der rezeptorvermittelten Endocytose nutzen. Dabei steht die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der FV Infektion und der FV Env Fusionsaktivität im Vordergrund.

Bei der Konstruktion und Analyse von FV-Adenovirus Hybridvektoren sollen verschiedene FV-HC-Ad Hybridvektoren auf Adenovirus 5 Basis kloniert, produziert und analysiert werden. Die Hybridvektoren sollen die Vorteile von HC-Ad Vektoren, die in hohen Titern herstellbar sind und ein großes Verpackungslimit haben, mit den Vorteilen der FV Vektoren, die stabil integrieren und einen intrazellulären Replikationszyklus durchführen können, kombiniert werden. Die Funktionalität und Effizienz der Vektoren, hauptsächlich die Dauer und Effizienz der Transgenexpression und die Analyse der Integration, stehen hier im Vordergrund.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Material

Autoklav	Münchner Medizin
Bakterienkulturschüttler	Certomat, Braun
Blot Filterpapier	Whatman
Computer	Apple Macintosh
Chromatographiesäulen	Micro Biospin 30 SSC, BioRad MoBiTec 10 ml mit Amylose Resin (NEB)
Digitale Kamera	Leica
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammern	Hauswerkstatt
FACS	FACScan, Becton-Dickinson FACSVantage, Becton-Dickinson
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Gefrierschränke	Bosch, Revco
Geltrockenrahmen	Diversified Biotech
Graphitblotkammern	Hauswerkstatt
Heizblock	Thermostat 5320, Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Hybaid
Inkubatoren	Heraeus
Kapillarsequenzierer	ABI Prism 310, Perkin Elmer ABI Prism 3100, PE Applied Biosystems
Kühlschränke	Bosch
Laborwaage	Vibra
Magnetrührer	Assistent & Variomag
Mikrowellenherd	Sharp
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Nitrocellulose Membran	Hybond ECL, Amersham Pharmacia
Nylon Membran	Hybond XL, Amersham Pharmacia

pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
Pipettierhilfe	Pipetboy Plus, Technorama
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
Quarzküvetten	Helma
Röntgenfilme	X-ray Retina XBD, Fotochemische Werke GmbH
Spektralphotometer	Ultrospec III, Pharmacia
Sonifier (Ultraschall)	Branson
Sterilbank	Nuaire
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µM)	Millipore, Nalgene
Thermocycler	PE 480, Perkin Elmer Cetus PE 9600, Perkin Elmer T-Personal Kombi, Biometra
Umkehrmikroskope	Leica, Leitz
UV-Crosslinker	Stratalinker, Stratagene
UV-Handlampe	Bachhofer
UV-Leuchttisch/Videodrucker	MWG und Mitsubishi
Vortexer	GLW
Wasserbäder	IKA TER 2, MGW Lauda
Wippe	Hettich
Zentrifugen	
Tischzentrifuge	5417C, Eppendorf
Zellkulturzentrifuge	Rotana RPC, Hettich
Großzentrifuge	RC5C, Sorvall (Rotor Sorvall SS-34 und G-3)

2.1.2 Chemikalien

An dieser Stelle wird darauf verzichtet, alle für diese Arbeit eingesetzten Chemikalien einzeln aufzulisten. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Applichem, Darmstadt; ICN, USA; Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen; Serva, Heidelberg; Roth, Karlsruhe. Vereinzelt wurde Wert darauf gelegt, das Produkt eines bestimmten Herstellers zu verwenden. In diesem Fall ist der Hersteller gesondert vermerkt.

Chemikalien zur Inhibition viraler Eintrittswege

Ammoniumchlorid	(Sigma #A0171)	5 M	Stammlösung in PBS-
Bafilomycin A1	(Sigma #B1793)	25 µM	Stammlösung in DMSO
Chloroquin	(Appllichem #A2143)	250 mM	Stammlösung in PBS-
Concanamycin A	(Sigma #C9705)	20 µM	Stammlösung in DMSO
Nigericin	(Sigma #N7143)	10 mM	Stammlösung in EtOH

2.1.3 Radiochemikalien

α - ³² P dATP (10 mCi/ml)	Amersham, GB
---	--------------

2.1.4 Enzyme

CIAP (calf intestine alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
Klenow Polymerase	MBI Fermentas
Proteinase K	Roche
PWO Polymerase	Peqlab
Restriktionsenzyme	NEB, MBI-Fermentas, Roche
Ribonuklease A	Roche
T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	MBI-Fermentas
Taq Polymerase	Peqlab

2.1.5 Kits

ABI Prism Big Dye Kit	PCR Sequenzierung	PE Applied Biosystems
Dye Ex Kit	Sequenzierprobenaufreinigung	Qiagen
ECL Western Blot Detection Kit	Immunoblot Entwicklung	Amersham/Pharmacia
Fugene6	Transfektion	Roche
GeneClean III Kit	Gelextraktion	QBiogene
Mermaid Kit	Gelextraktion	QBiogene
PCR Optimizer Kit	PCR Optimierung	Invitrogen

Plasmid Maxiprep Kit	Plasmidpräparation	Qiagen
Polyfect	Transfektion	Qiagen
Prime it II Kit	Sondenmarkierung	Stratagene
Quikhyb	Hybridisierungslösung	Stratagene
Miracle Hyb	Hybridisierungslösung	Stratagene

2.1.6 Größen-/Längenstandards

Nukleinsäurelängenstandards

λ -HindIII Marker	MBI-Fermentas
1kB DNA Ladder	MBI-Fermentas
100 bp DNA Ladder	MBI-Fermentas

Proteingrößenstandards

RPN800 Rainbow Marker	Amersham
-----------------------	----------

2.1.7 Antibiotika und Cytostatika

	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 μ g/ml
Doxycyclin	1 mg/ml	1 μ g/ml
Kanamycin	125 mg/ml	125 μ g/ml
Zeocin	100 mg/ml	125 μ g/ml
Penicillin	100 mg/ml	100 μ g/ml
Streptavidin	100 mg/ml	100 μ g/ml

2.1.8 Bakterienstämme

E. Coli BL-21 Codon+ Arbeitsgruppe
(Proteinexpression zur Aufreinigung)

E. Coli DH5 α Arbeitsgruppe
(Transformation von Ligationsreaktionen)

<i>E. Coli GC 279</i>	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg (Präparation unmethylierter Plasmid DNA)
<i>E. Coli JM109</i>	Arbeitsgruppe (Maxipräparation von Plasmiden)
<i>E. Coli Top 10</i>	Arbeitsgruppe (Maxipräparation von Plasmiden)
<i>E. Coli XL-10 Gold</i>	Stratagene, ultrakompetent (Transformation sehr großer Plasmide (+25 kB))

2.1.9 Zelllinien

293	humane embryonale Nierenzelllinie, ATCC# CRL-1573
293T	293 Zelllinie, die SV-40 großes T-Antigen exprimiert (Du Bridge et al., 1987)
A549	humane Lungenepithelzelllinie, ATCC# CCL-185
BHK-21	Hamster-Nierenfibroblastenzelllinie, ATCC# CCL-10
BHK/LTR-LacZ	BHK-21 mit β -Galactosidase Expressionskassette unter Kontrolle eines FV U3 Promotors (Schmidt & Rethwilm, 1995)
HeLa	humane Cervixepithelzelllinie, ATCC# CCL-2
HT1080	humane Fibroblastenzelllinie, ATCC# CCL-121
HT1080 NLS-LacZ	HT-1080 Zellen, die stabil NLS- β -Galactosidase exprimieren (Pietschmann et al., 2000)
HuH7	humane Leberkarzinomzelllinie (Nakabayashi et al., 1982)
NIH 3T3	Maus-Fibroblastenzelllinie, ATCC# CRL-1658
XC	Ratten-Epithelzelllinie, ATCC# CCL-165

2.1.10 Antikörper/Antiseren

2.1.10.1 α Foamyvirus Antikörper/Antiseren

Maus α PFV Gag SGG1	Hybridomaüberstand	Heinkelein et al., 2002[a]
Maus α PFV IN 3E11	Hybridomaüberstand	Imrich et al., 2000
Maus α PFV RT 15E10	Hybridomaüberstand	Imrich et al., 2000

Kaninchen α PFV Gag 011	Polyklonales Serum	Hahn et al., 1994
Kaninchen α PFV Env SP	Polyklonales Serum	Lindemann et al., 2001

2.1.10.2 Sonstige Antikörper/Antiseren

Maus α human CD8 CY5	Monoklonaler Antikörper	Caltag
Maus IgG 2a CY5	Isotypkontrolle	Caltag
Maus α human β -Actin	Monoklonaler Antikörper	Sigma

2.1.10.3. Sekundäre Antikörper

Ziege α Maus IgG HRP	Dako
Schwein α Kaninchen IgG HRP	Dako

2.1.11 Plasmide

2.1.11.1 Retrovirale Vektoren

SFGhCD8	MuLV retroviraler Vektor mit hCD8 Expressionskassette (EXK) (D. Lindemann)
pczCFG2fEGN	MuLV retroviraler Vektor mit EGFP EXK (Lindemann et al., 2001)
pczCFG2NLS-LacZ	MuLV retroviraler Vektor mit NLS-LacZ EXK (Pietschmann et al., 2000)
pczCFG5IZ	MuLV retroviraler Vektor mit IRES und zeo (A. Berg)
pMH87	PFV Vektor mit Gag/Pol/Env und EGFP EXK, die FV Vektorkassette wird von <i>PmeI</i> Schnittstellen flankiert (M. Heinkelein)
pMH88	PFV Vektor mit Gag/Pol und EGFP EXK, die FV Vektorkassette wird von <i>PmeI</i> Schnittstellen flankiert (M. Heinkelein)
pMH89	pMH88 mit pol ATG zu CTG Mutation zur Inaktivierung der pol Transkription (M. Heinkelein)

pMH91	pMH88 mit ([D, 56D, 35E] zu [D, 56A, 35E]) Mutation des konservierten katalytischen Zentrums der Integrase zur Inaktivierung der Integraseaktivität (M. Heinkelein)
pMH118	PFV Vektor mit Gag/Pol und EGFP EXK in Vektor (Leurs et al., 2003)
pMH120	wie pMH118, enthält aber anstatt einer EGFP eine NLS- β -Galactosidase EXK (M. Heinkelein)

2.1.11.2 Adenovirale Vektoren

pSTK68	Adenovirus 5 HC-Ad Vektor mit 16054 bp huHPRT Stuffer-DNA (S. Kochanek)
pSTK134	Adenovirus 5 HC-Ad Vektor mit 19952 bp huHPRT Stuffer-DNA (S. Kochanek)

2.1.11.3 Expressionsplasmide

pCDNA3.1zeo	Expressionsvektor mit SV-40 ori und CMV Promotor, Zeocin Resistenz (Invitrogen)
pcgp-1	PFV Gag/Pol Expressionsplasmid (Fischer et al., 1998)
pciEFVenv	EFV Env EXK in pci Vektor (Picard-Maureau et al., 2003)
pciSFV-1env SM01	pci Vektor mit chimärem SFV-1 Env, As 1-59 von FFV Env (Picard-Maureau et al., 2003)
pcpol-2	PFV Pol Expressionsplasmid (Heinkelein et al., 1998)
pczBFVenv	pCDNA3.1zeo mit BFV Env EXK (Picard-Maureau et al., 2003)
pczFFVenv	pCDNA3.1zeo mit FFV Env EXK (Picard-Maureau et al., 2003)
pczHFVenv EM02	pCDNA3.1zeo mit PFV Env EXK ohne SD/SA (Lindemann & Rethwilm, 1998)
pczHFVenv EM64	pCDNA3.1zeo mit chimärer PFV Env EXK, AA 1-59 von FFV Env (Jarmy et al., 2003)

pczHFVenv Δ 2MuLV	pCDNA3.1zeo mit chimärer PFV Env EXK, cytoplasmatische Domäne gegen MuLV Env cytoplasmatische Domäne ausgetauscht (Lindemann et al., 1997)
pczSFV-1env	pCDNA3.1zeo mit SFV-1env EXK (Picard-Maureau et al., 2003)
pczVSV-G	pCDNA3.1zeo mit VSV-G EXK (Pietschmann et al., 1999)
pcziMEA	MuLV-A EXK in pczi (pCDNA mit CMV A Intron) Vektor (Picard-Maureau et al., 2003)
pcziMEAR-	pcziMEA mit Stopcodon an Position 638, R-Peptid wird deshalb nicht exprimiert (Picard-Maureau et al., 2003)
pHIT60	MuLV Gag/Pol Expressionsplasmid (Soneoka et al., 1995)
pHIT456	MuLV-A Env Expressionsplasmid (Soneoka et al., 1995)
pMal-C2	MBP-Fusionsprotein Expressionskonstrukt (NEB)
pSG5EFVenv	pSG5 Vektorplasmid mit EFV Env EXK (Lecellier et al., 2002)

2.1.12 Oligonukleotide

#312	5'aattagcattattagcaatgttttctg 3'	PFV env 7665 antisense
#394	5'taaatataagaataaccaagagaa 3'	PFV env SA antisense
#406	5'aggcacagtcgaggctgat 3'	pcDNA3.1zeo MCS antisense
#487	5'cactgcttactggcttatcg 3'	pcDNA3.1zeo CMV Promotor sense
#879	5'gacatctggccagcagctgccagactttaagtaag 3'	EFV env mut. antisense
#880	5'agagctgctagccaaataatatccgaataataa 3'	EFV env mut. sense
CFG IRES	5'cttcggccagtaacgtagg 3'	IRES start antisense
D504	5'gcaaagaaaaggggcactgggcta 3'	MuLV gag sense
M13 FWD	5'gtttcccagtcacgacgttgta 3'	M13 Universal sense
M13 REV	5'tgtgagcggataacaatttc 3'	M13 Universal antisense

2.1.13 Puffer und Lösungen

2.1.13.1 Bakterienkultur

5x LB+ Medium

LB Broth Base Lennox L	100 g	(Invitrogen #12780-029; enthält 50 g Pepton, 25 g Hefeextrakt und 25 g NaCl)
α -D Glucose	5 g	
H ₂ O	ad 1000 ml, autoklavieren.	

LB Agar

LB Broth Base Lennox L	20 g
Agar	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml, autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren wird vor dem Gießen der Agarplatten das jeweilige Antibiotikum bei einer Agartemperatur unter 60°C zugegeben.

NZY+ Medium

NZ Amine (Casein Hydrolysat)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren.

Vor Benutzung 12,5 ml 1 M MgCl₂, 12,5 ml 1 M MgSO₄ und 10 ml 2 M Glucose zugeben.

2.1.13.2 Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA

50x TAE	Tris pH 8,0	2 M
	Konz. Essigsäure	5,71 %
	EDTA pH 8,0	50 mM

Material und Methoden

6x DNA Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylencyanol	0,25 %
	Glycerin	30 %
3M Natriumacetat pH 5,2	Natriumacetat	3M
	pH 5,2 mit konz. Essigsäure einstellen, autoklavieren.	
Transformationspuffer I	Kaliumacetat	30 mM
	RbCl ₂	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	MnCl ₂	50 mM
	Glycerin	15 %
	pH 5,8 mit 10% Essigsäure einstellen, 0,2 µM sterilfiltrieren.	
Transformationspuffer II	MOPS	10 mM
	RbCl ₂	100 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin	15 %
	pH 6,5 mit 1 M KOH einstellen, 0,2 µM sterilfiltrieren.	
Plasmidpräparationslösung I	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
	Lösung bei 4°C lagern.	
Plasmidpräparationslösung II	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %
Plasmidpräparationslösung III	Kaliumacetat	3 M
	pH 4,8 durch Zugabe von konz. Essigsäure einstellen.	

Material und Methoden

Lysispuffer für DNA-Präparation aus eukaryotischen Zellen	Tris-HCl pH 8,5	100 mM
	EDTA	5 mM
	SDS	0,2 %
	NaCl	200 mM
	Direkt vor Gebrauch Proteinase K ad 200 µg/ml zugeben.	
1 M KOH	KOH	1 M
	KOH Plätzchen in H ₂ O lösen.	
1 M Tris-HCl pH 7,5	Tris	1 M
	pH 7,5 mit konz. HCl einstellen.	
20xSSC	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0,3 M

2.1.13.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

RIPA Puffer	Tris-HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	300 mM
	Natrium-Deoxycholat	1 %
	Triton X-100	1 %
	SDS	0,1 %
Lagerung bei 4°C.		
Lysispuffer für Zelllysate	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	NaCl	140 mM
	NaN ₃	0,025 %
	Triton X-100	1 %
	Lagerung bei 4°C, Proteaseinhibitoren vor Gebrauch zugeben.	

Material und Methoden

2x Probenpuffer für Proteinproben	Tris-HCl pH 6,8	125 mM
	SDS	4 %
	Glycerin	20 %
	β-Mercaptoethanol	10 %
	Bromphenolblau	0,1 %
Tricine Gel Puffer	Tris-HCl pH 8,45	3 M
	SDS	0,3 %
10x Anoden Puffer	Tris-HCl pH 8,9	2 M
5x Kathoden Puffer	Tris	500 mM
	Tricine	500 mM
	SDS	0,5 %
Säulenpuffer	Tris-HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM
	Lagerung bei 4°C.	
Elutionspuffer	Säulenpuffer mit	
	Maltose (D+ Monohydrat)	10 mM
100 mM IPTG	100 mM in H ₂ O ansetzen, bei -20°C lagern.	
Coomassie Stain	Coomassie Brilliant Blue	0,25 %
	Methanol	45 %
	Essigsäure	10 %
Coomassie Destain	Methanol	45 %
	Essigsäure	10 %

Material und Methoden

Gel-Trocknungspuffer	Ethanol	20 %
	Glycerin	10 %
Blotpuffer	Tris	50 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	0,037 %
	Methanol	20 %
PBS Tween (PBST)	PBS mit	
	Tween 20	0,5 %

2.1.13.4 Zellkultur

MEM (Minimal Essential Medium)	MEM (9,6 g/l, Invitrogen #41500-83; 2,2 g/l NaHCO ₃)	
	FCS (Biochrom, Berlin)	5% - 10%
	Glutamin	0,01%
	Penicillin/Streptomycin	120 mg/l
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	DMEM (High Glucose, Invitrogen #41966-29)	
	FCS (Biochrom, Berlin)	5% - 10%
	Penicillin/Streptomycin	120 mg/l
ATV	NaCl	137 mM
	KCl	5,4 mM
	D-Glucose	5 mM
	NaHCO ₃	70 mM
	Trypsin	500 mg/l
	Versene	200 mg/l
Einfriermedium	FCS mit	
	DMSO (Sigma #D2650)	10 %

2.1.13.5 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

2xHBS	Hepes, pH 7,05	50 mM
	KCl	10 mM
	Dextrose	12 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 ml
	3 Aliquots mit pH 7,0, 7,05 und 7,1 herstellen, Effizienz testen. 0,2 µM sterilfiltrieren, bei -20°C lagern.	
2M CaCl ₂	CaCl ₂ (Sigma, cell culture grade) 2M	0,22 µM sterilfiltrieren, bei -20°C lagern.
Natriumbutyrat	PBS- mit	
	Natriumbutyrat	500 mM
0,22 µM sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.		
Polybrene	PBS- mit	
	Hexadimethrinbromid (Sigma)	800 µg/ml
0,22 µM sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.		
FACS Puffer	PBS mit	
	BSA	0,1 %
	Natriumazid	0,05 %
FACS Fixierlösung	PBS mit	
	Formaldehyd	2 %
LacZ Fixierlösung	PBS- mit	
	Formaldehyd	2 %
	Glutaraldehyd	0,2 %

LacZ Färbelösung	PBS- mit	
	$K_3 Fe(CN)_6$	4 mM
	$K_4 Fe(CN)_6$	4 mM
	$MgCl_2$	2 mM
	X-Gal	0,4 mg/ml

2.1.13.6 Standardlösungen und Puffer

PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na_2HPO_4	4,3 mM
	KH_2PO_4	1,4 mM
	$CaCl_2$	1,5 mM
	$MgCl_2$	1 mM

PBS-	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na_2HPO_4	4,3 mM
	KH_2PO_4	1,4 mM

TBS	Tris-HCl pH 7,4	25 mM
	KCl	1 mM
	NaCl	150 mM

TE pH 8,0	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA Agarosegelelektrophorese

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.2)

DNA Fragmente werden in einem Agarosegel, an dem eine elektrische Spannung anliegt, der Größe nach aufgetrennt. Der Auftrennungsbereich von Agarosegelen ist abhängig von der Agarosekonzentration: Für sehr kleine DNA Fragmente wurden hochprozentige Gele (bis 3%) verwendet, für sehr große Fragmente niedrigprozentige (bis 0,6%). Die Agarose wurde eingewogen, in TAE-Puffer aufgekocht und kurz vor dem Gießen (ca. 60°C Lösungstemperatur) mit 2 µl/100 ml einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt. Die DNA Proben wurden in 1x DNA Probenpuffer in die Taschen des Gels geladen und in einer mit TAE gefüllten Kammer unter Anlegen einer Spannung von 20-200 V aufgetrennt. Die DNA läuft aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Kathode. Sie kann im Gel unter UV Licht sichtbar gemacht werden, da der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid fluoresziert.

2.2.1.2 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA Fragmente können unter schwacher UV-Beleuchtung ausgeschnitten und mit dem QBiogene GeneClean III Kit (bei Fragmenten über 200 bp) oder dem QBiogene Mermaid Kit (bei Fragmenten unter 200 bp) aus der Agarose eluiert werden. Bei der Anwendung jeden Kits wurde die Agarose in einem Hochsalzpuffer geschmolzen, die DNA an Glasmilch gebunden und mit Ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die an Glaspartikel gebundene DNA getrocknet und in H₂O eluiert.

2.2.1.3 Spektrometrische Bestimmung der DNA Konzentration

Zur Bestimmung der DNA Konzentration wird die Extinktion einer wässrigen DNA Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Wellenlänge, bei der DNA Licht am stärksten absorbiert) gemessen. Eine OD-Einheit entspricht 50 µg/ml dsDNA bzw. 40

$\mu\text{g/ml}$ ssDNA oder $35 \mu\text{g/ml}$ RNA. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm Wellenlänge gemessen, da auch andere Moleküle bei 260 nm absorbieren (Phenol, Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten). Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad. Für saubere DNA sollte er zwischen 1,7 und 2,0 liegen, höhere oder niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen hin.

2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA in den vom Hersteller angegebenen Puffern sequenzspezifisch, die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym ist meist eine palindromische Sequenz. Die DNA wird entweder an den komplementären Strängen um mehrere Nukleotide versetzt gespalten, so dass einzelne 3' oder 5' Überhänge entstehen (klebrige Enden), oder beide Stränge werden an derselben Stelle getrennt, so dass Enden ohne Überhang entstehen (stumpfe Enden). Restriktionsspaltungen wurden analytisch zur Überprüfung von DNA durchgeführt oder präparativ zur Klonierung bzw. Herstellung von Sonden für Hybridisierungen.

	analytisch	präparativ
DNA	0,2 – 1 μg	2-5 μg
10x Puffer	2 μl	5 μl
Enzym	5 U	10 – 20 U
BSA	nach Angabe des Herstellers	
H ₂ O	ad 20 μl	ad 50 μl

Eine Enzymeinheit (1U) ist definiert als die Menge des Enzyms, die benötigt wird, um unter optimalen Bedingungen in 1 h ein μg λ -DNA zu verdauen.

Der Verdau wurde 1,5 h bis über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Um die Religation von DNA Fragmenten nach einem Restriktionsverdau in einer Ligationsreaktion zu verhindern, wird das linearisierte Vektorfragment an den 5' Enden

mit dem Enzym Alkalische Kälberdarmphosphatase (CIAP, „calf intestine alkaline phosphatase“) dephosphoryliert. Nach dem Restriktionsverdau wurden 10 U des Enzyms, das in den meisten gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, zugegeben und die Reaktion wurde für 1 h bei 37°C ausgeführt. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase durch Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 5 mM und durch Inkubation für 10 min bei 75°C inaktiviert.

2.2.1.6 Phosphorylierung von DNA Fragmenten

PCR Produkte, die mit PWO Polymerase hergestellt wurden, haben keine einzelsträngigen Überhänge und keine 5´ Phosphatgruppen an den Enden. Um diese DNA Fragmente mit solchen zu ligieren, die auch keine 5´ Phosphatgruppen an den Enden besitzen (dephosphorylierte Vektorfragmente, andere PCR-Produkte), werden die 5´ Enden durch die T4 Polynukleotid Kinase ATP-abhängig phosphoryliert.

Reaktionsansatz:	100 ng - 1µg	DNA
	2 µl	10 mM ATP
	2 µl	10x T4 Polynukleotid Kinase Puffer
	1 µl (5 U)	T4 Polynukleotid Kinase
	H ₂ O ad 20 µl	

Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C ausgeführt.

2.2.1.7 Auffüllen von DNA 5´ Überhängen mit Klenow Polymerase

Mit Klenow Polymerase (großes Fragment der E. Coli DNA Polymerase I) können DNA-Enden mit 5´ Überhängen aufgefüllt werden. Die 5´- 3´ Polymerase Aktivität des Enzyms füllt mit im Reaktionsansatz vorhandenen dNTPs die rezessiven Enden auf. Das entstehende stumpfe DNA Ende kann mit einem anderem stumpfen DNA Ende ligiert werden.

Reaktionsansatz:	1 - 5 µg	DNA
	5 µl	10 mM dNTP's
	5 µl	10x Klenow Polymerase Puffer
	1 µl (10 U)	Klenow Polymerase
	H ₂ O ad 50 µl	

Die Reaktion wurde auf Eis angesetzt, 5 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 37°C ausgeführt. Anschließend wurde die Klenow Polymerase durch 20 min Inkubation bei 75°C inaktiviert.

2.2.1.8 Präzipitation von DNA

Zur Aufkonzentrierung oder Entsalzung von DNA Lösungen wird die DNA mit Ethanol oder Isopropanol aus der wässrigen Lösung gefällt. Dabei entzieht Ethanol oder Isopropanol in Verbindung mit erhöhter Salzkonzentration den DNA Molekülen die Hydrathülle, was zu deren Aggregation und Präzipitation führt. Der DNA Lösung wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol oder 0,6 Volumen Isopropanol zugeben. Anschließend wurde durch Schütteln gut gemischt und mindestens 15 min bei RT zentrifugiert (14T rpm Tischzentrifuge, 17T rpm Sorvall SS34). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in der gewünschten Menge H₂O aufgenommen.

2.2.1.9 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA

Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen aus wässrigen DNA Lösungen wird DNA-Lösung mit Phenol und Chloroform extrahiert. Proteinverunreinigungen sammeln sich in der organischen Phase und der Interphase, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben.

- Zugabe von einem Volumen Phenol, vortexen
- 4 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14T rpm; Sorvall SS34 17T rpm)
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), vortexen
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14T rpm; Sorvall SS34 17T rpm)

- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von einem Volumen Chloroform, vortexen.
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14T rpm; Sorvall SS34 17T rpm)
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen

Durch eine anschließende Alkoholfällung entfernt man Phenolreste aus der Lösung.

2.2.1.10 Ligation von linearen DNA Fragmenten

DNA Fragmente werden miteinander durch den Aufbau von Phosphordiesterbindungen zwischen dem 3' OH-Ende eines Fragments und dem 5' Phosphatende des anderen Fragments verknüpft. Diese Reaktion wird von einer Ligase ATP-abhängig katalysiert. Dazu müssen die DNA Enden entweder komplementäre einzelsträngige Überhänge (klebrige Enden) oder keine Überhänge (stumpfe Enden) haben. In der Reaktion wurde normalerweise ein molares Verhältnis von 1:3 Vektor: Insert verwendet.

	Standardligation	Quickligation
T4 DNA Ligasepuffer	2 µl	2 µl
DNA	100 – 500 ng	100 – 500 ng
T4 DNA Ligase	1,5 µl (7,5 WU)	2 µl (10 WU)
ATP (10 mM)	-	2 µl
Polyethylenglykol 4000 (50%)	-	3 µl
H ₂ O	ad 20 µl	ad 20 µl

Eine Weiss Unit (WU) entspricht 200 Kohäsive-Enden-Ligationseinheiten. Eine Kohäsive-Enden-Ligationseinheit ist die Menge Enzym, die zur 50% Ligation von *HindIII* verdauten λ -DNA Fragmenten mit einer 5' Enden Konzentration von 0,12 µM in 30 min bei 16°C in 20 µl Volumen benötigt wird.

Die Standardligation wurde über Nacht bei 14°C ausgeführt, während die Quickligation 10 min bei 25°C ausgeführt wurde.

2.2.1.11 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurden mit dem Applied Biosystems Ampli Taq Big Dye Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Dabei werden in

Erreichen der Plateauphase exponentiell an. Durch die Verwendung von Oligonukleotiden, die am 5' Ende nicht komplementäre Sequenzen zur Matrize enthalten (mutagene Primer), können Mutationen in das gewünschte Produkt eingeführt werden. Die Spezifität der Reaktion ist von der Stringenz der Primerbindung abhängig, die ihrerseits von der Hybridisierungstemperatur (HT) und der Salzkonzentration in der Reaktion abhängt. Die Auswahl der thermostabilen Polymerase beeinflusst Qualität und Quantität des spezifischen Produktes. Für analytische PCR-Reaktionen wurde Taq Polymerase verwendet, die eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit (2800 Nukleotide/min), jedoch keine Korrekturaktivität (proofreading activity) aufweist. Damit können amplifizierte Produkte in größerer Quantität, jedoch in geringerer Qualität wegen einer größeren Anzahl an falsch eingebauten Nukleotiden hergestellt werden. Für präparative PCR-Reaktionen, deren Produkte zur Klonierung eingesetzt wurden, wurde PWO Polymerase verwendet, die zwar eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit (ca. 600 Nukleotide/min) aufweist, jedoch über eine Korrekturaktivität verfügt. Mit PWO Polymerase hergestellte Amplikons werden in geringerer Quantität, jedoch höherer Qualität (etwa 10x geringere Fehlerrate als ohne Korrekturaktivität) hergestellt. Für die Amplifizierung längerer Sequenzen (3000 bis 10000 bp) haben sich Polymerasemischungen bewährt, für long PCR (größer als 5 Kb) z.B. 11:1 Taq Polymerase:PWO Polymerase.

Reaktionsansatz:	Taq	PWO
Plasmid DNA oder gen. DNA	200/500 ng	200/500 ng
Primer sense	30-50 pMol	50-100 pMol
Primer antisense	30-50 pMol	50-100 pMol
Puffer (10x)	5 µl Taq komplett	5 µl PWO komplett
10 mM dNTP Mix (Roth)	1 µl	1,75 µl
Polymerase	2,5 U Taq	2 U PWO
H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Reaktionen wurden auf Eis angesetzt, um falsche Primerbindung (missprime) zu vermeiden. Die Reaktionen wurden in 0,2 ml Dünnwand-Reaktionsgefäßen in einem Biometra T-Personal Kombi Cycler oder einem Perkin Elmer 9600 Cycler mit Heizdeckel durchgeführt. Zur Vermeidung von falschen Primerbindungen wurden die Re-

aktionsgefäße direkt vom Eis in den 95°C heißen Heizblock des Thermocyclers überführt (cold start).

PCR Programm für Plasmid DNA Matrize:

95°C	30 sec	(Denaturierung)
(HT)	40 sec	(Hybridisierung)
72°C	(Taq: 1000 bp/1 min; PWO: 500 bp/1 min)	(Elongation)
25 Zyklen insgesamt		

PCR Programm für genomische DNA Matrize

95°C	2 min	(Denaturierung)
95°C	30 sec	(Denaturierung)
(HT)	40 sec	(Hybridisierung)
72°C	(Taq: 1000 bp/1 min; PWO: 500 bp/1 min)	(Elongation)
35 Zyklen insgesamt, der erste Denaturierungsschritt wurde nur einmal ausgeführt.		

PCR-Produkte können durch Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung oder durch Bindung an Glasmilch mit anschließender Waschung für die weitere Verwendung aufgereinigt werden.

2.2.1.13 Herstellung von transformationskompetenten E. Coli Bakterien

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.2)

Bei der chemischen Transformation werden Bakterien, die einer eiskalten CaCl₂/RbCl₂ ausgesetzt waren, in einen Zustand der Kompetenz versetzt, der sie in die Lage bringt, mit großer Effizienz Plasmid DNA aufzunehmen.

- 5 ml Bakterienkultur in LB Medium über Nacht 37°C, 200 rpm
- 100 ml LB Medium mit 1 ml Übernachtskultur animpfen
- bis zu einer OD₅₉₅ von 0,2 bis 0,3 bei 37°C, 200 rpm kultivieren
- Bakterienkultur 5 min auf Eis inkubieren
- bei 4°C 10 min 2500 rpm (Hettich Zentrifuge) pelletieren

- Überstand verwerfen, Pellet in 8 ml Transformationspuffer I aufnehmen
- bei 4°C 10 min 2500 rpm (Hettich Zentrifuge) pelletieren
- Überstand verwerfen, Pellet in 2 ml Transformationspuffer II aufnehmen
- 15 min auf Eis inkubieren, Aliquots der Bakterienlösung in flüssigem Stickstoff blitzfrieren, bei -80°C lagern

2.2.1.14 Transformation von Plasmiden in E. Coli Bakterien

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.1)

Bei der Transformation werden Plasmide in kompetente Bakterien aufgenommen, meist mit dem Ziel der Plasmidvermehrung oder der prokaryotischen Proteinexpression. Man unterscheidet zwischen chemischer Transformation, bei der die Bakterien mittels chemischer Behandlung für Plasmidaufnahme kompetent werden (2.2.1.13) und die Plasmide mit Hilfe eines Hitzeschocks aufnehmen, und der Elektroporation, bei der die elektrokompenten Bakterien mit Hilfe eines elektrischen Pulses poriert werden und Plasmide aufnehmen. In dieser Arbeit wurde nur chemische Transformation verwendet.

- Bakterien auf Eis auftauen
- zu 100 µl Bakteriensuspension 20-200 ng DNA zugeben, vorsichtig rühren
- 30 min auf Eis inkubieren, 90 sec bei 42°C inkubieren (Hitzeschock)
- 5 min auf Eis inkubieren, 1 ml NZY+ Medium zugeben
- 1h bei 37°C inkubieren (schütteln), 3 min bei 2,5T rpm pelletieren (Tischzentrifuge)
- Überstand bis auf 100 µl abnehmen, Pellet resuspendieren
- Bakterien auf LB-Agar Platten (mglw. mit nötigem Antibiotikum) ausplattieren

Für Umtransformationen (Transformation von präparierter Plasmid DNA in Bakterien zum Zweck der Anzucht) wurde die Quicktransformation (Pope & Kent, 1996) verwendet.

- Bakterien auf Eis auftauen
- Zu 50 µl Bakteriensuspension 0,5 µg Plasmid DNA zugeben, vorsichtig rühren

- 5 min auf Eis inkubieren
- Bakterien auf eine auf 37°C vorgewärmte LB-Agar Platte ausplattieren

2.2.1.15 Plasmidpräparation aus E. Coli Bakterien durch alkalische Lyse

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.1 und 2.1.13.2)

Die Präparation kleiner (Minipräp) Plasmid DNA Mengen zu analytischen Zwecken und großer (Maxipräp) Plasmid DNA Mengen zu präparativen Zwecken aus Bakterien wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt (Birnboim & Doley, 1979). Dabei wird die Bakteriensuspension abzentrifugiert und das Pellet in einem RNaseA-haltigen Puffer resuspendiert. Die Bakterien werden mit NaOH/SDS Lösung lysiert. Dabei führen die alkalischen Bedingungen zur Denaturierung der bakteriellen Proteine, der chromosomalen DNA und auch der Plasmid DNA. Bei der anschließenden Neutralisierung mit 3 M Kaliumacetat Lösung präzipitieren bakterielle Proteine und Zelltrümmer mit der chromosomalen DNA, während die Plasmid DNA in renaturierter Form in Lösung bleibt und isoliert werden kann. Die bakterielle RNA wird durch die beigefügte RNase A verdaut und verbleibt bei einer anschließenden Isopropanolfällung größtenteils in Lösung, da Isopropanol RNA unter den verwendeten Bedingungen wenig effizient fällt.

Für Maxipräp-Präparationen von unmethylierten Plasmiden aus *E. Coli GC279* Bakterien wurde aus Gründen höherer DNA Stabilität das Qiagen Maxipräp Kit verwendet, bei dem zur Plasmidaufreinigung nach alkalischer Lyse eine Anionentauschersäule verwendet wird. Auch zur Präparation von Plasmiden zur Polyfect-Transfektion wurde aus Gründen höherer DNA Reinheit das Qiagen Maxipräp Kit verwendet.

	Maxipräp	Minipräp
• Übernacht-Bakterienkultur abzentrifugieren	100 ml	1,5 ml
• Bakterienpellet in Lösung 1 resuspendieren	5 ml	100 µl
• RNase A (10 mg/ml) zugeben	30 µl	3 µl
• Mischen, 5 min auf Eis inkubieren		
• Lösung 2 zugeben (Lyse)	5 ml	100 µl
• Invertieren, 5 min auf Eis inkubieren		
• Lösung 3 zugeben (Renaturierung)	10 ml	200 µl
• Invertieren, 5 min auf Eis inkubieren		

- 15 min bei hoher Drehzahl zentrifugieren
- Überstand in neues Röhrchen überführen 19 ml 350 µl
(bei Maxipräp durch Gaze filtrieren)
- 0,6 Volumen Isopropanol zugeben 12 ml 220 µl
- Mischen, 30 min bei hoher Drehzahl zentrifugieren
- Pellet in 70% Ethanol waschen 10 ml 200 µl
- Pellet trocknen, in H₂O resuspendieren 1 ml 50 µl

Nur Maxipräp

- Zugabe von RNaseA (10 mg/ml) 5 µl
- Verdau bei 37°C für 1 h
- Phenol-Extraktion 900 µl
- Phenol-Chloroform-Extraktion 900 µl
- Chloroform-Extraktion 900 µl
- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat 100 µl
- Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol 600 µl
- Mischen, 30 min bei hoher Drehzahl zentrifugieren
- Pellet in 70% Ethanol waschen 500 µl
- Pellet trocknen, in H₂O resuspendieren 250 µl

2.2.1.16 Präparation genomischer DNA aus Kulturzellen

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.2)

Zur Präparation von genomischer DNA aus Kulturzellen wurden die Zellen in SDS-haltigem Lysispuffer abgelöst und über Nacht mit Proteinase K verdaut. Die DNA wurde mit Isopropanol ausgefällt, mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette abgenommen, mit 70% Ethanol gewaschen und in 0,1x TE resuspendiert. Die auf diesem Weg gewonnene genomische DNA hat keinen hohen Reinheitsgrad und enthält zelluläre RNA. Genomische DNA dieser Qualität ist für Southern Blot Analysen jedoch ausreichend. Um die Reinheit zu erhöhen, kann eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt werden; um die RNA zu entfernen, kann ein RNaseA Verdau mit anschließender Isopropanol-Fällung durchgeführt werden.

- Zellkulturmedium abnehmen, 1x mit PBS waschen
- DNA Lysis Puffer zugeben (1/1,5/3,0 ml für 6-well Platten/6 cm Schalen/15 cm Schalen), für 1-2 min bei RT inkubieren
- Zellen durch leichtes Schütteln ablösen, in 15 ml Röhrchen überführen
- Inkubation über Nacht bei 56°C/leichtem Schütteln
- Zugabe von 1 Volumen Isopropanol, invertieren, DNA mit zugeschmolzener Pasteurpipette abnehmen
- DNA in 70% Ethanol waschen, kurz trocknen (1-2 min), in 50-300 µl 0,1x TE geben
- DNA über Nacht bei 56°C/leichtem Schütteln resuspendieren
- Genomische DNA wird bei 4°C gelagert

2.2.1.17 Präparation genomischer DNA aus Adenoviren

Zum Reaktionsansatz wurden 100-150 µl Virusstock mit einem Titer von $\approx 10^{10}$ iU/ml verwendet. Das Virus wurde mit 200 µl 1xTE, 30 µl 10% SDS, 30 µl 200 mg/ml Proteinase K und 15 µl 0,5 M EDTA versetzt. Der Proteinase K Verdau fand über Nacht bei 37°C statt, anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.1.9) und eine Ethanol-fällung (2.2.1.8) durchgeführt. Die virale DNA wurde in 20 µl 0,1x TE aufgenommen, die durchschnittliche Konzentration lag bei 2 ng/µl.

2.2.1.18 Southern Blot

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.2)

Bei der Southern Blot Analyse werden DNA Sequenzen mit Hilfe einer markierten DNA- oder RNA-Sonde nachgewiesen. In der hier verwendeten Methode wurde Restriktionsenzym verdaute DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, alkalisch denaturiert, mittels eines Southern Blot (Blot von DNA auf eine Membran) auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und durch UV Crosslink (UV Bestrahlung mit 1200 J/cm^2) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde dann in einer Hybridisierungsröhre vorhybridisiert. Im Random Prime Verfahren wurde in vitro mittels dem Exo(-) Fragment der Klenow Polymerase von einer mit Zufalls Neunmer-Oligonukleotiden hybridisierten Matrize eine Sonde generiert. Die Sonde wurde mit $\alpha^{32}\text{P}$ dATP markiert. Die DNA-Sonde wurde denaturiert und mit der auf der Membran fixierten

denaturierten DNA hybridisiert. Die Banden, an denen die Sonde hybridisiert ist, konnten mittels Autoradiographie dargestellt werden.

Mit Hilfe dieser Methode wurden in dieser Arbeit retrovirale Integrate in genomischer DNA analysiert.

Restriktionsverdau

50 µl Ansatz mit 10 µg DNA und 20 U Enzym über Nacht.

Gelelektrophorese

- Beladung eines 0,8 % Agarosegels in TAE Puffer
- Lauf über Nacht bei 25-30 V (frischer Puffer, Kammer reinigen)

Southern Blot

- Gel photographieren
- Gel in 1 M KOH (Denaturierung) für 1h auf Schüttler inkubieren
- KOH abkippen, Gel kurz mit 1M Tris-HCl pH 7,5 waschen
- Gel in 1 M Tris-HCl pH 7,5 (Renaturierung) für 2x 10 min auf Schüttler inkubieren
- Gel in 6x SSC (Äquilibrierung) für 10 min auf Schüttler inkubieren

Blotaufbau

Nylonmembran 13x14 cm mit ddH₂O nassen, in 6x SSC vorinkubieren. Große Schale mit 6x SSC füllen, Glasplatte quer darüber legen. 13x30 cm Filterpapier mit 6x SSC tränken, quer über die Glasplatte legen, so dass lange Enden in der Schale hängen. Gel darauf legen, mit Parafilm eingrenzen. Membran auf Gel, darauf zwei 13x14 cm große Stücke Filterpapier legen. Luftblasen ausrollen und einen Stapel Saugtücher darauf legen. Blotaufbau mit ca. 200 g beschweren (Saugblot).

- Blot über Nacht für ca. 20h
- Blotabbau, Taschen auf Membran markieren

- Membran mit DNA nach oben auf Glasplatte legen
- Crosslink: Stratalinker 1200J/cm² Autocrosslink
- Transfer Kontrolle mit UV Lampe
- Membran kurz mit ddH₂O waschen, trocknen lassen (auf Filterpapier)

Vorhybridisierung

- Membran mit DNA Seite nach innen in Hybridisierungsröhre legen
- 16 ml Stratagene Miracle Hyb Hybridisierungslösung zugeben
- 30 min bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubieren

Generation der Sonde (random prime mit Stratagene Prime it Kit)

- 25 ng Template DNA ad 24 µl mit H₂O, 10 µl random 9-mers zugeben
- 5 min 95°C denaturieren
- 10 µl 5x *ATP Primer Puffer und 50 µCi α³²P dATP zugeben, 1µl (5 U) Exo(-) Klenow Polymerase zugeben
- 10 min 37°C, Zugabe von 2 µl Stopplösung, mischen
- Währenddessen Säule vorbereiten (Biorad BioSpin 30 in SSC)
Säule bei Gravitation entleeren, 2 min 3000 rpm (Tischzentrifuge)
- 50 µl Probe auftragen, 4 min 3000 rpm (Tischzentrifuge)
- Eluat mit 160 µl Miracle Hyb Sondenpuffer vermischen, 5 min 95°C, 5 min auf Eis

Hybridisierung

- Sonde in Röhre geben, nicht direkt auf Membran
- Flüssigkeit am Röhrenboden mischen
- 2-4 h im Hybridisierungsofen bei 68°C hybridisieren

Waschen

Alle Waschlösungen wurden auf 60°C vorgewärmt, alle Waschungen bei 68°C ausgeführt.

- 20 min mit 3x SSC/0,1% SDS
- 20 min mit 1x SSC/0,1% SDS
- 20 min mit 0,3x SSC/0,1% SDS
- 2x 20 min mit 0,1x SSC/0,1% SDS

Entwicklung

- Röntgenfilm mit Membran in Reflektorkassette bei –80°C 2 h bis 48 h belichten (bei sehr starkem Signal bei RT belichten)

2.2.2. Zellbiologische und Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.4)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen gehalten. Dabei wurden für die jeweiligen Zelllinien folgende Medien eingesetzt (PS Penicillin-Streptomycin):

293	MEM (Haus); 10% FCS; 0,01% Glutamat; 120 µg/ml PS
293T	MEM (Haus); 10% FCS; 0,01% Glutamat; 120 µg/ml PS
A549	MEM (Haus); 10% FCS; 0,01% Glutamat; 120 µg/ml PS
BHK-21/LTR LacZ	MEM (Haus); 5% FCS; 0,01% Glutamat; 120 µg/ml PS
HeLa	MEM (Haus); 5% FCS; 0,01% Glutamat; 120 µg/ml PS
HT1080	DMEM (Invitrogen); 10% FCS; 120 µg/ml PS
HT1080 NLS LacZ	DMEM (Invitrogen); 10% FCS; 120 µg/ml PS
HuH7	DMEM (Invitrogen); 10% FCS; 120 µg/ml PS
NIH 3T3	DMEM (Invitrogen); 10% CS; 120 µg/ml PS
XC	DMEM (Invitrogen); 10% FCS; 120 µg/ml PS

Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 60-80% wurden die Zellen mit ATV gewaschen, mit ATV abgelöst und 1:2 bis 1:20 verdünnt weiter kultiviert.

2.2.2.2 Einzelzellklonierung durch limitierende Verdünnung

Zur Analyse einzelner Zellen oder zur Herstellung von rekombinanten Zelllinien wurden Einzelzellklone generiert. Positive Zellen können vor der Einzelzellklonierung durch Selektion oder Markergen-abhängige Zellsortierung angereichert werden. Die Zellen wurden dann in den Verdünnungen 0,3 Zellen/100 µl, 1 Zelle/100 µl und 3 Zellen/100 µl in 96-well Platten ausgesät (100 µl pro well). Zur Aussaat wurde konditioniertes, vorgewärmtes Medium verwendet (0,45µl filtriertes Medium, das bereits über Nacht auf wt Zellen derselben Linie kultiviert wurde). Nach 7 Tagen konnten die wells bestimmt werden, in denen sich jeweils nur ein Klon befindet. Es wurden jeweils 100 µl konditioniertes Medium pro well zugegeben. Nach weiteren 7 Tagen konnten die Einzelzellklone in 24-well Platten umgesetzt und bei Bedarf anhand ihrer Markergenexpression analysiert werden.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.4)

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit ATV vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und für 5 min bei 1200 rpm in einer Zellkulturzentrifuge pelletiert. Die Zellen wurden in der erforderlichen Menge FCS mit 10% DMSO resuspendiert und in 1 ml Aliquots bei -80°C eingefroren. Nach 1-3 Tagen wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen im RT-Wasserbad aufgetaut und sofort in 10 ml Medium gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in neues Medium aufgenommen und ausgesät.

2.2.2.4 Transfektion

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.5)

Bei der Transfektion wird Plasmid DNA in Zellen überführt, um eine transiente Genexpression in den Zielzellen zu erreichen. In dieser Arbeit wurden drei Transfektions-

methoden verwendet: Die Calciumphosphat-Transfektion von 293T Zellen (Standard-Methode für die meisten Fragestellungen), die Fugene6-Transfektion von HT1080 Zellen (pH-abhängige Fusionsanalyse) und die Polyfect-Transfektion von 293T Zellen (Produktion hoher Foamyvirus-Titer).

Calciumphosphat-Transfektion

Die Calciumphosphat-Transfektion ist eine effiziente Transfektionsmethode für 293T Zellen; sie hat jedoch den Nachteil, dass relativ viel DNA eingesetzt werden muss und dass andere Zelllinien oft schlecht oder gar nicht transfiziert werden können, da das Transfektionsmedium für sie toxisch ist. Der genaue Transfektionsmechanismus ist nicht bekannt, man geht jedoch davon aus, dass die DNA an Calciumphosphatkristalle gebunden und durch Endocytose aufgenommen wird. Die Transfektion wird auf 293T Zellen durchgeführt, die das SV-40 große T-Antigen exprimieren. Das große T-Antigen bindet an den SV-40 Replikationsstartpunkt (ori) in pCDNA3.1zeo Plasmiden, die die Grundlage der meisten unserer Konstrukte bilden. Es initiiert über seine Helikase Aktivität und Interaktion mit zellulären DNA Polymerasen und anderen Enzymen eine DNA Replikation (Cole, 1996). Zugabe von Natriumbutyrat bewirkt eine Stimulation des CMV-Promotors, unter dessen Kontrolle die einzelnen transfizierten Gene exprimiert werden (Soneoka et al., 1995).

Aussäen von Zielzellen

- 18-20 h vor der Transfektion werden je 2×10^6 293T Zellen pro 6 cm Schale in 4 ml Medium ausgesät.

Transfektion

- 15 µg DNA (15 µl) mit 423 µl H₂O und 62 µl 2 M CaCl₂ mischen
- Transfektionsmix mit 500 µl 2x HBS mischen, sofort auf Zielzellen geben
- Medium nach 7-9 h gegen 4 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium wechseln, Inkubation über Nacht
- Natriumbutyratinduktion, Zugabe von 500 mM Natriumbutyrat auf eine Endkonzentration von 10 mM

- Medium nach 8-10 h gegen 3 ml frisches Medium wechseln, Inkubation über Nacht
- Partikel können im Überstand abgenommen oder die transfizierten Zellen weiter verarbeitet werden.

Fugene6 und Polyfect Transfektion

Unter einer Vielzahl von auf dem Markt erhältlichen Transfektionsreagenzien wurden die beiden hier beschriebenen für spezielle Anwendungen durch Vergleichstests mit Konkurrenzprodukten ausgewählt. Die Funktionsweise beider Transfektionsreagenzien beruht auf einer Komplexbildung der Plasmid DNA mit nicht-liposomalen Makromolekülen, was zu einer nicht näher beschriebenen Aufnahme der DNA in Zielzellen führt. Beide Transfektionsreagenzien sind nicht toxisch und müssen nach der Transfektion nicht abgenommen werden. Die Transfektion mit Fugene6 (Roche Applied Science) wurde zur Transfektion von HT1080 Zellen in der pH-abhängigen Fusionsanalyse verwendet. Die Transfektion mit Polyfect (Qiagen) wurde zur Produktion hoher Foamyvirus Titer von 293T Zellen verwendet.

	Fugene6 Transfektion	Polyfect Transfektion
Zielzellen:	2,5x10 ⁵ in 2 ml pro 6-well	1,6x10 ⁶ in 4 ml pro 6 cm Schale
DNA	1,5 µg	6 µg
Transfektionsreagenz:	6 µl	30 µl
Serumfreies Medium	ad 100 µl mit Fugene	ad 150 µl ohne Polyfect

Die Zielzellen wurden am Tag vor der Transfektion ausgesät. Die Transfektionsmischung wurde angesetzt und 10-20 min (Polyfect) bzw. 20-40 min (Fugene6) bei RT inkubiert, auf die Zellen gegeben und über Nacht darauf gelassen. Am nächsten Tag konnten die Zellen weiter verarbeitet bzw. die virushaltigen Überstände abgenommen werden.

2.2.2.5 Durchflusscytometrische Analyse und Zellsortierung

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.5)

Bei der durchflusscytometrischen Analyse kann die Expression eines Markergens oder mehrerer Markergene in einer Zellpopulation analysiert werden. Entweder wird direkt mit Hilfe eines Lasers ein in der Zelle exprimiertes Fluorochrom nachgewiesen oder mit Hilfe eines an ein Fluorochrom gebundenen Antikörpers indirekt ein Markergenprodukt. Für den direkten Nachweis ist EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) am gebräuchlichsten, für den indirekten Nachweis wurde in dieser Arbeit zumeist humanes CD8 verwendet. Im Durchflußcytometer lassen sich neben dem Anteil fluoreszierender Zellen und deren Fluoreszenzintensität auch die Größe und Granularität der Zellen bestimmen, um Aussagen über den Zustand der Zellpopulation zu machen. Zur FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) wurden die Zellen mit ATV abgelöst, bei 1200 rpm für 5 min in einer Zellkulturzentrifuge pelletiert und in 100-400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Bei Bedarf konnten die Zellen nach dem Ablösen noch für 30 min in PBS 2% Formaldehyd bei RT fixiert werden. Nach der Fixierung müssen die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen werden. Die Daten der FACS-Analyse wurden mit dem Programm CellQuest (Becton-Dickinson) ausgewertet.

Neben der Analyse, die zumeist mit einem Becton-Dickinson FACScan durchgeführt wurde, ist es auch möglich, Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz zu sortieren. Diese Arbeiten wurden mit einem Becton-Dickinson FACSvantage Zellsortierer durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die Zellen lediglich mit ATV abgelöst, bei 1200 rpm für 5 min in einer Zellkulturzentrifuge pelletiert und in 2-4 ml Medium aufgenommen. Nach der Sortierung mussten die Zellen 2x mit Medium mit 240 µg/ml Penicillin-Streptomycin gewaschen und danach für ca. 5 Tage in diesem Medium kultiviert werden, um mögliche Kontamination zu eliminieren.

2.2.3.6 Herstellung von Zelllysaten zur Proteingelelektrophorese

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3)

Zur Proteingelelektrophorese werden die Zellen lysiert und die Proteine denaturiert, dabei werden die Membranen durch Triton X-100 permeabilisiert, und die Proteine durch SDS und β -Mercaptoethanol denaturiert. In dieser Arbeit wurden zwei

Methoden verwendet: Eine Methode, bei der Lysate ohne Zellkerne hergestellt wurden (zur Analyse von Env Proteinen) und eine Methode, bei der Lysate mit Zellkernen hergestellt wurden (zur Analyse von Gag und Pol Proteinen).

Um Lysate ohne Zellkerne herzustellen wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, dann mit 300-600 µl Lysispuffer für Proteinlysate mit Proteaseinhibitoren auf Eis für 20 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, darauf wurden die Lysate in Reaktionsgefäße überführt, gut gevortext und für 5 min bei 14T rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 2x PP vermischt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht.

Um Lysate mit Zellkernen herzustellen wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, dann mit 300-600 µl RIPA Puffer mit Proteaseinhibitoren auf Eis für 20 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und zur mechanischen Zerkleinerung der bei Pipettierungen störenden Nukleinsäuren für 2 min bei 14T rpm durch einen Qiashredder zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 2x PP vermischt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht.

Zelllysate wurden bei -80°C gelagert.

Proteaseinhibitoren

	Stammlösung	Gebrauch
PMSF	10 mg/ml	170 µg/ml
Pepstatin	700 µg/ml	0,7 µg/ml
Leupeptin	1 mg/ml	0,5 µg/ml
Aprotinin	1 mg/ml	2 µg/ml
EDTA	186,1 mg/ml	0,5 mg/ml

2.2.3.7 Prokaryotische Proteinexpression und Aufreinigung

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3)

Fusionsproteine mit dem Maltose-bindenden-Protein (MBP) wurden mit dem rekombinanten Vektor pMal-C2 exprimiert. Zur Expression wurde der Expressionsvektor, dessen Promotor durch IPTG aktiviert wird, in einen geeigneten E. Coli Stamm transfiziert (hier zumeist *E. Coli BL-21 C+*) und das Protein in einer Bakterienkultur durch IPTG Zugabe exprimiert. Die Bakterien wurden durch Ultraschall lysiert und

das MBP Fusionsprotein wurde über eine Säule mit einer Amylose-Matrix (NEB) aufgereinigt.

Proteinexpression

- Ansatz einer 20 ml LB-Kultur mit entsprechendem Antibiotikum, Inkubation über Nacht bei 37°C/200 rpm
- Animpfen einer 1 l LB-Kultur mit entsprechendem Antibiotikum 1:100 mit Übernachtskultur, Inkubation 37°C/200 rpm bis OD₅₉₅ 0,6
- Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG auf 0,5 mM Endkonzentration
- Expression für 2-6 h bei RT/200 rpm
- Pelletieren der Bakterien in Sorvall G3 Rotor für 15 min bei 7000 rpm und 4°C
- Resuspendierung der Bakterien in 30 ml Säulenpuffer, Lagerung bei -80°C

Proteinaufreinigung

- Bakterienlösung bei RT auftauen, auf Eis in sechs 5 ml Aliquots in 15 ml Röhrchen aufteilen
- Ultraschall-Lyse auf Eis mit Sonifier (Branson) (Duty Cycle 50%, Output Level 6) 4x 30 Impulse pro Probe
- Jede 5 ml Probe mit 30 ml Säulenpuffer verdünnen, ungelöstes Protein in Sorvall SS-34 Rotor für 30 min bei 15T rpm und bei 4°C abzentrifugieren
- Überstand abnehmen, 0,22 µM filtrieren (auf Eis), Probe nehmen
- Säule (mit 5 ml Matrix beladen) mit 40 ml Säulenpuffer (8x Matrixvolumen) bei 4°C äquilibrieren
- Proteinlösung bei 4°C über Säule geben, vom Durchfluss Probe nehmen
- Säule mit 75 ml Säulenpuffer (15x Matrixvolumen) bei 4°C waschen
- Gebundenes MBP-Fusionsprotein mit 25 ml Elutionspuffer eluieren, 1 ml Fraktionen auffangen

Zur Analyse wurde ein Aliquot von jeder Fraktion auf ein Acrylamidgel (2.2.1.8) aufgetragen, die Proteinbanden wurden durch Coomassie Färbung (2.2.1.9) sichtbar gemacht. Die Säulen können zur Wiederverbenutzung (allerdings nur zur Aufreinigung desselben Proteins) regeneriert werden.

Regenerierung der Säule

- Säule mit 15 ml H₂O waschen (3x Matrixvolumen)
- Säule mit 5 ml 0,1% SDS waschen (1x Matrixvolumen)
- Säule mit 5 ml H₂O waschen (1x Matrixvolumen)
- Säule mit 15 ml Säulenpuffer waschen (3x Matrixvolumen)

Die Säule wurde dann in Säulenpuffer mit 0,05 % NaN₃ bei 4°C gelagert.

2.2.1.8 Tricine SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3)

Mit der Tricine SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach: Schagger & Jagow, 1987) lassen sich Proteinproben auf einem 5% - 15% Acrylamidgel der Größe nach auftrennen. Der Trennbereich liegt dabei je nach Acrylamidanteil und Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid und Bis-Acrylamid bei 10-220 kD. Das Acrylamid polymerisiert durch freie Radikale, die von APS (Ammoniumperoxysulfat) abgegeben und von TEMED (N,N,N',N' -Tetramethyldiamin) stabilisiert werden, die Acrylamidfasern werden durch polymerisiertes Bis-Acrylamid quervernetzt (Vernetzungsgrad der hier verwendeten Gele: 37,5:1). Bei der Auftrennung im Gel sind die Proteine durch SDS (Natriumlaurylsulfat) und β-Mercaptoethanol denaturiert und erhalten durch SDS die gleiche (negative) Ladung.

In der Regel wurden 7,5% und 10% Gele nach folgendem Schema gegossen:

	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
Acrylamid Stammlösung: (Rotiphorese Gel 30)	5,0 ml	6,7 ml	2,7 ml
Tricine Gel Puffer:	6,6 ml	6,6 ml	5,0 ml
Glycerin	2,2 ml	2,2 ml	-
H ₂ O	6,2 ml	4,5 ml	12,3 ml
APS (10% Lösung)	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl

Die Lösungen wurden mit kaltem Wasser angesetzt. Das Trenngel wurde zuerst gegossen und mit 1,5 ml H₂O überschichtet. Nach Polymerisierung wurde das H₂O abgenommen und das Sammelgel gegossen. In die obere (-) Kammer der Elektrophoreseapparatur wurde Kathodenpuffer und in die untere (+) Anodenpuffer gegeben. Die Proteinproben wurden für 5 min gekocht, anschließend wurden in der Regel auf Gele mit 15er Kämmen 80 µl pro Tasche aufgetragen, auf Gele mit 20er Kämmen 50 µl pro Tasche. Der Gellauf erfolgte bei 15-40 mA pro Gel über Nacht.

2.2.1.9 Coomassie-Färbung von Acrylamidgelen und Gelrocknung

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3)

Mit der Coomassie-Färbung können alle in einem Acrylamidgel vorhandenen Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Das Acrylamidgel wird dabei in Methanol/Essigsäure fixiert, die färbungsaktive Substanz ist Coomassie Brilliant Blue. Die gefärbten Gele wurden soweit entfärbt, bis die Proteinbanden gut zu erkennen waren, dann wurden sie in einem Gelrocknenrahmen (Diversified Biotech) zwischen Folien getrocknet und konnten so unbegrenzt aufbewahrt werden.

Färbung

- Färbung der Gele für 2 h in Coomassie Stain auf Schüttler
- Entfärbung für 4-8 in Coomassie Destain (oft wechseln) auf Schüttler

Trocknung

- Gele 1x kurz in Gel-Trocknungspuffer waschen
- Gele 30 min in Gel-Trocknungspuffer auf Schüttler inkubieren
- Folien für Gelrocknenrahmen in H₂O aufquellen lassen
- Gele mit Gel-Trocknungspuffer zwischen Folien in Gelrocknenrahmen einspannen
- Trocknung horizontal bei RT für 24-36 h

2.2.1.10 Western Blot

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.3 und 2.1.13.6)

Bei dem Western Blot Verfahren werden Proteine nach der Auftrennung aus einem Polyacrylamidgel durch elektrischen Strom auf eine (Nitrocellulose) Membran übertragen. In dieser Arbeit wurde der Western Blot nach dem „Semi-Dry“ Verfahren durchgeführt. Auf der Membran können Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden; dieser Nachweis wird indirekt geführt. Das Protein wird zuerst mit dem spezifischen Antikörper detektiert, darauf bindet ein sekundärer Antikörper an die FC-Region des primären Antikörpers. Der sekundäre Antikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt (in dieser Arbeit HRP, Meerrettich-Peroxidase), die bei Zugabe einer Detektionslösung (ECL Western Blot Detection Kit, Amersham/Pharmacia) ein darin enthaltenes Reagenz unter Freisetzung von Lichtquanten oxidiert (Chemo-lumineszenz). Die Lichtemission wird durch Belichtung eines Röntgenfilms detektiert.

Western Blot

Blotaufbau: Kathodenplatte (mit Blotpuffer befeuchtet)
 2 Lagen Blot-Filterpapier (in Blotpuffer getränkt)
 Acrylamidgel
 Nitrocellulosemembran (in Blotpuffer getränkt)
 2 Lagen Blot-Filterpapier (in Blotpuffer getränkt)
 Anodenplatte (mit Blotpuffer befeuchtet)

- Blot für 90 min bei einer Stromstärke von 150 mA

Immunblot

- Blot kurz mit PBS waschen
- Blot für 1 h auf Schüttler in PBS mit 5% Magermilchpulver blockieren
- Blot kurz mit PBST waschen
- Blot 2 h mit primärem Antikörper verdünnt in PBS mit 5% Magermilchpulver inkubieren
- Blot 3x kurz mit PBST waschen, 2x 10 min mit PBST waschen

- Blot 1 h mit sekundärem Antikörper verdünnt in PBS mit 5% Magermilchpulver inkubieren
- Blot 3x kurz mit PBST waschen, 4x 10 min mit PBST waschen

Detektion

- Blot kurz mit PBS waschen
- 6-8 ml ECL zugeben, ca. 1-2 min. einwirken lassen
- Blot in Frischhaltefolie wickeln, Röntgenfilm für 20 sec bis 10 min belichten

2.2.1.11 Histochemische β -Galactosidase Färbung

(Puffer und Lösungen: 2.1.13.5)

Die histochemische β -Galactosidase Färbung dient dem Nachweis der Expression des β -Galactosidase Markergens. Die Zellen, in denen die β -Galactosidase nachgewiesen werden soll, wurden zuerst mit PBS gewaschen und für 30 min bei 4°C mit LacZ Fixierlösung fixiert. Sie wurden dann 3x mit PBS gewaschen, da die Fixierlösung den nachfolgenden Färbeprozess inhibiert. Zur Färbung wurden die Zellen mit LacZ Färbelösung für 30 min bis 4 h bei 37°C inkubiert, dabei wird 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. Die Anzahl blau gefärbter Zellen konnte am Mikroskop quantitativ bestimmt werden.

2.2.3 Virologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung und Titration infektiöser Retrovirus Überstände

In 293T Zellen wurden retrovirale Partikel hergestellt, die nur einen Infektionszyklus durchlaufen können. Dazu wurden 293T Zellen mittels Calciumphosphat-Transfektion oder Polyfect-Transfektion (2.2.2.4) mit Plasmiden cotransfiziert, die unter Kontrolle eines CMV Promotors transient die zur Partikelbildung notwendigen Proteine exprimieren. Es wurde ein Gag/Pol exprimierendes Plasmid zur Bildung des Capsids und der Reversen Transkriptase/Protease/Integrase, ein Vektorplasmid, das eine verpackbare RNA, meist mit selbstinaktivierenden LTRs, exprimiert und ein Env ex-

primierendes Plasmid benötigt. Das auf diesem Weg gebildete Viruspartikel enthält eine Nukleinsäure, die nicht für virale Proteine codiert, sondern lediglich der viralen Vektorsequenz entspricht. In den meisten Fällen wurde ein Markergen verwendet, das es ermöglicht, infizierte Zellen zu identifizieren. Die Viruspartikel, die aus den 293T Zellen in das umgebende Medium knospen, konnten abgenommen, titriert und zur Infektion von Zielzellen verwendet werden. Intrazelluläre Partikel konnten über das Freeze/Thaw Verfahren isoliert und abgenommen werden (Aufbrechen der Zellen durch Einfrieren auf Trockeneis und Auftauen). Eine Infektion mit viralen Partikeln ließ sich anhand der Markergenexpression von stabil integriertem reversen Transkript in Zielzellen nachweisen.

Die Titration erfolgte durch eine Infektionsreihe, bei der Virusverdünnungen über mehrere Log-Stufen auf Zielzellen gegeben wurden. Anhand der Markergenexpression konnte die Anzahl infizierter Zellen und damit der Titer bestimmt werden.

2.2.3.2 Infektionsanalyse

Zur Analyse der Infektionsaktivität wurden virale Partikel, die Markergene im Genom tragen, durch transiente Transfektion von 293T Zellen hergestellt (2.2.3.1). Als fluoreszente Markergene, die direkt im FACS analysiert werden (2.2.2.5), wurden EGFP (enhanced green fluorescent protein), EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) und EBFP (enhanced blue fluorescent protein) verwendet. Allerdings sind EGFP und EBFP in einer Probe bei zu heterogener Expression sehr schlecht aufzulösen. Für die Messung von EBFP im FACS ist ein UV-Laser notwendig. Fluorochrome können auch indirekt zur FACS-Analyse benutzt werden, z. B. durch Expression des hCD8-Markergens und Färbung mit einem anti-hCD8-Fluorochrom-Antikörper. Gebräuchliche Farbstoffe sind PE (Phycoerythrin, rot), FITC (Fluorescein-Isocyanat, grün) oder CY5 (Indodicarbocyanin, rot).

Zur genauen Bestimmung der Anzahl infizierter Zellen bietet sich das LacZ Markergen an; durch eine histochemische Färbung können alle infizierten Zellen blau angefärbt werden (2.2.2.11).

Zur Infektion wurde der Überstand von transfizierten 293T Zellen abgenommen, 0,45 μ M filtriert und verdünnt oder unverdünnt auf Zielzellen gegeben. Die Zellen wurden für 4-8h infiziert. Nach 48h wurden die Zellen abgelöst und im FACS analysiert oder fixiert und gefärbt.

2.2.3.3 pH-abhängige Fusionsanalyse

Mit Hilfe einer Zell-Zell Fusionsanalyse wurde die pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität von viralen Hüllproteinen untersucht. Expressionsplasmide für virale Hüllproteine wurden mit der Fugene6-Transfektion (2.2.2.4) in HT1080 Zellen eingeschleust. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen abgelöst und mit derselben Anzahl HT1080-NLS-LacZ Zellen vermischt. HT1080-NLS-LacZ Zellen exprimieren stabil eine β -Galactosidase mit einem Kernlokalisierungssignal. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie für 30 sec bis 30 min saurem pH ausgesetzt (PBS pH 4,5-6,5), zur Kontrolle werden Zellen neutralem PBS (pH 7,2) ausgesetzt. Nach der pH-Inkubation wurden die Zellen 1x mit Medium gewaschen. 12-16 h nach pH-Inkubation wurden die Zellen fixiert und es wurde eine histochemische β -Galactosidasefärbung (2.2.1.11) durchgeführt. Die Zellkerne der HT1080 NLS LacZ Zellen und aller HT 1080 wt Zellen, die an Syncytien mit HT1080 NLS-LacZ Zellen beteiligt sind, wurden blau gefärbt, wodurch eine bessere Identifizierung der Syncytien ermöglicht wurde. Die Fusionsaktivität wurde als Anzahl/Syncytien pro cm^2 Kulturschale bestimmt, wobei alle vielkernigen Riesenzellen mit drei oder mehr Zellkernen als Syncytien gewertet werden.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der foamyviralen Penetration

3.1.1 Foamyvirale Hüllproteinexpressionskonstrukte

Die Penetration umhüllter Viren beginnt mit der Bindung des Hüllglykoproteins an den zellulären Rezeptor. Das Virus wird durch die Fusion der viralen Membran mit einer zellulären Membran in die Zielzelle aufgenommen. Man unterscheidet zwischen einem pH-abhängigen und einem pH-unabhängigen Aufnahmeweg. Beim pH-abhängigen Aufnahmeweg wird die Fusionsaktivität des Hüllproteins durch das saure Milieu in endosomalen Kompartimenten ausgelöst. Durch die Aktivierung der Fusionsaktivität des Hüllproteins kommt es zur Verschmelzung der viralen Membran mit der endosomalen Membran und zur Freisetzung des Capsids in das Cytoplasma (White, 1992). Bei dem pH-unabhängigen Aufnahmeweg führt der Kontakt des Hüllproteins mit dem zellulären Rezeptor zur Induktion der Fusionsaktivität. So kommt es zu einer direkten Fusion der viralen Membran mit der zellulären Membran und damit zur Freisetzung des Capsids in das Cytoplasma. Dieser Weg wird meist von Paramyxoviren (Lamb, 1993) und Retroviren (McClure et al., 1990) benutzt.

In dieser Arbeit wurden zur Analyse der FV Penetration Hüllproteinkonstrukte verschiedener FV Spezies verwendet (Fig. 12). Als Kontrolle dienten Hüllproteinexpressionskonstrukte des Vesikulären Stomatitisvirus (VSV) und des amphotropen Murinen Leukämievirus (MuLV-A) (Fig. 12). Während die VSV Glykoprotein vermittelte Penetration pH-abhängig durch Clathrin-abhängige Endocytose verläuft (Skehel & Wiley, 2000; Russell & Marsh, 2001), werden MuLV-A Env pseudotypisierte Partikel durch einen pH-unabhängigen Mechanismus in Zellen aufgenommen (McClure et al., 1990; Nussbaum et al., 1993)

Bei den FV Hüllproteinexpressionskonstrukten pczHFVenv EM02, pczHFVenv EM64, pczHFVenv Δ 2MuLV, pczFFVenv, pczBFVenv und pczSFV-1env (Fig. 12) handelt es sich um CMV-Promotor getriebene Hüllproteinexpressionskassetten im Vektor pcDNA3.1zeo. Die SFV-1 Expressionskonstrukte pciSFV-1env und pciSFV-1env SM01 sowie das EFV Env Expressionskonstrukt pciEFVenv (Fig. 12) sind Hüllproteinexpressionskassetten, die CMV-Promotor getrieben vom Vektor pci exprimiert

werden, der im Gegensatz zu pCDNA3.1zeo vor dem Transgen ein Intron enthält. Das EFV Env Expressionskonstrukt pSG5EFVenv (Lecellier et al., 2002) wurde ebenfalls in dieser Arbeit benutzt.

Die Hüllproteine wurden zur Analyse der Proteinexpression in eukaryotischen Zellen, zur direkten Analyse der Fusionsaktivität der Hüllproteine sowie zur Pseudotypisierung von PFV und MuLV Capsiden zur Analyse der Penetration verwendet.

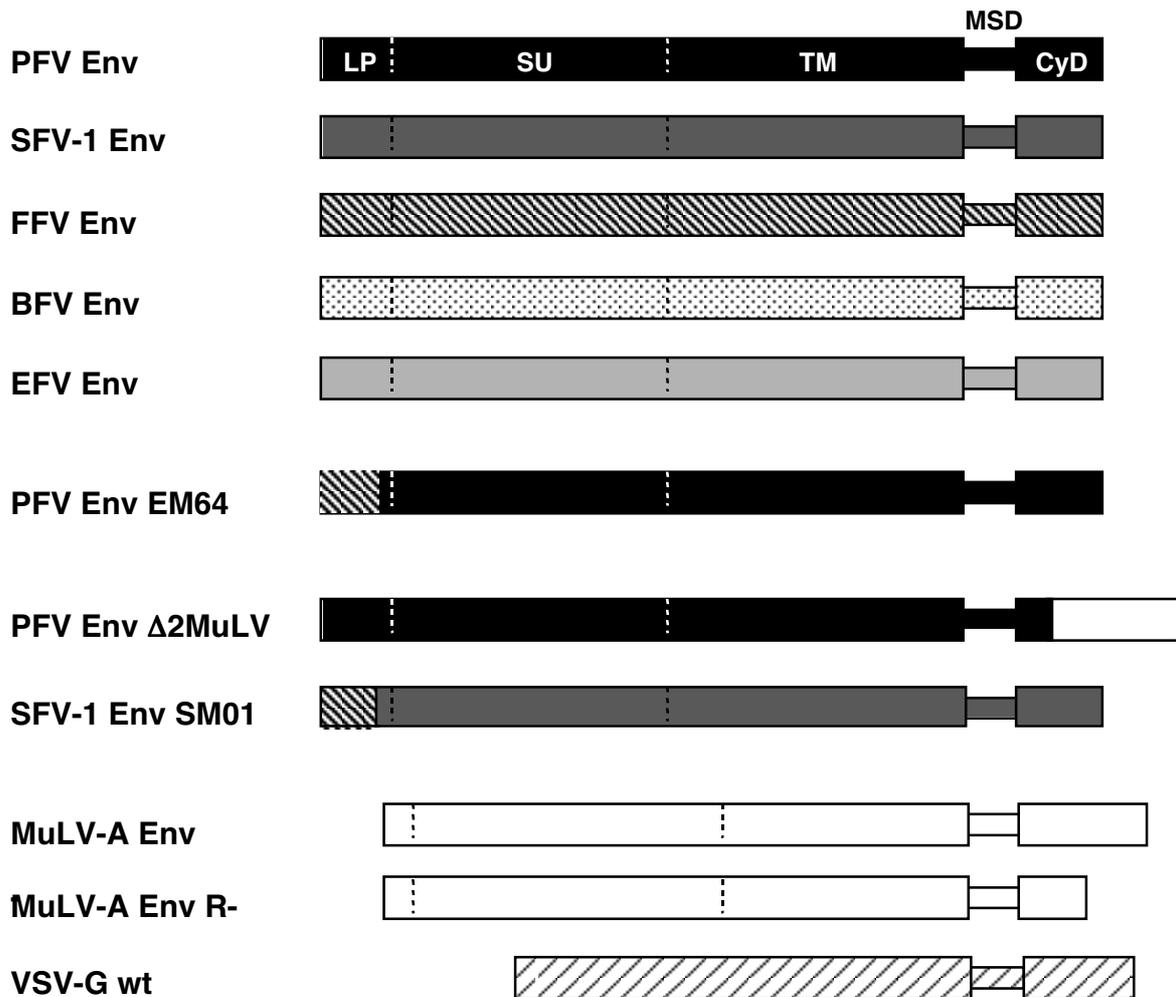


Fig. 12: Schematische Zeichnung von Hüllproteinexpressionskonstrukten. Die codierenden Regionen der Hüllproteinexpressionskonstrukte, die zur Analyse der FV Penetration verwendet wurden, sind vergleichend dargestellt. Die Hüllproteine werden von den folgenden Plasmiden exprimiert: (PFV Env) *pczHFVenvEM02*; (SFV-1 Env) *pciSFV-1env* oder *pczSFV-1env*; (FFV Env) *pczFFVenv*; (BFVenv) *pczBFVenv*; (EFVenv) *pciEFVenv* oder *pSG5EFVenv*; (PFVenvEM64) *pczHFVenvEM64*; (PFV Env Δ 2MuLV) *HFVenv Δ 2MuLV*; (SFV-1 Env SM01) *pciSFV-1envSM01*; (MuLV-A Env) *pcziMEA* oder *pHIT456*; (MuLV-A Env R-) *pcziMEAR-*; (VSV-G wt) *pczVSV-G*. (LP) Leaderpeptid; (SU) Oberflächen-Untereinheit des Hüllproteins; (TM) Transmembran-Untereinheit des Hüllproteins; (MSD) membran-spannende Domäne; (CyD) cytoplasmatische Domäne.

3.1.1.1 Die Herstellung von FV Env spezifischen Antiseren

Zur Herstellung von FV Env Leaderpeptid spezifischen Antiseren und eines PFV SU spezifischen Antiserums zur Analyse der FV Env Expression in eukaryotischen Zellen wurden entsprechende Sequenzen der verschiedenen FV Env Expressionsplasmide in den Expressionsvektor pMal-C2 kloniert. Die MBP (Maltose bindendes

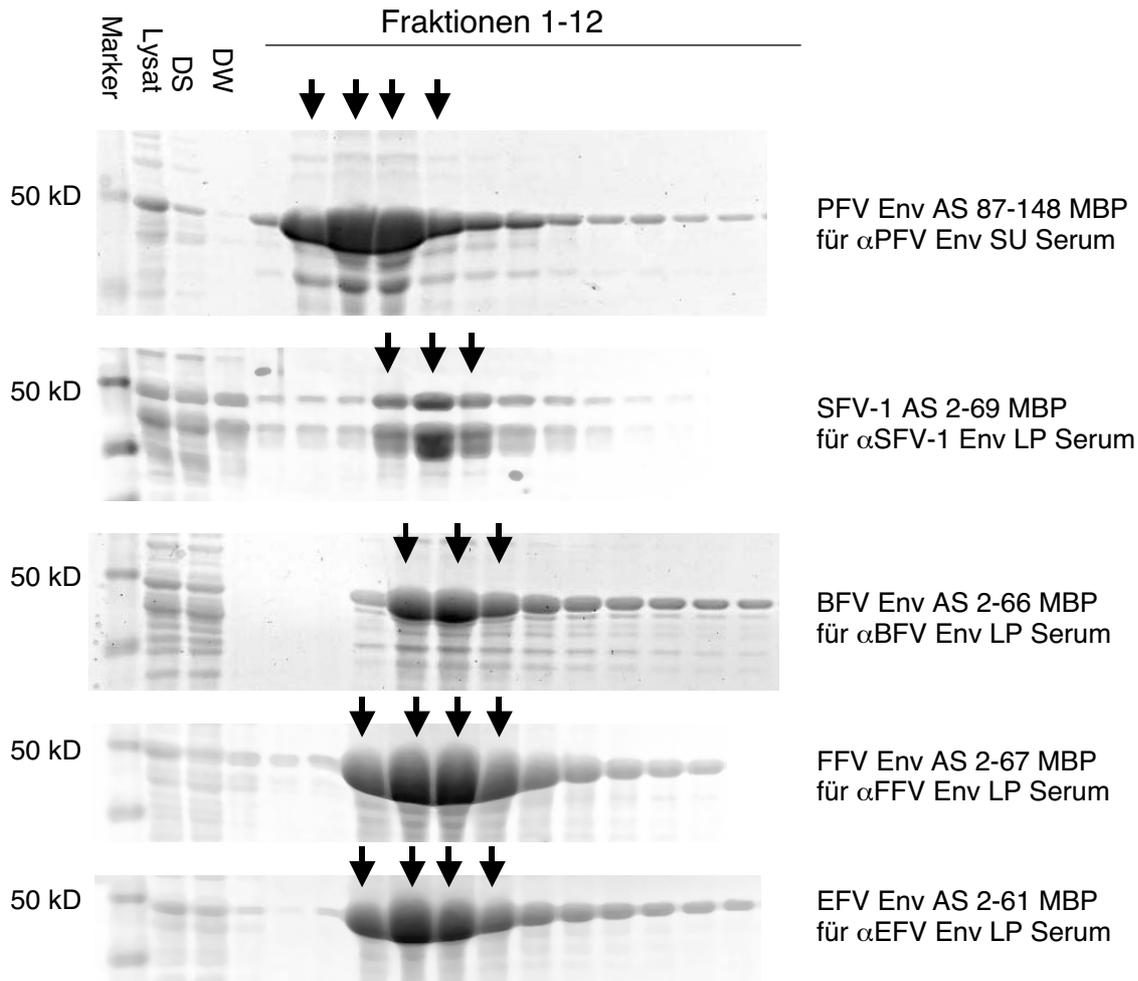


Fig. 13: Expression von FV Env LP- oder SU-MBP Fusionsproteinen. Die Fusionsproteine wurden in *E.Coli* BL21 C+ Bakterien exprimiert und über Ultraschalllyse und eine Amylosematrix aufgereinigt (2.2.3.7). Von jeder Fraktion wurde 1/20 auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie Blau gefärbt und in Trockenrahmen getrocknet. Die Fraktionen, die jeweils vereinigt und zur Immunisierung verwendet wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. In der ersten Spur wurde der Proteingrößenstandard (Amersham RPN800) aufgetragen, in der zweiten eine Probe des noch nicht aufgereinigten Bakterienlysates, in der dritten Spur der Durchfluss bei der Beladung der Amylosesäule (DS), in der vierten Spur der Durchfluss bei der Waschung der Amylosesäule (DW). (AS) Aminosäure; (LP) Leaderpeptid; (MBP) Maltose-Bindendes-Protein; (SU) Oberflächen-Untereinheit des Hüllproteins.

Protein) -FV Env Fusionsproteine wurden in E.Coli Bakterien exprimiert (Fig. 13) und nach Ultraschalllyse über eine Amylosematrix aufgereinigt (2.2.3.7). Aliquots der einzelnen Proteinfractionen wurden auf einem Polyacrylamidgel analysiert (Fig. 13). Die Proteinkonzentration konnte mit Hilfe eines BSA Standards geschätzt werden, die Immunisierung wurde durch die Firma Eurogenetec durchgeführt. Die zur Immunisierung verwendeten Kaninchen wurden nach der Analyse von Präimmunsereen mittels Western Blot anhand des bereits vorhandenen Hintergrunds ausgewählt (Daten werden nicht gezeigt). Die Tiere wurden an Tag 1 immunisiert, Seren konnten an Tag 36, 63 und 80 nach Immunisierung gewonnen werden.

3.1.1.2 Nachweis der FV Env Expression

Zur Analyse der FV Env Expression wurden 293T Zellen mittels Calciumphosphat-Transfektion mit FV Env Expressionsplasmiden transfiziert. Zelllysate wurden 48 h nach Transfektion hergestellt und auf einem Acrylamidgel aufgetrennt. Die Proteinexpression konnte im Western Blot mit den zuvor beschriebenen Antiseren analysiert werden (Fig. 14). Mit dem PFV Env SU Serum wurde in pczHFVenv EM02 transfizierten 293T Lysaten das 130 kD PFV Env Vorläuferprotein, die 80 kD Oberflächen-Untereinheit des Hüllproteins und das 18 kD Leaderpeptid detektiert (LP nicht gezeigt) (Fig. 14 A). Mit dem PFV LP spezifischen Antiserum (Lindemann et al., 2001) war es ebenfalls möglich, das Env Vorläuferprotein und das Leaderpeptid zu detektieren (Fig. 14 B). Mit den Seren gegen die Leaderpeptide der Hüllproteine von SFV-1 Env, FFV Env, BFV Env und EFV Env konnten auch die Vorläuferproteine der Hüllproteine und die Leaderpeptide der Hüllproteine in den entsprechenden Lysaten nachgewiesen werden (Fig. 14 C-F). Allerdings ist das Env Vorläuferprotein von SFV-1 sehr schlecht sichtbar (Fig. 14 C), vermutlich aufgrund einer niedrigeren Expression des pczSFV-1env Plasmids. Im Lysat von pczFFVenv transfizierten Zellen war es aufgrund guter Detektionseigenschaften des Serums möglich, sogar bei kurzer Belichtung des Röntgenfilms eine zweite, vermutlich die unglykosilierte Form des Env Leaderpeptids, nachzuweisen (Fig. 14 E).

Diese Ergebnisse lassen sowohl auf eine ordnungsgemäße Expression der verwendeten Hüllproteine als auch auf die Detektionsfähigkeit der verwendeten Antiseren

Ergebnisse

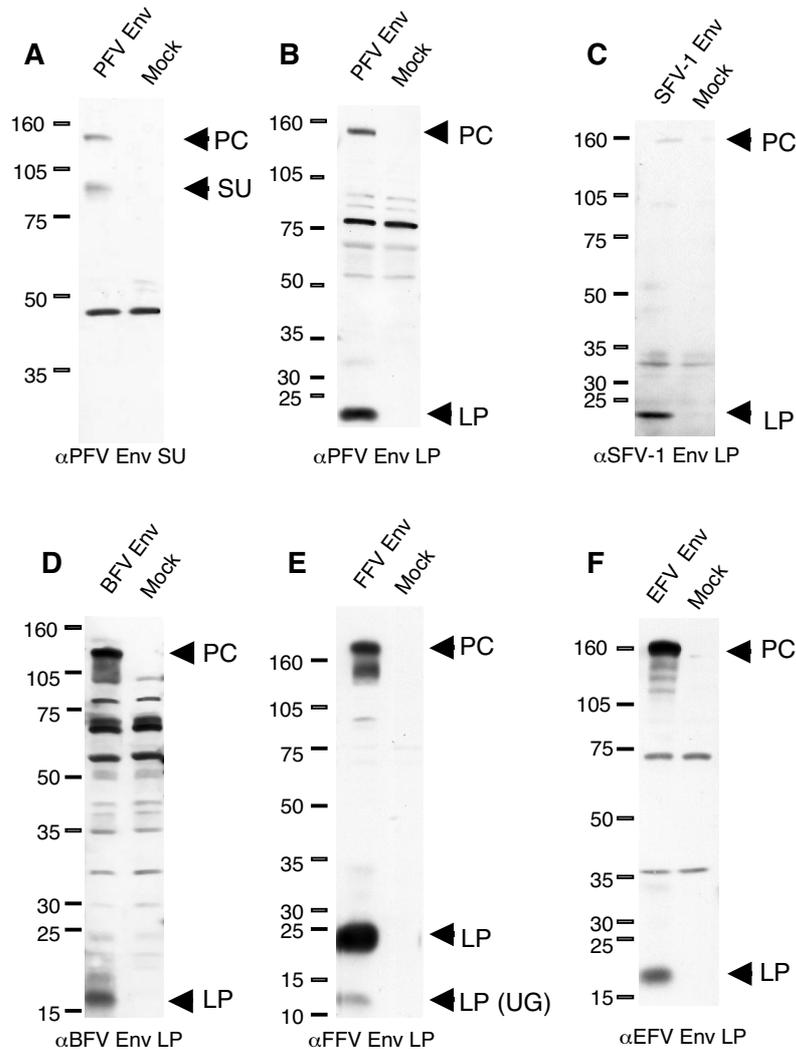


Fig. 14: Western Blot Analyse der Proteinexpression von FV Hüllproteinen. Je 2×10^6 293T Zellen wurden mit je 15 μ g des jeweiligen Hüllproteinexpressionskonstrukts mittels Calciumphosphattransfektion transfiziert und 48 h nach Transfektion lysiert. Die Lysate wurden auf 7,5 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt, mittels Elektrophorese auf Nitrocellulosemembranen übertragen und die Hüllproteinexpression mittels Immunblot detektiert. Die Größenangaben des Markers sind in kD. (A) *pczHFVenv EM02* (PFV Env) und *pcDNA3.1zeo* (Mock) transfizierte Zellen. Als primärer AK wurde α PFV Env 87-148 Kaninchenserum (1:2000) verwendet; (B) *pMH87* (PFV Vektor mit *gag/pol/env*) und *pcDNA3.1zeo* (Mock) transfizierte Zellen. Als primärer AK wurde α PFV Env 2-69 Kaninchenserum (1:400) verwendet; (C) *pczSFV-1env* (SFV-1Env) und *pcDNA3.1zeo* (Mock) transfizierte Zellen. Als primärer AK diente α SFV-1 Env 2-69 Kaninchenserum (1:500); (D) *pczBFVenv* (BFV Env) und *pcDNA3.1zeo* (Mock) transfizierte Zellen. Als primärer AK wurde α BFV Env 2-66 Kaninchenserum (1:400) verwendet; (E) *pczFFVenv* (FFV Env) und *pcDNA3.1zeo* (Mock) transfizierte Zellen. Der primäre AK war α FFV Env 2-67 Kaninchenserum (1:1500); (F) *pSG5EFVenv* (EFV Env) und *pcDNA3.1zeo* (Mock) transfizierte Zellen. Als primärer AK diente α EFV Env 2-61 Kaninchenserum (1:1500). Der sekundäre AK war stets Schwein α Kaninchen IgG-HRP Antikörper (1:1000). (LP) Env Leaderpeptid; (LP (UG)) Env Leaderpeptid unglykosiliert; (PC) Env Vorläuferprotein; (SU) Env Oberflächen-Untereinheit.

schließen. Die ordnungsgemäße Expression von PFV Env von dem Plasmid pczHFVenv $\Delta 2$ MuLV wurde bereits gezeigt (Lindemann et al., 1997). Die Integrität aller Konstrukte wurde zusätzlich durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse bestätigt.

3.1.2 Analyse der pH Abhängigkeit der FV Infektion

3.1.2.1 Die Abhängigkeit der PFV Infektion von lysosomotropen Agenzien

Über die pH-Abhängigkeit der FV Infektion und den Eintrittsweg von FV in Zielzellen ist bisher nichts bekannt. Da FV Vektoren nicht mit heterologen viralen Hüllproteinen pseudotypisierbar sind (Pietschmann et al., 1999), wurden in den folgenden Versuchen MuLV Pseudotypen benutzt, um die Verwendung adäquater Kontrollen zu ermöglichen. Als Kontrolle dienten das VSV-Glykoprotein (VSV-G), das eine pH-abhängige Infektion katalysiert, und das amphotrope Murine Leukämievirus Hüllglykoprotein (MuLV-A Env), das eine pH-unabhängige Infektion vermittelt.

Lysosomotrope Agenzien inhibieren reversibel die Ansäuerung von intrazellulären

Substanz	Substanzklasse	Wirkungsweise
Ammoniumchlorid	schwache Basen	Erhöhung des pH-Werts in Lysosomen und endosomalen Kompartimenten
Chloroquin	schwache Basen	Erhöhung des pH-Werts in Lysosomen und endosomalen Kompartimenten
Concanamycin A	vakuoläre ATPase Inhibitoren	Erhöhung des pH-Werts in intrazellulären Kompartimenten durch Inhibition vakuolärer ATPasen
Bafilomycin A1	vakuoläre ATPase Inhibitoren	Erhöhung des pH-Werts in intrazellulären Kompartimenten durch Inhibition vakuolärer ATPasen
Nigericin	carboxylische Ionophoren	Erhöhung des pH-Werts in intrazellulären Kompartimenten durch Austausch von H^+ gegen Ca^{2+}

Tab. 5: Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten lysosomotropen Agenzien.

Kompartimenten und sind damit zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der viralen Infektion geeignet (Mellmann et al., 1986; Marsh & Pelchen-Matthews, 2000; Rusell & Marsh., 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten Agenzien sind in Tab. 5 zusammengefasst.

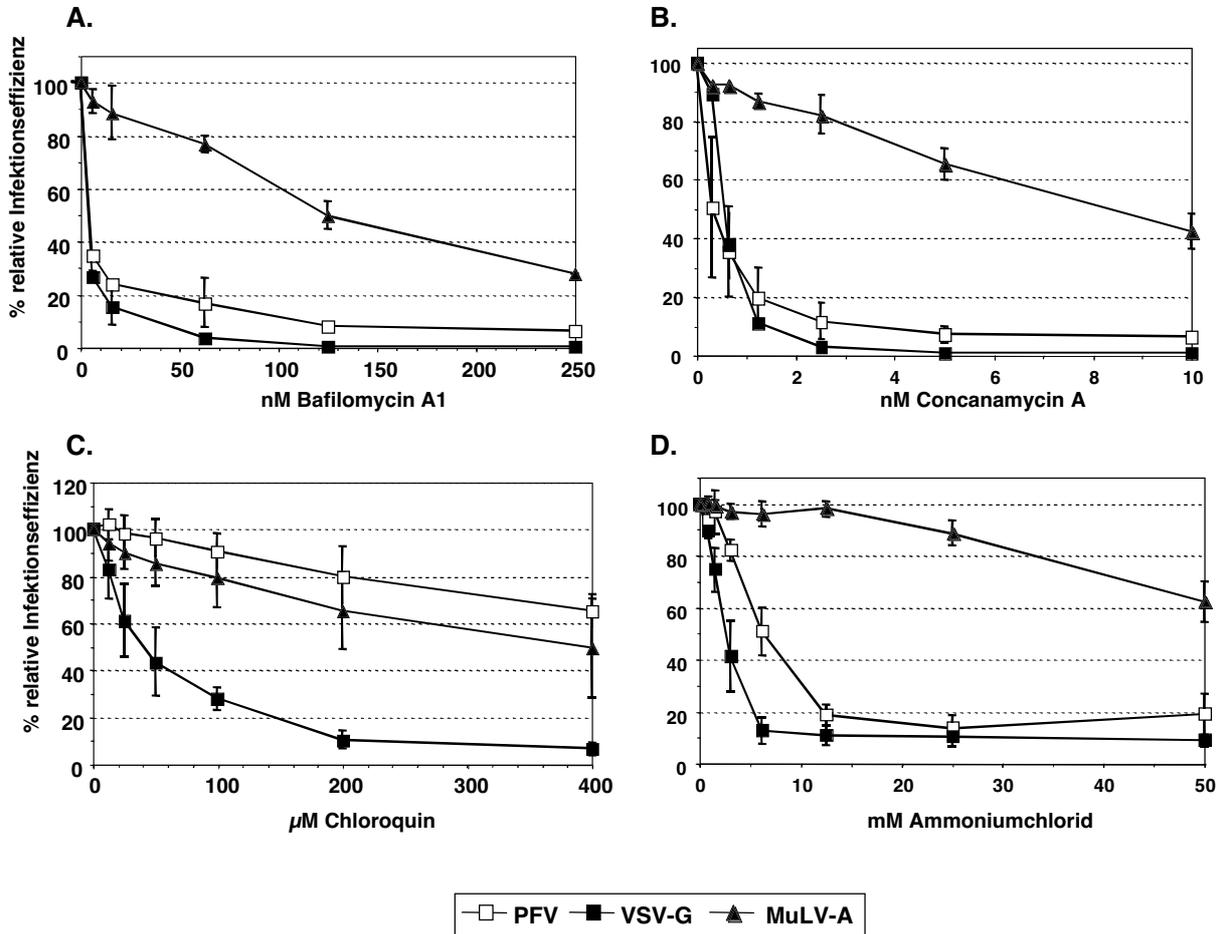


Fig. 15: Infektion von HT1080 Zellen mit MuLV Pseudotypen in Gegenwart lysosomotroper Agenzien. HT1080 Zellen wurden 2 h mit den jeweiligen Konzentrationen lysosomotroper Agenzien vorinkubiert, für 4 h mit den jeweiligen Überständen in Gegenwart der Agenzien mit 8 μ g/ml Polybrene infiziert und für 2 h mit Agenzien nachinkubiert. Die Überstände wurden durch Cotransfektion von 293T Zellen mit pHIT60, pczCFG2fEGN und den jeweiligen Hüllproteinexpressionskonstrukten hergestellt. Die Infektionseffizienz wurde 48 h nach Infektion mittels FACS Analyse bestimmt. Auf der Y-Achse ist die relative Infektionseffizienz dargestellt, bei der als 100%-Wert die absolute Infektionseffizienz des jeweiligen Überstandes ohne Agenzien festgesetzt wurde. Auf der X-Achse ist die Konzentration der jeweiligen Agenzien aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3-10 Versuchen mit Standardabweichung, es wurden jeweils 10000 Zellen pro Probe analysiert. (PFV) HFVenv Δ 2MuLV pseudotypisierte MuLV Capside; (VSV-G) pczVSV-G pseudotypisierte MuLV Capside; (MuLV-A) pHIT 456 pseudotypisierte MuLV Capside.

Zur Analyse des Einflusses lysosomotroper Agenzien auf die FV Hüllprotein vermittelte Infektion wurden mittels Calciumphosphattransfektion von 293T Zellen zellfreie infektiöse Überstände mit pseudotypisierten MuLV Partikeln hergestellt. Die MuLV Partikel enthielten als Vektor eine EGFP Expressionskassette unter Kontrolle eines MuLV U3 Promotors. Die Überstände wurden titriert und in Verdünnungen bei absoluten Infektionseffizienzen zwischen 25 % und 50 % infizierten Zellen eingesetzt. HT1080 Zellen wurden in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen verschiedener Agenzien für 2 h vorinkubiert, für 4 h infiziert und für 2 h nachinkubiert. Die Anzahl GFP positiver Zellen konnte 48 h nach Infektion im FACS bestimmt werden. Wie in Fig. 15 A ersichtlich, wurde die VSV-G katalysierte Infektion von Bafilomycin A1, das wie Concanamycin A die vakuolären ATPasen hemmt und damit die pH-abhängige Infektion inhibiert (Palokangas et al., 1994; Perez & Carrasco, 1994), schon bei geringen Konzentrationen stark gehemmt. Die MuLV-A Env vermittelte Infektion wurde im Gegensatz dazu deutlich schwächer inhibiert. Die Inhibition der PFV Env vermittelten Infektion verlief ähnlich wie die der VSV-G vermittelten, allerdings konnte eine etwas niedrigere Hemmung der Infektion bei höheren Bafilomycin A1 Konzentrationen festgestellt werden. Für Infektionen in Gegenwart von Concanamycin A galten ähnliche Resultate (Fig. 15 B), so dass man davon ausgehen kann, dass die PFV Env vermittelte Infektion, im Gegensatz zu der MuLV-A Env vermittelten, die als Kontrolle für pH-unabhängige Infektionen diente, von vakuolären ATPase Inhibitoren stark gehemmt wurde. Auch bei Infektionen in Gegenwart von Ammoniumchlorid konnten ähnliche Resultate beobachtet werden (Fig. 15 D), weshalb man auch hier von einer Hemmung der PFV Env vermittelten Infektion ausgehen kann. Die Infektion von VSV-G Pseudotypen wird, wie bereits beschrieben (McClure et al., 1990), von Ammoniumchlorid sehr stark inhibiert, die Infektion von MuLV-A Env Pseudotypen (Nussbaum et al., 1993) dagegen nur wenig. Bei Infektionen in Gegenwart von Chloroquin, das ebenso eine Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente verhindert, und damit die Infektion von pH abhängigen Viren hemmt (McClure et al., 1990), wird die VSV-G vermittelte Infektion im Gegensatz zur MuLV-A Env katalysierten, wie bei den zuvor verwendeten Agenzien, stark gehemmt. In diesem Fall verhält es sich mit der PFV Env vermittelten Infektion allerdings umgekehrt (Fig 15 C).

Zusammenfassend konnte eine Hemmung der PFV Env katalysierten Infektion durch lysosomotropen Agenzien, mit Ausnahme von Chloroquin, festgestellt werden.

Um Zelllinien-bedingte Artefakte auszuschließen wurden vergleichbare Experimente mit NIH3T3, XC und QT-6 Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnten die zuvor gezeigten Ergebnisse bestätigt werden.

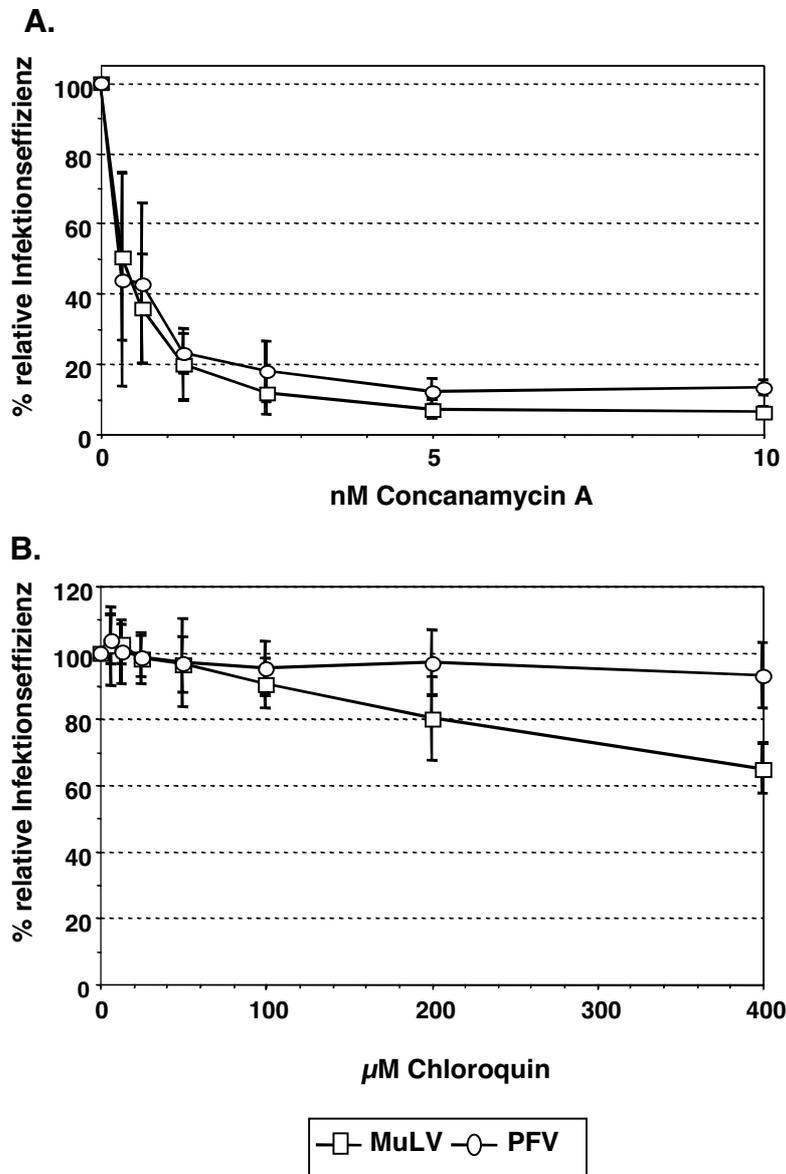


Fig. 16: Infektion von HT1080 Zellen mit MuLV und PFV Pseudotypen in Gegenwart lysosomotroper Agenzien. HT1080 Zellen wurden 2 h mit den jeweiligen Konzentrationen lysosomotroper Agenzien vorinkubiert, für 4 h mit den jeweiligen Überständen in Gegenwart der Agenzien und 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene infiziert und für 2 h mit Agenzien nachinkubiert. Die MuLV Überstände wurden durch Cotransfektion von 293T Zellen mit pHIT60, pczCFG2fEGN und pczHFVenv ΔMuLV hergestellt, die PFV Überstände durch Cotransfektion von pMH118 und pczHFVenvEM02. Die Infektionseffizienz wurde 48 h nach Infektion mittels FACS Analyse bestimmt. Auf der Y-Achse ist die relative Infektionseffizienz dargestellt, bei der als 100%-Wert die absolute Infektionseffizienz des jeweiligen Überstandes ohne Agenzien festgesetzt wurde. Auf der X-Achse ist die Konzentration der jeweiligen Agenzien aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen mit Standardabweichung. Es wurden jeweils 10000 Zellen pro Probe analysiert.

Um durch das Capsid bedingte Einflüsse auszuschließen, wurde die Wirkung von Concanamycin A und Chloroquin auf die Infektion von PFV Env pseudotypisierten MuLV Capsiden und PFV Env pseudotypisierten PFV Capsiden verglichen (Fig. 16). Zellfreie Überstände mit pseudotypisierten MuLV und PFV Capsiden konnten durch Calciumphosphattransfektion von 293T Zellen hergestellt werden. Die Partikel enthielten als Markergen eine EGFP Expressionskassette. HT1080 Zellen wurden in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen verschiedener Agenzien für 2 h vorinkubiert, für 4 h infiziert und für 2 h nachinkubiert. Der Anteil GFP positiver Zellen

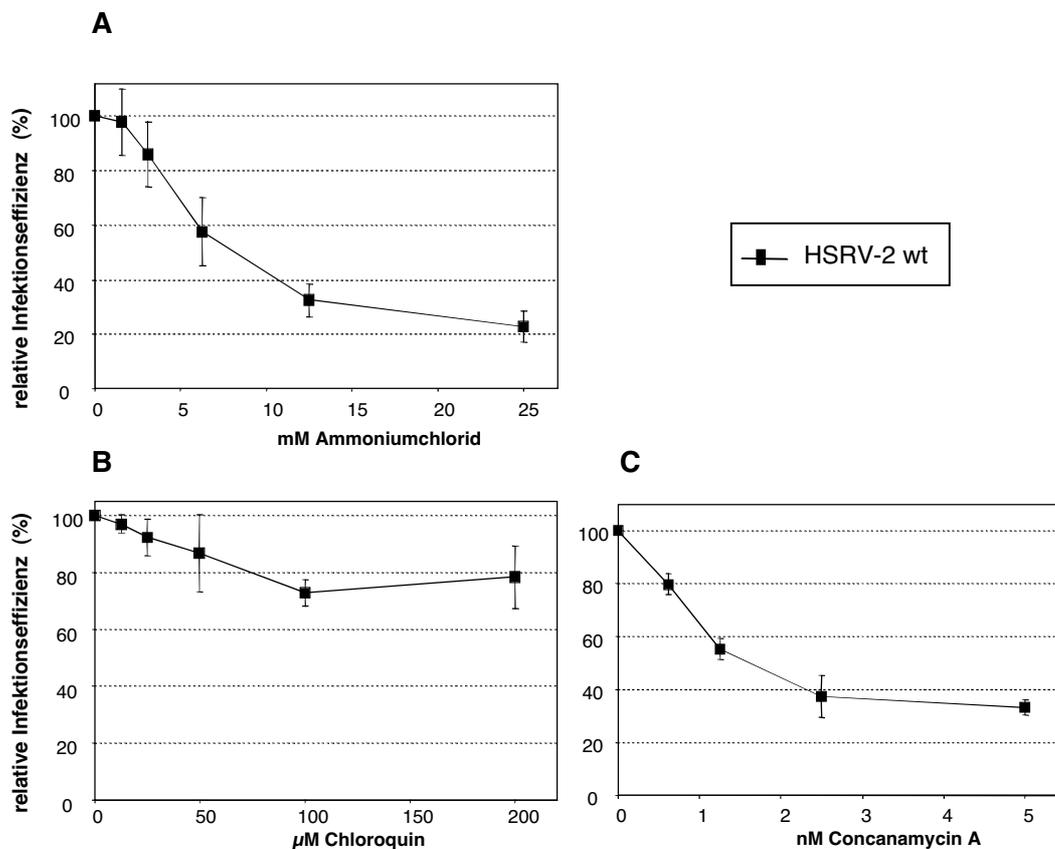


Fig. 17: Analyse der Infektions/Replikationsaktivität von HSRV-2 wt Virus in Gegenwart von lysosomotropen Agenzien. BHK/LTR-LacZ Zellen wurden für 2 h mit den jeweiligen Agenzien vorinkubiert, für 4 h in Gegenwart der jeweiligen Agenzien mit zellfreien HSRV-2 wt Überständen in verschiedenen Verdünnungen infiziert und für 2 h mit den jeweiligen Agenzien nachinkubiert. Der Titer wurde 48 h nach Infektion durch eine histochemische β -Galactosidase Färbung bestimmt. Auf der Y-Achse ist die relative Infektionseffizienz aufgetragen, bei der als 100%-Wert die absolute Infektionseffizienz des jeweiligen Überstandes ohne Agenzien festgesetzt wurde. Auf der X-Achse ist die Konzentration der jeweiligen Agenzien aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen mit Standardabweichung. (A) Infektion in Gegenwart von Ammoniumchlorid; (B) Infektion in Gegenwart von Chloroquin; (C) Infektion in Gegenwart von Concanamycin A.

wurde 48 h nach Infektion in der FACS Analyse bestimmt. Die Infektionsaktivität von PFV Pseudotypen mit MuLV und PFV Capsiden verhielt sich in Gegenwart von Concanamycin A (Fig. 16 A) und Chloroquin (Fig. 16 B) sehr ähnlich zu einander, so dass ein maßgeblicher Einfluss des Capsids auf die Ergebnisse der PFV Infektion in Gegenwart lysosomotroper Agenzien wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann. Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse wurde der Einfluss lysosomotroper Agenzien auf die Infektionseffizienz von PFV wt Virus (HSRV-2) (Fig. 17) untersucht. Bei dieser Untersuchung konnten allerdings keine VSV und MuLV-A Kontrollen eingesetzt werden, da von diesen kein replikationsfähiges Virus zur Verfügung stand. Da es sich bei HSRV-2 um einen replikationsfähigen wt PFV Stamm handelt, war es auch nicht möglich, den Einfluss von lysosomotropen Agenzien isoliert in Bezug auf die Env vermittelte Infektion, sondern nur im Bezug auf die gesamte Replikation zu beobachten. BHK Zellen wurden mit HSRV-2 wt Virus infiziert, von denen bei erkennbarem cytopathischen Effekt (2-6 Tage nach Infektion) zellfreier Virusüberstand isoliert werden konnte. BHK/LTR-LacZ Indikatorzellen wurden mit den jeweiligen Agenzien für 2 h vorinkubiert, in Gegenwart der Agenzien für 4 h mit HSRV-2 wt Überstand infiziert und für weitere 2 h mit den jeweiligen Agenzien nachinkubiert. BHK/LTR-LacZ Zellen enthalten eine β -Galactosidase Expressionskassette unter Kontrolle eines PFV U3 Promotors. Werden diese Zellen von PFV infiziert, wird der PFV U3 Promotor durch das neu exprimierte virale Tas Protein transaktiviert und β -Galactosidase exprimiert. Achtundvierzig Stunden später wurden infizierte Zellen durch eine histochemische β -Galactosidase Färbung sichtbar gemacht und der Virustiter bestimmt. Die HSRV-2 Infektion/Replikation wird sowohl durch Ammoniumchlorid (Fig. 17 A) als auch durch Concanamycin A (Fig. 17 C) gehemmt, allerdings nicht in dem Maße wie in Experimenten mit nicht-replikationsfähigen Vektoren beobachtet. Die schwächere Hemmung kann durch die Replikationsfähigkeit von HSRV-2 erklärt werden, da von infizierten Zellen auch nach der Inkubation mit Agenzien Virus freigesetzt wird. Eine längere Nachinkubation mit Agenzien ist wegen der Toxizität der Substanzen nicht möglich. In Gegenwart von Chloroquin wurde die HSRV-2 Infektion/Replikation nicht maßgeblich gehemmt (Fig. 17 B). Die in Fig. 17 gezeigten Daten weisen auf eine Bestätigung der Ergebnisse, die mit nicht-replikationsfähigen Vektoren erzielt wurden, hin.

3.1.2.2. Die Abhängigkeit der FV Infektion von lysosomotropen Agenzien

Nachdem die Abhängigkeit der PFV Env vermittelten Infektion von lysosomotropen Agenzien analysiert wurde, stand die Untersuchung der Abhängigkeit der Env katalysierten Infektionen anderer Foamyvirus Hüllproteine von lysosomotropen Agenzien im Vordergrund. Mittels Calciumphosphattransfektion von 293T Zellen wurden infektiöse zellfreie Überstände von MuLV Pseudotypen hergestellt. Da die Pseudotypisierung von MuLV Capsiden mit PFV wt Env nur sehr schlecht möglich ist, wurde auch hier das chimäre Hüllprotein PFV Env Δ 2MuLV (Fig. 12) verwendet. Gleiches gilt für SFV-1 Env, weshalb hier das chimäre Hüllprotein SFV-1 EnvSM01 (Fig. 12) verwendet wurde. Die Herstellung von FFV, BFV und EFV Pseudotypen wurde mit den jeweiligen wt Env Proteinen durchgeführt. HT1080 Zellen wurden für 2 h mit den jeweiligen Agenzien vorinkubiert, für 4 h in deren Gegenwart infiziert und für weitere 2 h mit den jeweiligen Agenzien nachinkubiert. Nach 48 h konnte der Anteil GFP positiver Zellen im FACS bestimmt werden. Die Gegenwart von Concanamycin A führte zu einer Inhibition der Infektionsaktivität aller MuLV Pseudotypen mit Ausnahme der MuLV-A Env Pseudotypen (Fig. 18 A). Auffällig war lediglich eine etwas schwächere Inhibition von PFV Pseudotypen im Vergleich zu den mit anderen FV Hüllproteinen pseudotypisierten MuLV Capsiden. In Gegenwart von Chloroquin wurde die Infektionsaktivität aller MuLV Pseudotypen, mit Ausnahme von VSV-G und BFV Env Pseudotypen, nicht maßgeblich beeinträchtigt. BFV Env pseudotypisierte MuLV Capside zeigten im Gegensatz zu anderen FV Pseudotypen eine leicht verringerte Infektionsaktivität. Es liegen Hinweise vor, dass die BFV Env vermittelte Infektion möglicherweise über einen anderen Weg verläuft, als die von anderen FV Hüllproteinen vermittelte (unveröffentlichte eigene Ergebnisse), so können BFV Env Pseudotypen beispielsweise 3T3 Zellen im Gegensatz zu anderen FV Pseudotypen nur sehr schlecht infizieren. Das wäre eine mögliche Erklärung dieses Sachverhalts.

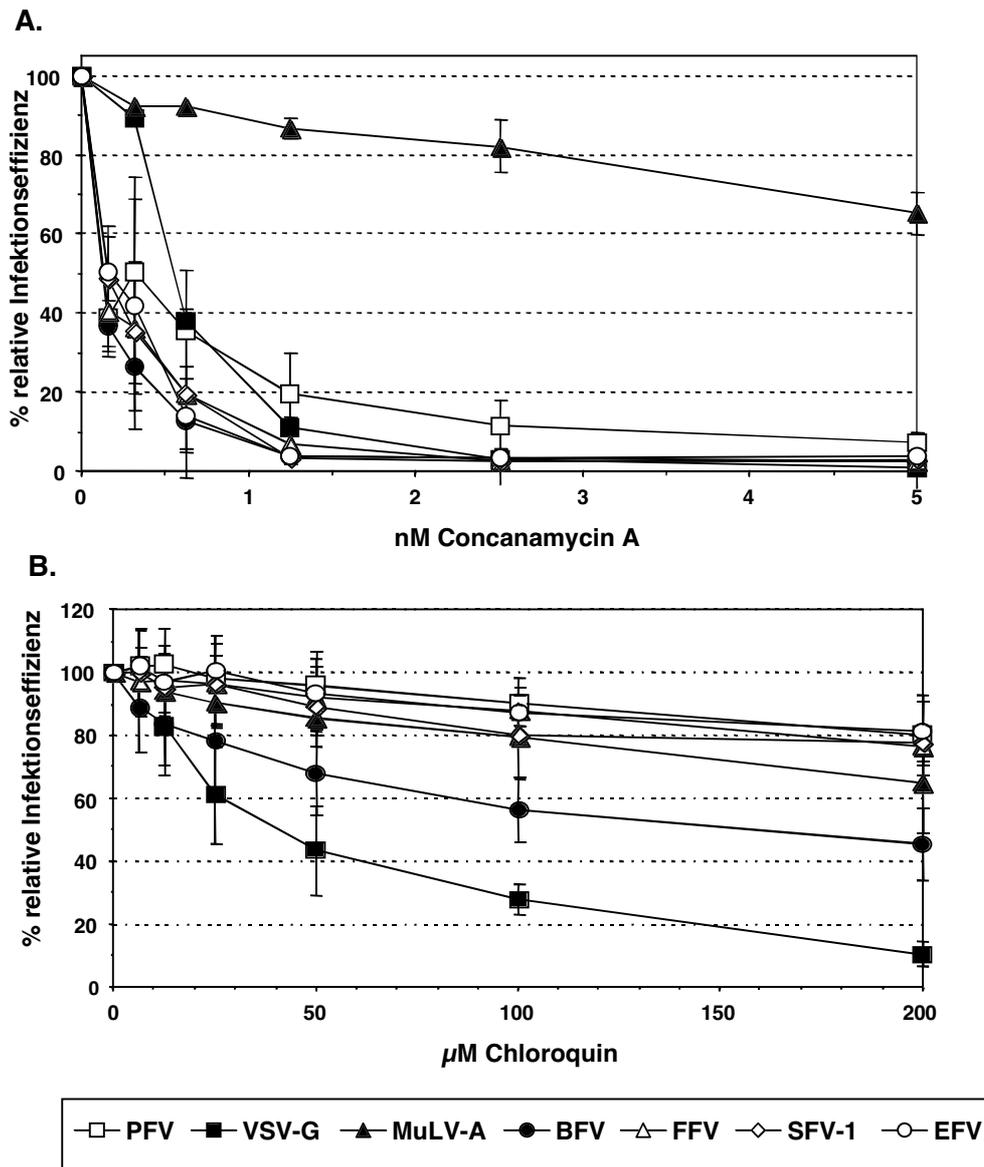


Fig. 18: Infektion von HT1080 Zellen mit MuLV Pseudotypen in Gegenwart lysosomotroper Agenzien. HT1080 Zellen wurden 2 h mit den jeweiligen Konzentrationen lysosomotroper Agenzien vorinkubiert, für 4 h mit den jeweiligen Überständen in Gegenwart der Agenzien bei 8 µg/ml Polybrene infiziert und für 2 h mit Agenzien nachinkubiert. Die Überstände wurden durch Cotransfektion von 293T Zellen mit pHIT60, pczCFG2fEGN und den jeweiligen Hüllproteinexpressionskonstrukten hergestellt. Die Infektionseffizienz wurde 48 h nach Infektion mittels FACS Analyse bestimmt. Auf der Y-Achse ist die relative Infektionseffizienz dargestellt, bei der als 100% Wert die absolute Infektionseffizienz des jeweiligen Überstandes ohne Agenzien festgesetzt wurde. Auf der X-Achse ist die Konzentration der jeweiligen Agenzien aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3-10 Versuchen mit Standardabweichung. Es wurden jeweils 10000 Zellen pro Probe analysiert. (PFV) pczHFVenv Δ2MuLV pseudotypisierte MuLV Capside; (VSV-G) pczVSV-G pseudotypisierte MuLV Capside; (MuLV-A) pHIT 456 pseudotypisierte MuLV Capside; (BFV) pczBFVenv pseudotypisierte MuLV Capside; (FFV) pczFFVenv pseudotypisierte MuLV Capside; (SFV-1) pciSFV-1envSM01 pseudotypisierte MuLV Capside; (EFV) pciEFVenv pseudotypisierte MuLV Capside.

In den bisher gezeigten Ergebnissen konnte die Inhibition der FV Env vermittelten Infektion durch schwache Basen und vakuoläre ATPase Inhibitoren mit der Ausnahme von Chloroquin gezeigt werden. Zur Bestätigung dieser Daten wurden weitere Versuche mit der dritten Substanzklasse lysosomotroper Agenzien durchgeführt, den carboxylischen Ionophoren. Carboxylische Ionophoren bilden Komplexe mit Kationen und erhöhen den pH-Wert intrazellulärer Kompartimente durch Austausch von Wasserstoffionen gegen Calciumionen (Pressman, 1976). Es konnte bereits gezeigt werden, dass carboxylische Ionophoren die Penetration von Viren, die einen pH-abhängigen Eintrittsmechanismus nutzen, hemmen (Marsh et al., 1982; Borrow & Oldstone 1994; Irurzun et al., 1997). Das Agenz dieser Substanzklasse unserer Wahl war Nigericin, das als Prototyp der carboxylischen Ionophoren betrachtet wird (Pressman, 1976).

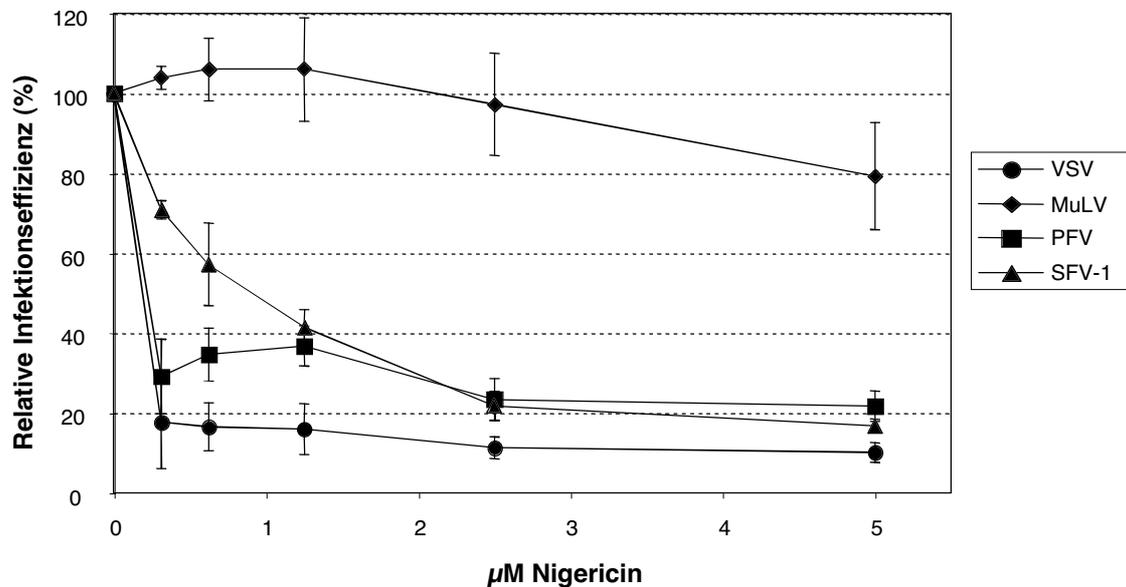


Fig. 19: Analyse des Einflusses von Nigericin auf die PFV Env und SFV-1 Env katalysierte Infektion von HT1080 Zellen. HT1080 Zellen wurden 2 h mit den jeweiligen Konzentrationen Nigericin vorinkubiert, für 4 h mit den jeweiligen Überständen in Gegenwart von Nigericin und 8 µg/ml Polybrene infiziert und für 2 h mit Nigericin nachinkubiert. Die Überstände wurden durch Cotransfektion von 293T Zellen mit pHIT60, pczCFG2fEGN und den jeweiligen Hüllproteinexpressionskonstrukten hergestellt. Nach 48 h konnte die Infektionseffizienz mittels FACS Analyse bestimmt werden. Auf der Y-Achse ist die relative Infektionseffizienz dargestellt, bei der als 100%-Wert die absolute Infektionseffizienz des jeweiligen Überstandes ohne Agenzien festgesetzt wurde. Auf der X-Achse ist die Konzentration des Nigericins aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen mit Standardabweichung vom Mittelwert. Es wurden jeweils 10000 Zellen pro Probe analysiert. (PFV) pczHFVenv Δ 2MuLV pseudotypisierte MuLV Capside; (VSV-G) pczVSV-G pseudotypisierte MuLV Capside; (MuLV-A) pHIT 456 pseudotypisierte MuLV Capside; (SFV-1) pciSFV-1envSM01 pseudotypisierte MuLV Capside.

Zur Analyse der Infektionsaktivität von FV Env pseudotypisierten MuLV Capsiden in Gegenwart von Nigericin wurden neben PFV Env pseudotypisierten MuLV Capsiden auch SFV-1 Env pseudotypisierte MuLV Capside verwendet. Da die Infektionsaktivität aller anderen FV Env Pseudotypen in vorhergegangenen Experimenten in Gegenwart von lysosomotropen Agenzien stärker inhibiert wurde als bei PFV Env Pseudotypen, wurde SFV-1 Env als Vertreter der stärker inhibierten Gruppe von Hüllproteinen zur Kontrolle ausgewählt. Wie in Fig. 19 ersichtlich, wird auch in Gegenwart von Nigericin die Infektionsaktivität der PFV Env vermittelten Infektion ebenso wie die der SFV-1 Env vermittelten im Gegensatz zu der MuLV-A Env katalysierten Infektion stark gehemmt. Die Infektionsaktivität von VSV-G Pseudotypen wurde etwas stärker als die der FV Env Pseudotypen inhibiert. Auffällig ist, dass in Gegenwart von Nigericin die Hemmung der Infektionsaktivität von FV Pseudotypen nicht so stark wie in Gegenwart anderer Agenzien verläuft. Dieser Befund lässt sich allerdings möglicherweise dadurch erklären, dass Nigericin einer anderen Substanzklasse angehört, und damit auch ein anderer Wirkungsmechanismus vorliegt (Tab 5).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die FV Env vermittelte Infektion durch lysosomotrope Agenzien aller 3 Substanzklassen gehemmt wird, mit der Ausnahme von Chloroquin. Diese Ergebnisse lassen einen pH-abhängigen Penetrationsmechanismus, und damit einen endocytotischen Eintrittsweg für FV vermuten.

3.1.2.3 Die Stabilität von FV Env pseudotypisierten MuLV Partikeln in Gegenwart von lysosomotropen Agenzien

Um die Möglichkeit einer Inhibition der Infektionsaktivität der verwendeten MuLV Pseudotypen durch eine direkte Wirkung der lysosomotropen Agenzien auf die Partikel auszuschließen, wurde die Stabilität der pseudotypisierten MuLV Capside bei 37°C in Gegenwart von lysosomotropen Agenzien untersucht. Zellfreie Überstände mit PFV, SFV-1, MuLV-A und VSV-G pseudotypisierten MuLV Partikeln, die als Markergen eine β -Galactosidase mit einem Kernlokalisierungssignal exprimieren, wurden ohne Agenzien und mit hohen Konzentrationen Ammoniumchlorid oder Concanamycin A für 4 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 2 h und 4 h nach Start der Inkubation wurde Überstand entnommen und auf HT1080 Zellen titriert. Durch die Verdünnung der Überstände bei der Titration war die

Konzentration der jeweiligen Agenzien, und damit ein wesentlicher inhibitorischer Effekt, vernachlässigbar gering. Der Titer der jeweiligen MuLV Pseudotypen konnte 48 h nach Infektion durch eine histochemische β -Galactosidasefärbung bestimmt werden.

Nach 2 h Inkubation der infektiösen Überstände bei 37°C ohne Agenzien war bei VSV-G und MuLV-A Env Pseudotypen ein geringer Titerverlust auf etwa 90% des ursprünglichen Titers zu beobachten (Fig 20 A). Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde ein Verlust auf etwa 10 % des ursprünglichen Titers festgestellt (Fig. 20 A). Bei FV Env Pseudotypen wurde dagegen ein weit größerer Titerverlust beobachtet, nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C war bei SFV-1 Pseudotypen bereits ein Titerverlust auf 50 % des ursprünglichen Titers feststellbar, während bei PFV Pseudotypen der Titer auf etwa 1% des ursprünglichen Wertes sank (Fig. 20 A). Nach 4 h Inkubation wurden die Verluste noch gravierender, der Titer von SFV-1 Pseudotypen sank auf etwa 5 %, der von PFV Pseudotypen auf etwa 0,05% des ursprünglichen Titers (Fig. 20 A). Daraus ergab sich bei MuLV-A Env und VSV-G Pseudotypen nach 4 h Inkubation bei 37°C ein Titerverlust um den Faktor 10, während SFV-1 Pseudotypen einen Titerverlust um den Faktor 20 und PFV pseudotypisierte MuLV Capside um den Faktor 2000 zeigten. Vergleichbare Ergebnisse konnten in Anwesenheit von 50 mM Ammoniumchlorid (Fig. 20 B) und 15 nM Concanamycin A (Fig. 20 C) beobachtet werden, so dass von keiner Beeinflussung der Partikelstabilität durch lysosomotrope Agenzien ausgegangen werden kann. Obwohl bei PFV Pseudotypen einen sehr hohen Titerverlust im Vergleich zu den anderen Pseudotypen zu registrieren war, wurde die PFV Env vermittelte Infektion nicht stärker (Fig. 15+ 18), sondern im Gegenteil etwas schwächer gehemmt. Dieser Befund stützt die Annahme, dass der vergleichbar hohe Titerverlust keine maßgebliche Auswirkung auf die Inhibierung der Infektionseffizienz von FV Pseudotypen durch lysosomotrope Agenzien hat.

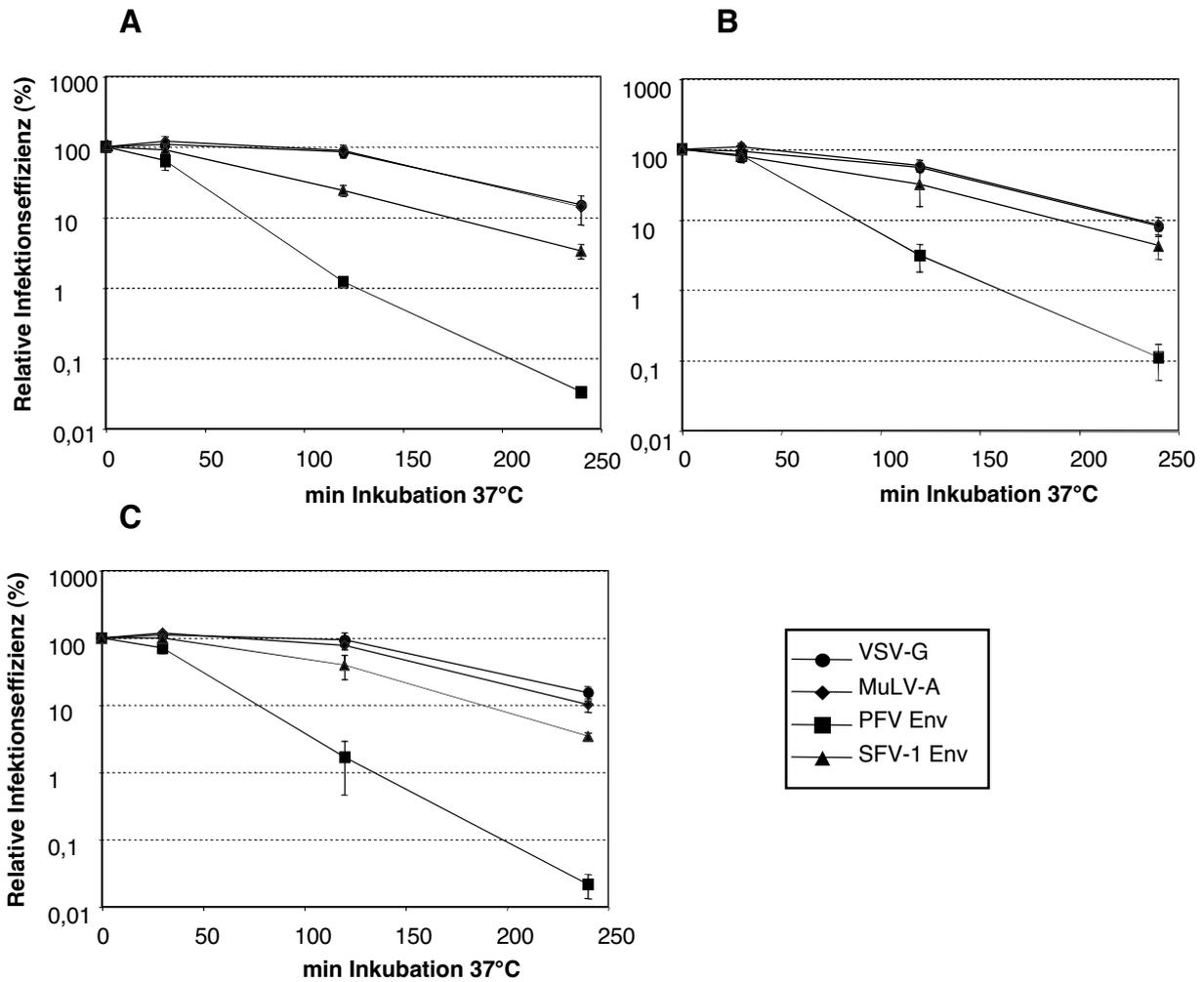


Fig. 20: Analyse der Stabilität von pseudotypisierten MuLV Partikeln bei 37°C in Gegenwart von Ammoniumchlorid und Concanamycin A. Zellfreie Überstände mit pseudotypisierten MuLV Partikeln wurden durch Cotransfektion von 293T Zellen mit pHT60, pczCFG2NLS-LacZ und den jeweiligen Env Expressionskonstrukten hergestellt. Die Überstände wurden ohne Agenzien, mit 15 nM Concanamycin A oder mit 50 mM Ammoniumchlorid für 4h in Gegenwart von 8 µg/ml Polybrene bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 2 h und 4 h nach Beginn der Inkubation wurde ein Teil der Überstände entnommen und auf HT1080 Zellen in Gegenwart von 8 µg/ml Polybrene titriert. Der Titer konnte 48 h nach Infektion durch eine histochemische β-Galactosidasefärbung bestimmt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Versuchen mit dem Standardfehler des Mittelwerts. Auf der Y-Achse ist die relative Infektionseffizienz angegeben, als 100%-Wert wurde der jeweilige Titer zum Zeitpunkt 0 min nach Beginn der Inkubation festgelegt. (A) Inkubation bei 37°C ohne Agenzien. (B) Inkubation bei 37°C mit 50 mM Ammoniumchlorid. (C) Inkubation bei 37°C mit 15 nM Concanamycin A. (VSV-G) Überstände von Cotransfektion mit pczVSV-G; (MuLV-A) Überstände von Cotransfektion mit pHT456; (PFV Env) Überstände von Cotransfektion mit pczHFVenvEM64; (SFV-1 Env) Überstände von Cotransfektion mit pciSFV-1EnvSM01.

3.1.3 Analyse der pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität des FV Hüllproteins

3.1.3.1 Analyse der Induktion der Fusionsaktivität

Die Analyse der Induktion der Fusionsaktivität von FV Hüllproteinen konnte durch eine pH-abhängige Fusionsanalyse durchgeführt werden. HT1080 Zellen wurden mit Hüllproteinexpressionskonstrukten transfiziert, 24 h nach Transfektion abgelöst, mit derselben Anzahl HT1080-NLSLacZ Zellen gemischt und ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie für 30 min in PBS pH 7,2 bis pH 5,0, danach für 24 h mit Medium im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und anschließend einer histochemischen β -Galactosidase Färbung unterzogen. Die Fusionsaktivität konnte durch Bildung von Syncytien beobachtet und quantitativ durch die Bestimmung der Anzahl an Syncytien pro cm^2 Kulturfläche bestimmt werden. Die histochemische β -Galactosidase Färbung, durch die alle Zellkerne der HT1080-NLSLacZ Zellen und aller an Syncytien mit HT1080-NLSLacZ Zellen beteiligten HT1080 Zellen sichtbar gemacht wurden, diente lediglich einer leichteren Bestimmung der Anzahl an Syncytien. Als Syncytium wurde eine vielkernige Riesenzelle mit drei oder mehr Zellkernen gewertet. Bei den Negativkontrollen mock-transfizierter Zellen und MuLV-A Env exprimierender Zellen konnte keine Fusionsaktivität festgestellt werden (Fig. 21, Fig. 22 A+C). Um die Fusionsaktivität zu erlangen, muss bei MuLV-A Env von der viralen Protease ein 16 AS C-terminales Peptid vom cytoplasmatischen Schwanz der TM-Domäne, das R-Peptid, abgeschnitten werden (Green et al., 1981). Deshalb kann man davon ausgehen, dass in diesem Versuch die MuLV-A Hüllproteine, die ohne weitere virale Proteine exprimiert werden, nicht fusionsfähig sind. Um die Fusionsaktivität zu ermöglichen wurde eine Mutante mit einem Stopcodon vor dem R-Peptid konstruiert (MuLV-A Env R-, Fig. 12). Von solchen Mutanten wurde bereits eine hohe Fusionsaktivität beschrieben (Rein et al., 1994; Yang & Compans, 1997). Die Fusionsaktivität von Zellen, die dieses Hüllprotein exprimieren, war bereits bei neutralem pH sehr hoch (Fig. 21+22 D) und verschob sich bei saurem pH leicht nach unten (Fig. 21). Diese Daten bestätigten die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse und belegten, dass MuLV-A Env in dieser experimentellen Umgebung ein pH-unabhängiges Fusionsverhalten zeigt.

Ergebnisse

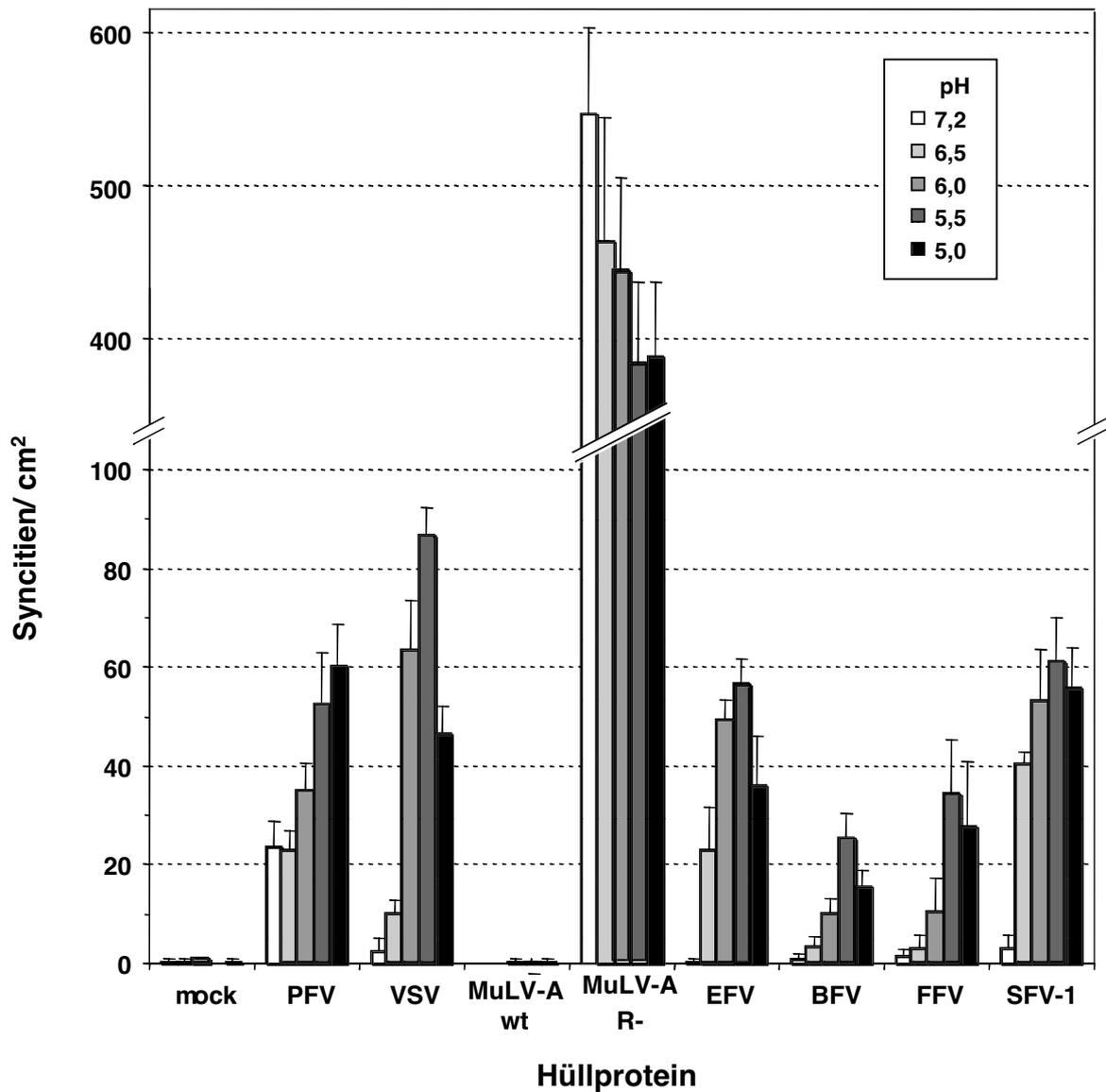


Fig. 21: Analyse der pH-abhängigen Fusionsaktivität von FV Hüllproteinen. HT1080 Zellen wurden mittels Fugene6 Transfektion mit Hüllprotein-Expressionsplasmiden transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst, gezählt und je 10^5 Zellen mit derselben Menge HT1080-NLSLacZ Zellen vermischt und in 24-Well Platten ausgesät. Ungefähr 4 h später, nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie für 30 min bei 37°C mit PBS mit unterschiedlichem pH-Wert zwischen 7,2 und 5,0 inkubiert. Nach der pH-Inkubation wurden die Zellen mit Medium gewaschen und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und durch eine histochemische β -Galactosidasefärbung gefärbt. Die Anzahl der Syncytien pro cm^2 Kulturfläche konnte durch Auszählen am Mikroskop bestimmt werden, wobei vielkernige Riesenzellen mit drei oder mehr Zellkernen als Syncytien gewertet wurden. Auf der Y-Achse ist die Anzahl Syncytien pro cm^2 Kulturfläche dargestellt, auf der X-Achse das jeweils exprimierte Hüllprotein. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils drei Versuchen. Verwendete Expressionsplasmide: (mock) pCDNA3.1zeo; (PFV) pczHFVenvEM02; (VSV) pczVSV-G; (MuLV-A wt) pcziMEA; (MuLV-A R-) pcziMEAR-; (EFV) pciEFVenv; (BFV) pczBFVenv; (FFV) pczFFVenv; (SFV-1) pciSFV-1env.

Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die das VSV Glykoprotein exprimieren. Die VSV-G vermittelte Infektion wurde als pH-abhängig beschrieben, der Eintrittsmechanismus von VSV-Partikeln ist als rezeptorvermittelte, clathrin-abhängige Endocytose, deren Fusionsaktivität vermutlich in späten Endosomen aktiviert wird, bekannt (Skehel & Wiley, 2000; Russell & Marsh, 2001). Wie in Fig. 21 und Fig. 22 B ersichtlich, sind VSV-G exprimierende Zellen bei pH 7,2 fast nicht fusionsaktiv; bei sinkendem pH-Wert wird jedoch eine Fusionsaktivität induziert, die am stärksten bei pH 5,5 ausgeprägt ist. In späten Endosomen liegt der pH-Wert in dieser Größenordnung, in frühen Endosomen allerdings bei pH 6,2 (Russell & Marsh, 2001). Da man davon ausgeht, dass bei der rezeptorvermittelten Endocytose eine durch den intraendosomal pH-Wert ausgelöste und durch das virale Hüllprotein vermittelte Fusion der viralen Membran mit der endosomalen Membran erfolgt, liegen diese Befunde im Bereich der Erwartungen.

Für PFV Env wurde bei neutralem pH eine basale Fusionsaktivität nachgewiesen, die vermutlich maßgeblich durch eine konservierte Sequenz in der Membranspannenden Domäne beeinflusst wird (Pietschmann et al., 2000). In Fig. 21 konnte gezeigt werden, dass PFV Env bereits bei neutralem pH eine Fusionsaktivität besitzt, die durch ein saures Milieu gesteigert werden kann. Ihre maximale Stärke wird bei pH 5,5 bis pH 5, ungefähr dem dreifachen Wert der basalen Fusionsaktivität bei pH 7,2, erreicht. Allerdings weisen alle mit anderen FV Hüllprotein Expressionskonstrukten transfizierte Zellen eine sehr niedrige basale Fusionsaktivität bei neutralem pH auf, die durch saures Milieu aber stark induziert wird und ihre maximale Stärke bei pH 5,5 bei pH 5,0 erreicht (Fig. 21). In Fig. 22 ist die Syncytienbildung aus Ergebnissen von Fig. 21 bei pH 7,2 und pH 5,5 dargestellt. Die Auswirkung von lysosomotropen Agenzien auf die Induktion der Fusionsaktivität von FV Env exprimierenden Zellen in der pH-abhängigen Fusionsanalyse konnte nicht untersucht werden, da die Kombination von PBS pH 5,5 und lysosomotropen Agenzien in höheren Konzentrationen für die Zellen sehr toxisch war und zu einer Lethalität von über 50% führte.

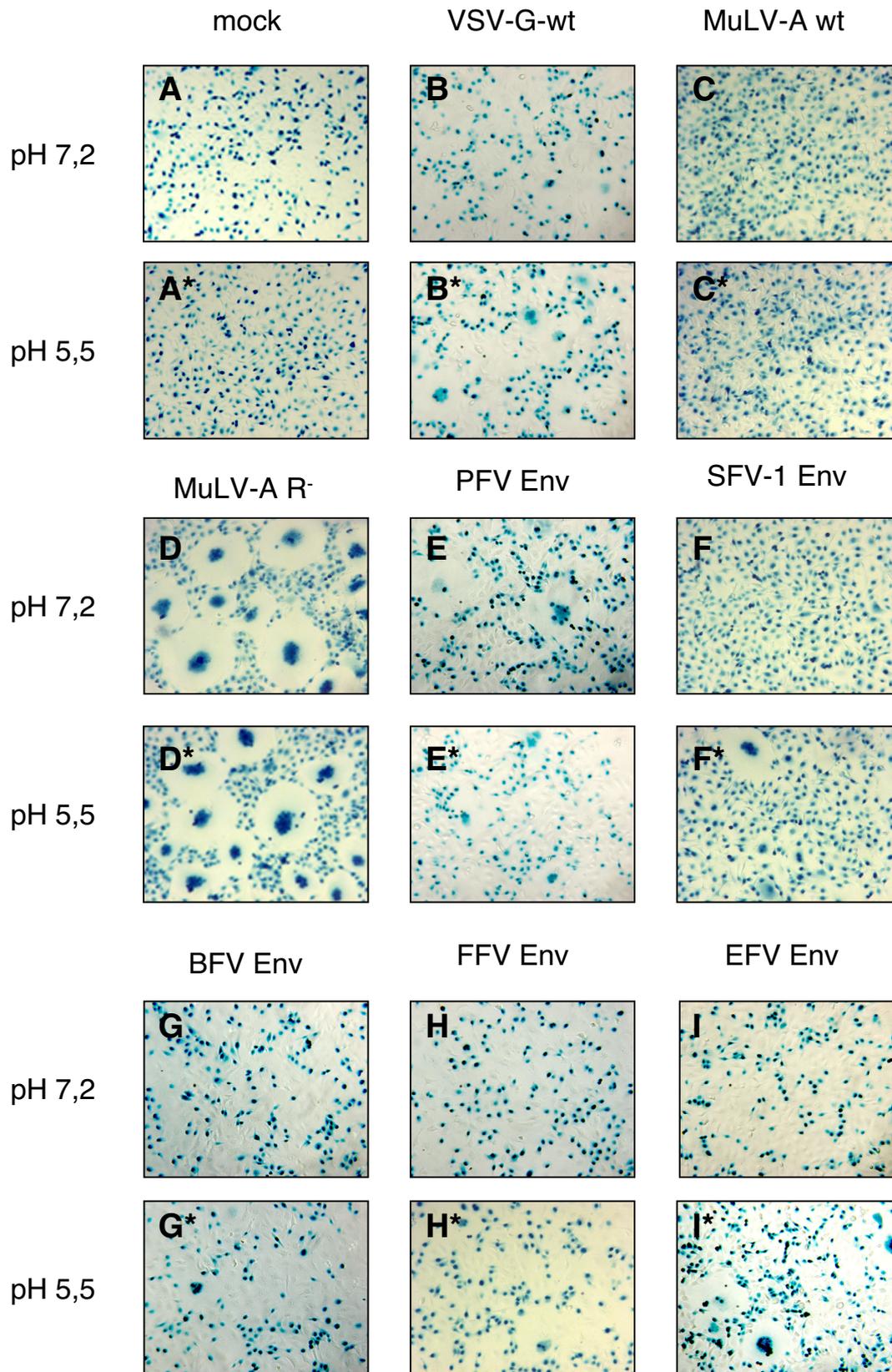


Fig. 22: Fusionsinduktion bei FV Env exprimierenden Zellen in saurem Milieu. Aufnahmen von Experimenten aus Fig. 21. Vergrößerung 120X. Erläuterungen bei Fig. 21 und im Text.

3.1.3.2 Kinetik der Induktion der Fusionsaktivität

Um die Kinetik der Induktion der Fusionsaktivität zu analysieren, wurde ein Verlaufs-Experiment durchgeführt. Wie zuvor (3.1.3.1) wurden HT1080 Zellen mit Hüllprotein Expressionskonstrukten transfiziert, nach 24 h abgelöst, mit der gleichen Anzahl HT1080-NLSLacZ Zellen vermischt und ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie für die Dauer von 0,5 min bis 5 min in PBS pH 5,5 inkubiert. Die Fusionsanalyse wurde wie in 3.1.3.1 beschrieben durchgeführt.

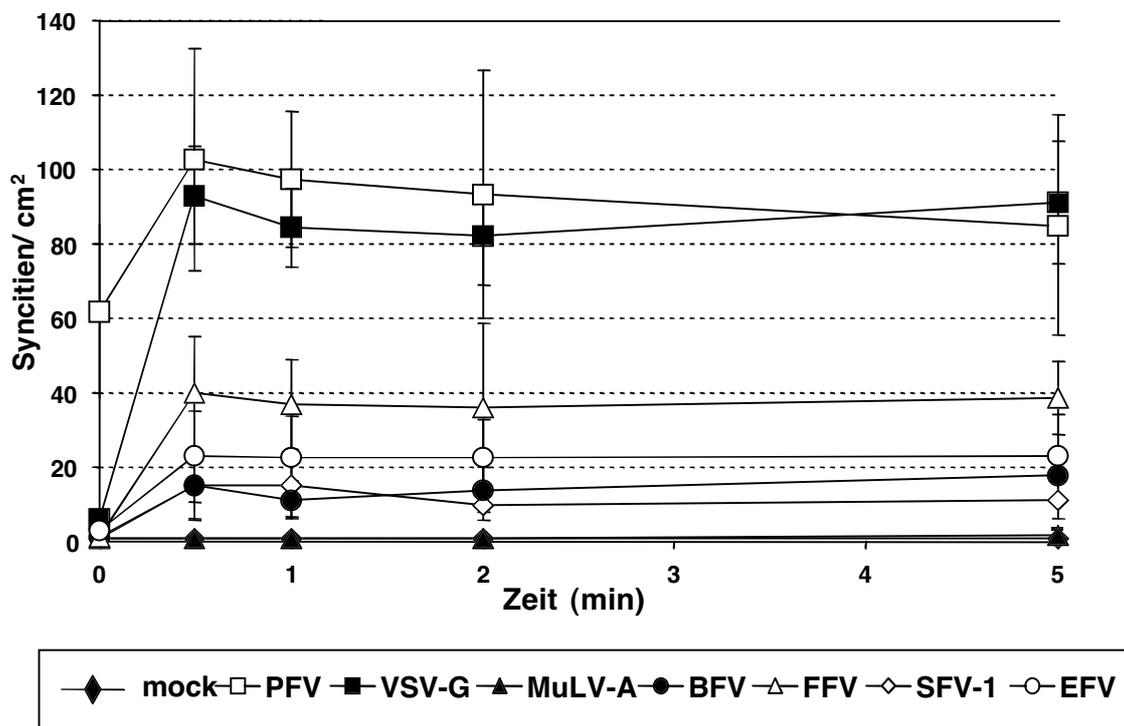


Fig. 23: Zeitkurs der Induktion der Fusionsaktivität von FV Hüllproteinen. HT1080 Zellen wurden mittels Fugene6 Transfektion mit Hüllprotein Expressionsplasmiden transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst, gezählt und je 10^5 Zellen mit derselben Menge HT1080-NLSLacZ Zellen vermischt und in 24-Well Platten ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, ungefähr 4 h später, wurden sie für 0,5 min bis 5 min bei 37°C in PBS mit pH 5,5 inkubiert. Nach der pH-Inkubation wurden sie mit Medium gewaschen und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und es wurde eine histochemische β -Galactosidasefärbung durchgeführt. Die Anzahl der Syncytien pro cm^2 Kulturfläche konnte durch Auszählen am Mikroskop bestimmt werden, wobei vielkernige Riesenzellen mit 3 oder mehr Zellkernen als Syncytien gewertet wurden. Auf der Y-Achse ist die Anzahl Syncytien pro cm^2 Kulturfläche dargestellt, auf der X-Achse die Dauer der Inkubation in PBS pH 5,5 in min. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von jeweils drei Versuchen. Verwendete Expressionsplasmide: (mock) pCDNA3.1zeo; (PFV) pczHFVenvEM02; (VSV) pczVSV-G; (MuLV-A wt) pHIT456; (EFV) pSG5EFVenv; (BFV) pczBFVenv; (FFV) pczFFVenv; (SFV-1) pczSFV-1env.

Bereits nach 30 sec Inkubation in saurem Milieu erreichten alle FV Env exprimierenden Zellen und die VSV-G exprimierenden Zellen ihre maximale Fusionsaktivität (Fig. 23), während bei mock transfizierten Zellen und MuLV-A exprimierenden Zellen keine Fusionsaktivität beobachtet werden konnte. Die PFV Env exprimierenden Zellen zeigten auch hier als einzige FV Env exprimierende Zellen eine deutliche basale Fusionsaktivität bei neutralem pH (Fig. 23). Inkubationen mit kürzerer Dauer als 0,5 min in PBS pH 5,5 waren aus technischen Gründen nicht möglich. Die Induktion der Fusionsaktivität von FV Hüllproteinen, die zeitlich wie die von VSV-G verläuft (Fig. 23), scheint ein sehr schneller Prozess zu sein, der möglicherweise über eine Konformationsänderung des Hüllproteins in saurem Milieu verläuft und damit die Fusionsaktivität induziert. Bei der VSV-G vermittelten Infektion findet vermutlich eine durch sauren pH induzierte Konformationsänderung des Hüllproteins statt, die eine Fusion der viralen Membran mit der endosomalen Membran und damit eine Freisetzung des Capsids in das Cytoplasma ermöglicht (Russell & Marsh, 2001).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten auf einen ähnlichen Eintrittsweg für die FV Env vermittelte Infektion hin, der sich dennoch von dem der VSV-G vermittelten Penetration unterscheiden muss, da die FV Env vermittelte Infektion im Gegensatz zur VSV-G vermittelten nicht von Chloroquin inhibiert wird (Fig. 15).

3.2 Konstruktion und Charakterisierung von Adenovirus-Foamyvirus Hybridvektoren

3.2.1 Ad-FV Hybridvektoren

3.2.1.1 Konstruktion von Ad-FV Hybridvektoren

Adenovirus-Foamyvirus (Ad-FV) Hybridvektoren sollen die Vorteile der adenoviralen und foamyviralen Vektorsysteme kombinieren, um so ein effizientes Werkzeug zum Gentransfer zu schaffen. Der Vorteil der adenoviralen Vektoren liegt darin, dass sie als HC-Ad Vektoren ein großes Verpackungslimit (35 kB) haben und mit hohen Titern herzustellen sind (bis zu 10^{12} U/ml); der der foamyviralen Vektoren liegt in der Fähigkeit zur stabilen Transduktion mit Integration der Vektor DNA in das Genom der Zielzelle. Ad-FV Hybridvektoren sollen die Herstellung von regulär integrierenden, in hohen Titern produzierbaren viralen Vektoren ermöglichen. Die offensichtliche Apathogenität der Foamyviren (1.2.1), der intrazelluläre Replikationszyklus (1.2.3) und die für retrovirale Vektoren hohe Verpackungskapazität von über 9 kB (1.4.2) macht Foamyviren zu aussichtsreichen Kandidaten bei der Konstruktion von Adenovirus-Retrovirus Hybridvektoren.

In dieser Arbeit wurden auf Adenovirus 5 (Ad5) und PFV Basis Ad-FV Hybridvektoren entwickelt. Bei diesen Vektoren handelt es sich um HC-Ad Vektoren (1.4.3.5), die eine FV Vektor Kasette im Genom enthalten (Fig. 24). Als Stuffer-DNA wurden Sequenzen aus dem humanen HPRT Locus verwendet (1.4.3.5).

Im Ad-FV Vektor AdMH88 wurde die FV Vektor Kasette pMH88 in den auf Ad5 basierenden HC-Ad Vektor STK134 eingesetzt (Fig. 24 A+C). Zwischen den adenoviralen ITRs (1.4.1) befindet sich eine kurze multiple Klonierungssequenz, in die ein 19952 bp *BamHI* Fragment des humanen HPRT Locus und die FV Vektor Kasette kloniert wurden. In der FV Vektor Kasette sind zwischen den FV LTRs die FV gag/pol ORFs angeordnet. Innerhalb des FV Genoms liegt auch eine EGFP Expressionskasette unter Kontrolle eines SFFV U3-Promotors als Markergen. Vor dem FV Vektor befindet sich ein CMV-Promotor, der dessen Expression kontrolliert.

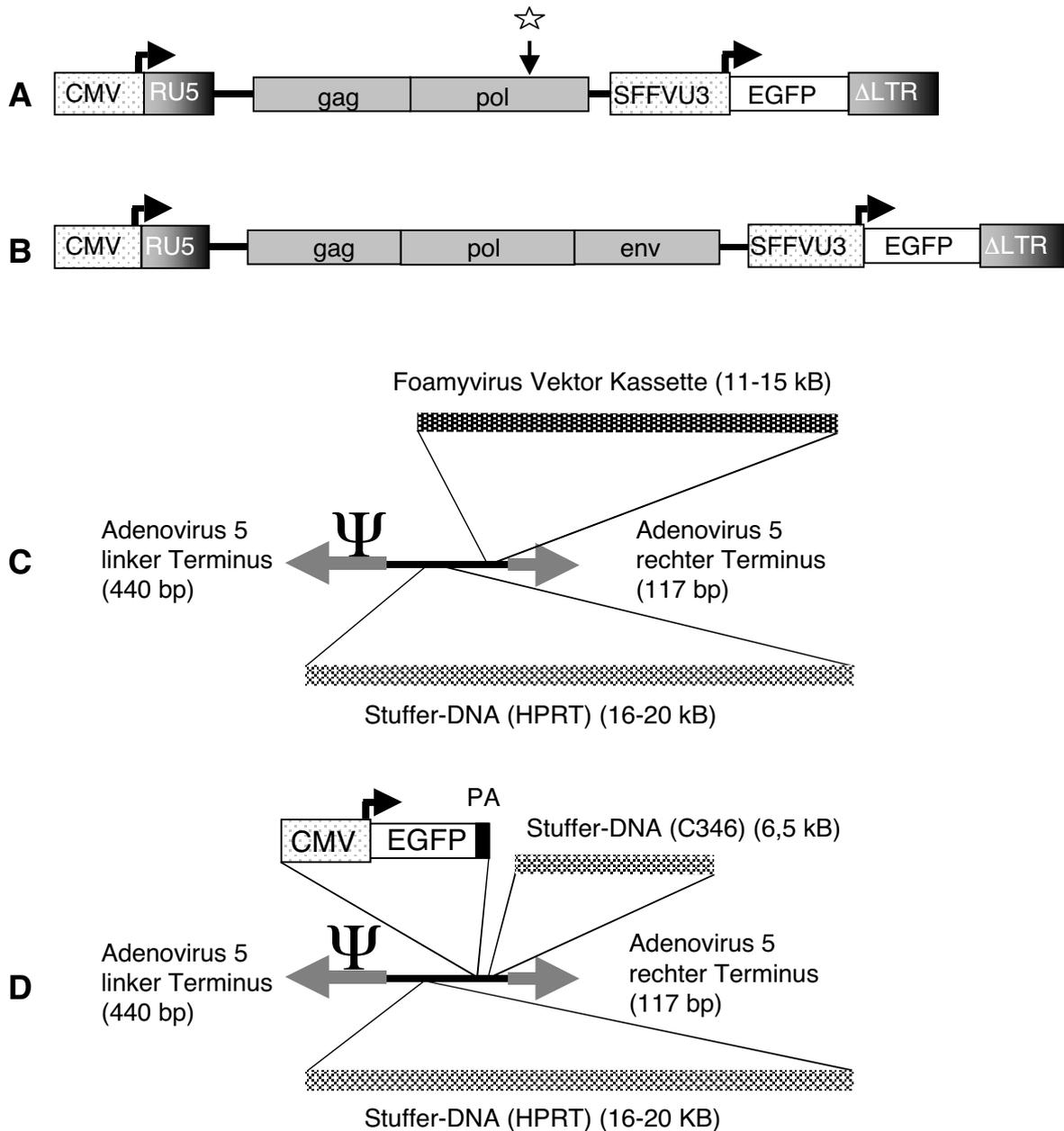


Fig. 24: Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren. (A) FV Kasette der Ad-FV Vektoren AdMH88 und AdMH91. An der mit einem Stern markierten Stelle wurde bei AdMH91 mit einer Mutation des katalytischen Zentrums die Integrase inaktiviert (2.1.11.1). (CMV) hCMV-Promotor, (SFFVU3) Spleen Focus Forming Virus U3-Promotor, (EGFP) verstärktes grün fluoreszierendes Protein. (B) FV Kasette des Ad-FV Vektors AdMH87; zusätzlich zu den in AdMH88 enthaltenen Sequenzen wurde ein PFV env ORF eingefügt. (C) Ad-FV Vektoren: Zwischen den adenoviralen ITRs befindet sich eine HPRT Stuffer-Sequenz (STK134 19952 bp, STK68 16054 bp). (Ψ) Verpackungssignal. In die NotI bzw. BamHI Schnittstelle in der schwarz dargestellten multiplen Klonierungssequenz wurden die FV Vektor Kassetten MH88/MH91 (in STK134) und MH87 (in STK68) integriert. (D) HC-Ad Vektor AdFK7 (Kreppel et al., 2002[a]); zwischen den Adenovirus 5 ITRs befinden sich von links nach rechts das oben beschriebene 19952 HPRT Stuffer-Fragment, eine EGFP Expressionskasette unter Kontrolle eines CMV-Promotors und ein 6725 bp Stuffer-Fragment aus dem humanen C346 Locus. (PA) Polyadenylierungssignal.

Das 32025 bp Plasmid pAdMH88 wurde durch Klonierung eines 8518 bp *PmeI* pMH88 Fragments in die mit Klenow Polymerase aufgefüllten Überhänge der *NotI* Schnittstelle des HC-Ad Vektorplasmids pSTK134 hergestellt.

Der Vektor AdMH91 (Fig. 24 A) entspricht AdMH88, enthält jedoch eine Mutation im katalytischen Zentrum der FV Integrase (Enssle et al., 1999; Brown et al., 1997), die zu deren Inaktivierung führt (2.1.11.1). Das Plasmid pAdMH91 mit einer Länge von 32025 bp, wurde ähnlich wie pAdMH88, durch Ligation eines 8518 bp *PmeI* pMH91 Fragments in die mit Klenow Polymerase aufgefüllten Überhänge der pSTK134 *NotI* Schnittstelle kloniert.

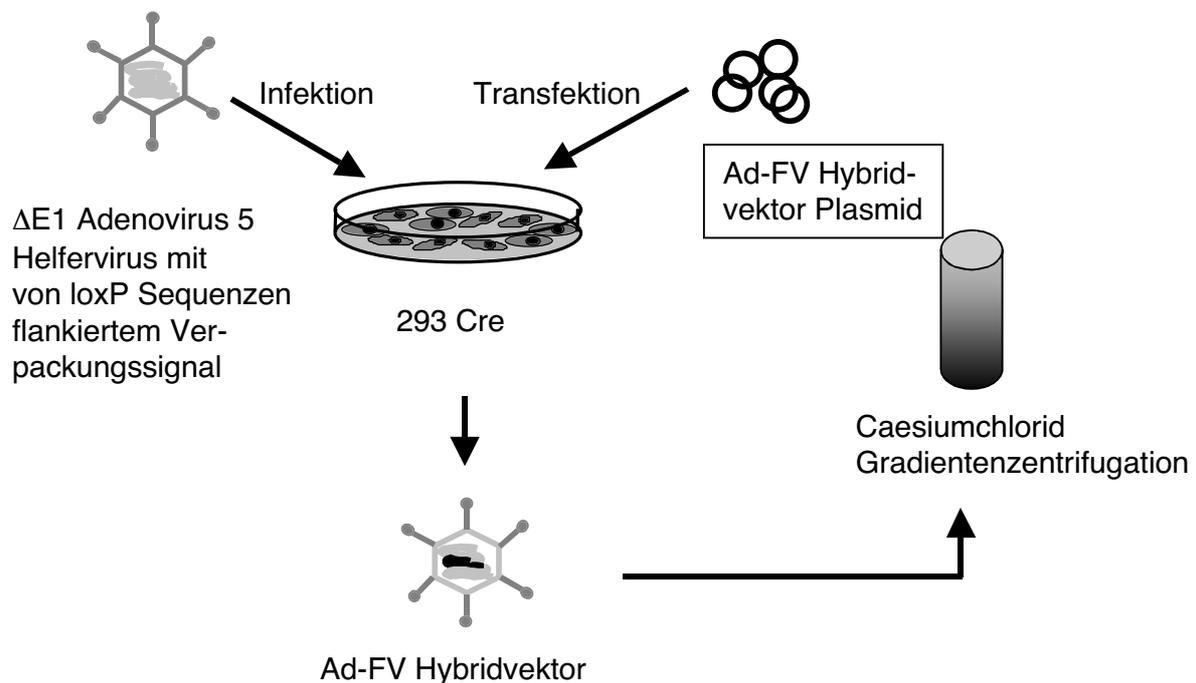


Fig. 25: Schematische Darstellung der Verpackung der Ad-FV Hybridvektoren. Die adenoviralen Genome wurden durch *PmeI* Verdau aus den Plasmiden geschnitten und danach in 293 Cre66 Zellen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit ΔE1 loxP Helfervirus AdLC8cluc (Parks et al., 1996) infiziert (Schiedner et al., 2002; Kreppel et al., 2002[b]). Das Helfervirus kann mit Hilfe der von den 293 Zellen bereitgestellten E1 Genprodukte eine funktionale Replikation durchlaufen, jedoch wird das Verpackungssignal der Genome der Helferviren, das von loxP Erkennungstellen umgeben ist, von der Cre-Rekombinase entfernt; dadurch werden nur die transfizierten Genome verpackt (1.4.3.5). Nach mehreren Reinfektionszyklen wurden die Partikel über eine Caesiumchlorid-Gradientenzentrifugation zur Entfernung von Helfervirus aufgereinigt.

Der Vektor AdMH87 entspricht ebenfalls dem Vektor AdMH88, zusätzlich ist aber noch ein PFV env ORF enthalten (Fig. 24 B). Als Adenovirusvektor für MH87 diente STK68 (Fig. 24 C), der im Gegensatz zu STK134 ein kürzeres HPRT Stuffer-Fragment (16054 bp) enthält, um den Einbau der längeren FV Vektor Kasette zu ermöglichen. Das 30990 bp Vektorplasmid pAdMH87 wurde durch Ligation eines 11345 bp *PmeI* pMH87 Fragments in die mit Klenow Polymerase aufgefüllten Überhänge der *BamHI* Schnittstelle von pSTK68 kloniert.

Die Integrität aller Konstrukte wurde durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse bestätigt.

Der HC-Ad Vektor AdFK7 (Kreppel et al., 2002[a]) besteht aus einem HC-Ad Vektor auf Adenovirus 5 Basis, der zwei Stuffer-Fragmente und eine EGFP Expressionskasette unter Kontrolle eines CMV-Promotors enthält (Fig. 24 D).

Die viralen Genome wurden mit Hilfe eines Helfervirus mit dem Cre/loxP System verpackt und über eine Caesiumchlorid-Gradientenzentrifugation aufgereinigt (Fig. 25) (1.4.3.5). Nach der Aufreinigung fand eine Titration der Partikel über Slot Blot Verfahren und Infektionsanalysen statt, dabei wurde der physikalische Titer und der Anteil infektiöser Partikel bestimmt (1.4.3.5) (Kreppel et al., 2002[b]). Mit den Ad-FV Hybridvektoren konnten Titer von 10^8 bis 10^{10} infektiösen Partikeln pro ml (iU/ml) erreicht werden. Die Verpackung und Titration der Vektoren wurde im Labor von Stephan Kochanek am ZMMK, Köln, durchgeführt.

Der putative Infektionszyklus

Das Adenovirus wird in die Zelle aufgenommen, das Genom entpackt und in den Zellkern transportiert. Darauf werden über den CMV-Promotor die FV Genprodukte transient exprimiert und eine FV Vektor RNA transkribiert sowie über den SFFVU3-Promotor das GFP Markergen transient exprimiert. Im Cytoplasma bilden sich FV Capside, die über den intrazellulären Reintegrationszyklus (Heinkelein et al., 2000) das FV Genom stabil in das Genom der Wirtszelle integrieren können. Von dem Integrat wird nur noch das Markergen stabil exprimiert, da der CMV-Promotor nicht mehr im Genom des FV Vektors enthalten ist (AdMH88) (Fig. 26). Wenn noch ein FV env ORF im FV Genom vorhanden ist, knospen auch Partikel in das ER und an der Zellmembran und werden aus der Zelle freigesetzt. Diese Partikel können be-

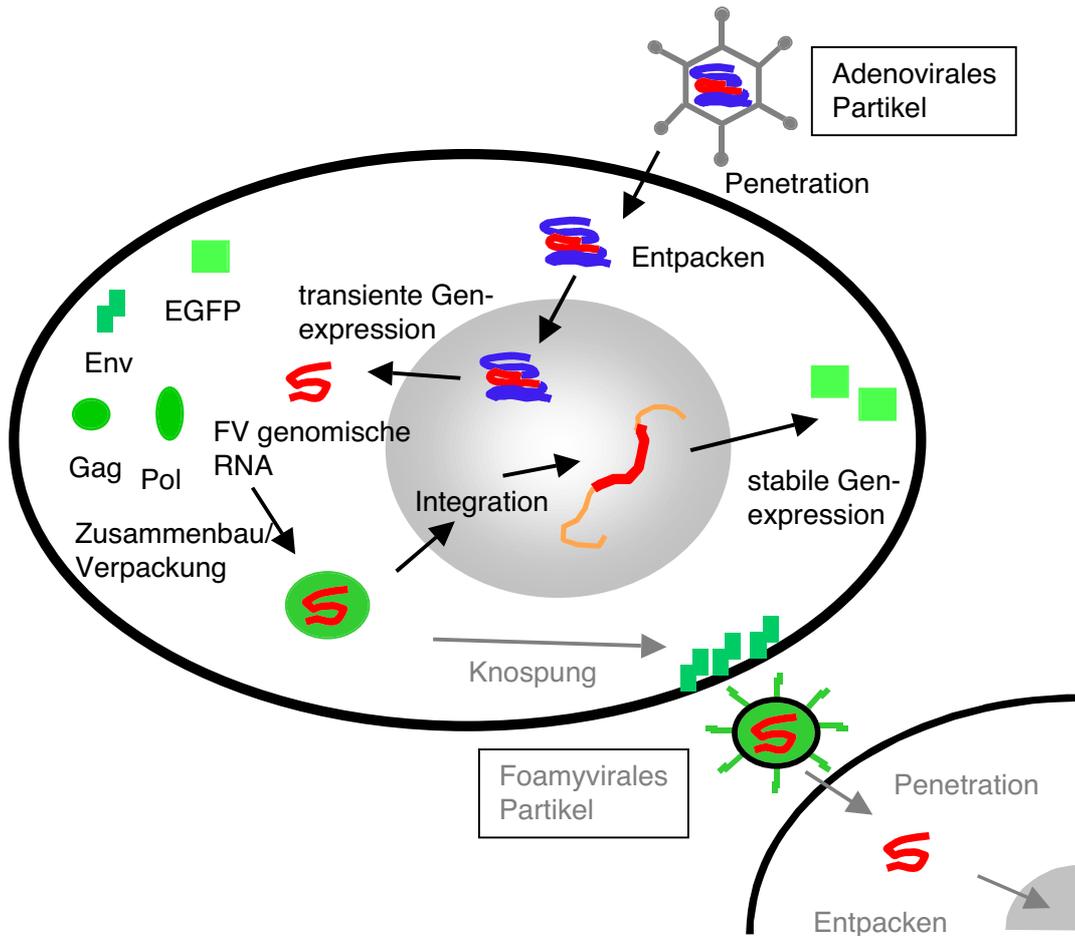


Fig. 26: Transduktionsmechanismus der Ad-FV Hybridvektoren. Die HC-Ad Vektor DNA ist blau dargestellt, die FV DNA rot, die genomische DNA der Zielzelle orange. In grau unterlegt wird der Transduktionsmechanismus über einen Sekundärzyklus der Ad-FV Hybridvektoren, die ein FV env ORF enthalten, dargestellt.

nachbarte Zellen transduzieren, in denen dann das GFP Markergen stabil exprimiert wird (AdMH87) (Fig. 26).

3.2.1.2 Analyse der Vektorgenome und der Genexpression der Ad-FV Vektoren

Zur Analyse der viralen Genome wurde virale DNA direkt aus den hergestellten Ad-FV Vektoren oder mit genomischer DNA von 48 h infizierten HeLa Zellen präpariert. Die DNA wurde zusammen mit einer Plasmidkontrolle der viralen Genome im Southern Blot Verfahren mit ^{32}P markierten Sonden verschiedener Regionen des viralen Genoms untersucht (Fig. 27). Zur Analyse der CMV-Promotor Region (Fig. 28 A)



Fig. 27: Schematische Darstellung der Regionen des viralen Genoms, die mit den jeweiligen Sonden in der Southern Blot Analyse hybridisieren. (Ad ITR Sonde) 447 bp PmeI/EcoRV Fragment von pAdMH88 als Matrize, umfasst linke ITR Region; (CMV Promotor Sonde) 605 bp MluI/SacI Fragment von pMH88 als Matrize, umfasst ges. CMV Promotor Region; (FV gag/pol Sonde) 1830 bp PacI/SwaI Fragment von pcgp-1 als Matrize, umfasst die letzten 299 bp von gag und die ersten 1531 bp von pol.

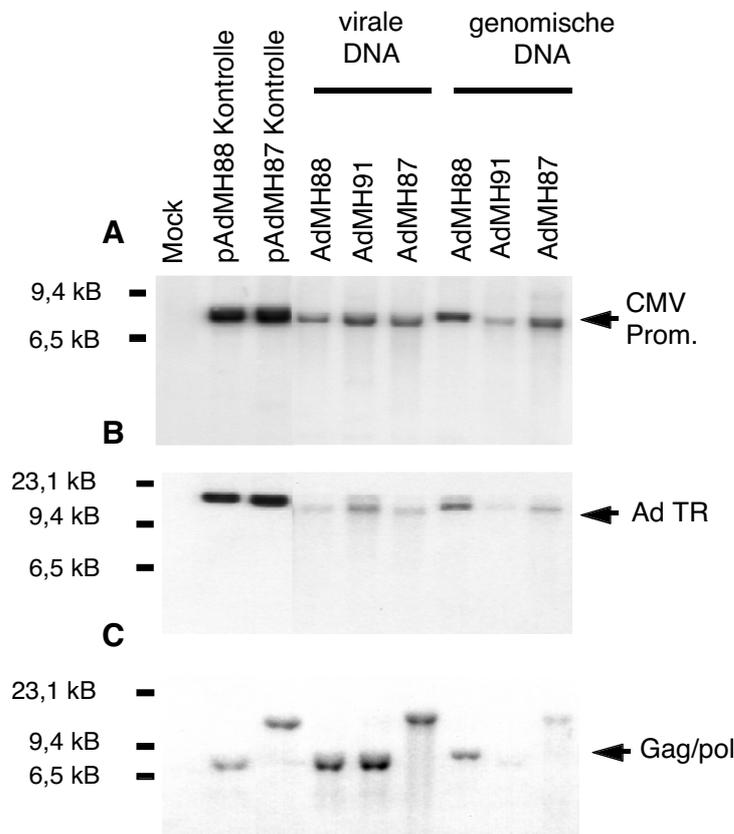


Fig. 28: Southern Blot Analyse der viralen Genome. Aufgetragen wurden je 1 ng virale DNA mit 10 μ g genomischer DNA von HeLa wt Zellen und je 10 μ g DNA von 48 h mit MOI 100 infizierten HeLa Zellen. Die Blots wurden je 4 h mit der jeweiligen Sonde bei 68°C hybridisiert, danach unter stringenten Bedingungen gewaschen und für 15-20 h bei -80°C zur Belichtung abgelegt. (A) Hybridisierung HindIII verdauter DNA mit CMV-Promotor Sonde (Fig. 27). (B) Hybridisierung NcoI verdauter DNA mit Adenovirus ITR Sonde (Fig. 27). (C) Hybridisierung EcoRI verdauter DNA mit FV gag/pol Sonde (Fig. 27). Als Kontrolle wurden die Plasmide pAdMH88/pAdMH87 in einer Konzentration von einer Kopie pro zellulärem Genom mit je 10 μ g genomischer HeLa wt DNA verwendet.

wurde ein *HindIII* Verdau durchgeführt, und der Southern Blot wurde mit einer CMV Promotor Sonde (Fig. 27) hybridisiert. Bei den Vektoren AdMH88/91 war ein 7470 bp, bei AdMH87 ein 7456 bp internes Fragment zu erwarten. Die Plasmidkontrollen sollten Banden der gleichen Größen zeigen. Die Analyse der linken ITR Region (Fig. 28 B) wurde mit *NcoI* verdauter DNA und einer Ad ITR Sonde (Fig. 27) durchgeführt. Hier war für AdMH88 und AdMH91 ein 17925 bp Fragment und für AdMH87 ein 16949 bp Fragment zu erwarten. Die pAdMH88 Plasmidkontrolle sollte eine 22545 bp Bande, die pAdMH87 Plasmidkontrolle eine 21583 bp Bande zeigen. Als dritte Region wurde die in der FV Vektor Kasette gelegene gag/pol Übergangsregion untersucht (Fig. 28 C); dazu wurde *EcoRI* verdaute DNA wurde mit einer FV gag/pol Sonde (Fig. 27) hybridisiert. Bei AdMH88 und AdMH91 wurde ein 7439 bp Fragmente erwartet, bei AdMH87 ein 14673 bp Fragment, die Plasmidkontrolle sollte Banden derselben Größe zeigen.

Im Southern Blot konnte die Integrität der analysierten Bereiche der Vektorgenome nachgewiesen werden. Die erwarteten Banden der CMV-Promotor Region konnte ebenso (Fig. 28 A) wie die der ITR Region (Fig. 28 B) und der FV gag/pol Region (Fig. 28 C) gezeigt werden.

Zur Analyse der Proteinexpression wurden A549 und HeLa Zellen mit MOI 100 für 48 h infiziert; aus den infizierten Zellen wurden Lysate gewonnen, die auf einem Acrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot Verfahren mittels Immunblot analysiert werden konnten. Dazu wurden monoklonale α PFV Gag und α PFV Pol RT Antikörper verwendet. Auf dem Blot (Fig. 29) sind die Gag pr71/p68 Doppelbanden bei AdMH88 und AdMH87 infizierten Zellen gut zu detektieren, jedoch nicht bei AdMH91 infizierten Zellen. Die Expression des Pol Vorläuferproteins pr127 und der RT p80 kann allerdings bei allen Hybridvektoren detektiert werden. Die AdFK7 infizierten Zellen zeigen wie erwartet keine FV Gag/Pol Expression. Aufgrund der nicht-funktionalen Gag Expression von pAdMH91 wurde dieser Vektor bei weiteren Versuchen nicht mehr verwendet.

3.2.1.3 Infektionsanalyse

HeLa und A549 Zellen wurden mit den Vektoren AdMH88, AdMH87 und AdFK7 mit MOI 10 (Daten nicht gezeigt), MOI 30 und MOI 100 infiziert. Die infizierten Zellen wurden für 21 Tage in Kultur gehalten; an den Tagen 2, 7, 14 und 21 nach Infektion

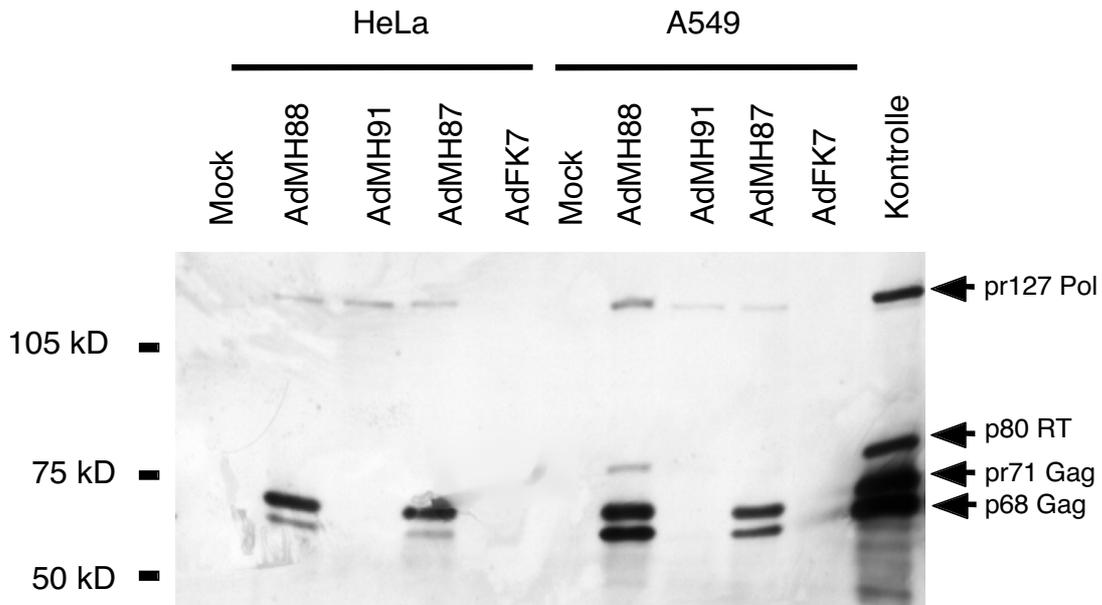


Fig. 29: Western Blot Analyse der Proteinexpression von mit Ad-FV Hybridvektoren infizierten Zellen. HeLa und A549 Zellen wurden für 48 h mit MOI 100 infiziert, die Lysate wurden auf einem 7,5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membran geblottet. Als primärer AK wurden α PFV Gag SGG1 Hybridomaüberstand (1:5) und α PFV Pol RT 15E10 Hybridomaüberstand (1:3) verwendet. Als sekundärer AK diente Ziege α Maus-HRP (1:1000).

(Kontrolle) Lysat mit *pcgp-1* (PFV gag/Pol Expressionsplasmid) transfizierten 293T Zellen; (pr127 Pol) Pol Vorläuferprotein p127; (p80 RT) Reverse Transkriptase p80; (pr71Gag) Gag Vorläuferprotein p71; (p68 Gag) Gag Protein p68.

wurde ein Aliquot der infizierten Zellen fixiert und in der FACS Analyse auf GFP Expression untersucht. Die Infektionsanalyse mit A549 Zellen zeigte, dass bei Infektion mit AdMH88 an Tag 21 nach Infektion 5 mal mehr Zellen stabil GFP exprimieren als bei Infektion mit AdFK7 (Fig. 30 A+C). Unter den mit AdMH87 infizierten Zellen fanden sich bei MOI 100 um den Faktor 381, bei MOI 30 um den Faktor 201 mehr stabil transduzierte Zellen (Fig. 30 A+C). In AdMH88 infizierten HeLa Zellen waren dagegen an Tag 21 bei MOI 100 nur um den Faktor 2, bei MOI 30 um den Faktor 3 mehr GFP positive Zellen als in AdFK7 infizierten, unter AdMH87 infizierten HeLa Zellen bei MOI 100 um den Faktor 9, bei MOI 30 um den Faktor 14 (Fig. 30 B, D). Die Effizienz des stabilen Gentransfers ist von der eingesetzten MOI und dem infizierten Zelltyp abhängig (Fig. 30); so zeigt sich die Zelllinie A549 (Fig. 30 A, C) etwas besser transduzierbar als HeLa (Fig. 30 B, D).

Diese Analysen wurden in einzelnen Experimenten bis zu einer Dauer von 56 Tagen durchgeführt, um die Integrität der Ergebnisse zu gewährleisten. Dabei ergaben sich keine signifikanten Änderungen des Anteils GFP exprimierender Zellen ab Tag 21.

Zur Kontrolle der Freisetzung foamyviraler Partikel wurde jeweils an Tag 7 nach Infektion ein Überstandtransfer auf HeLa Zellen durchgeführt. Zellfreier Überstand der mit Ad-FV Vektoren infizierten Zellen wurde für 4 h auf HeLa Zellen gegeben, 48

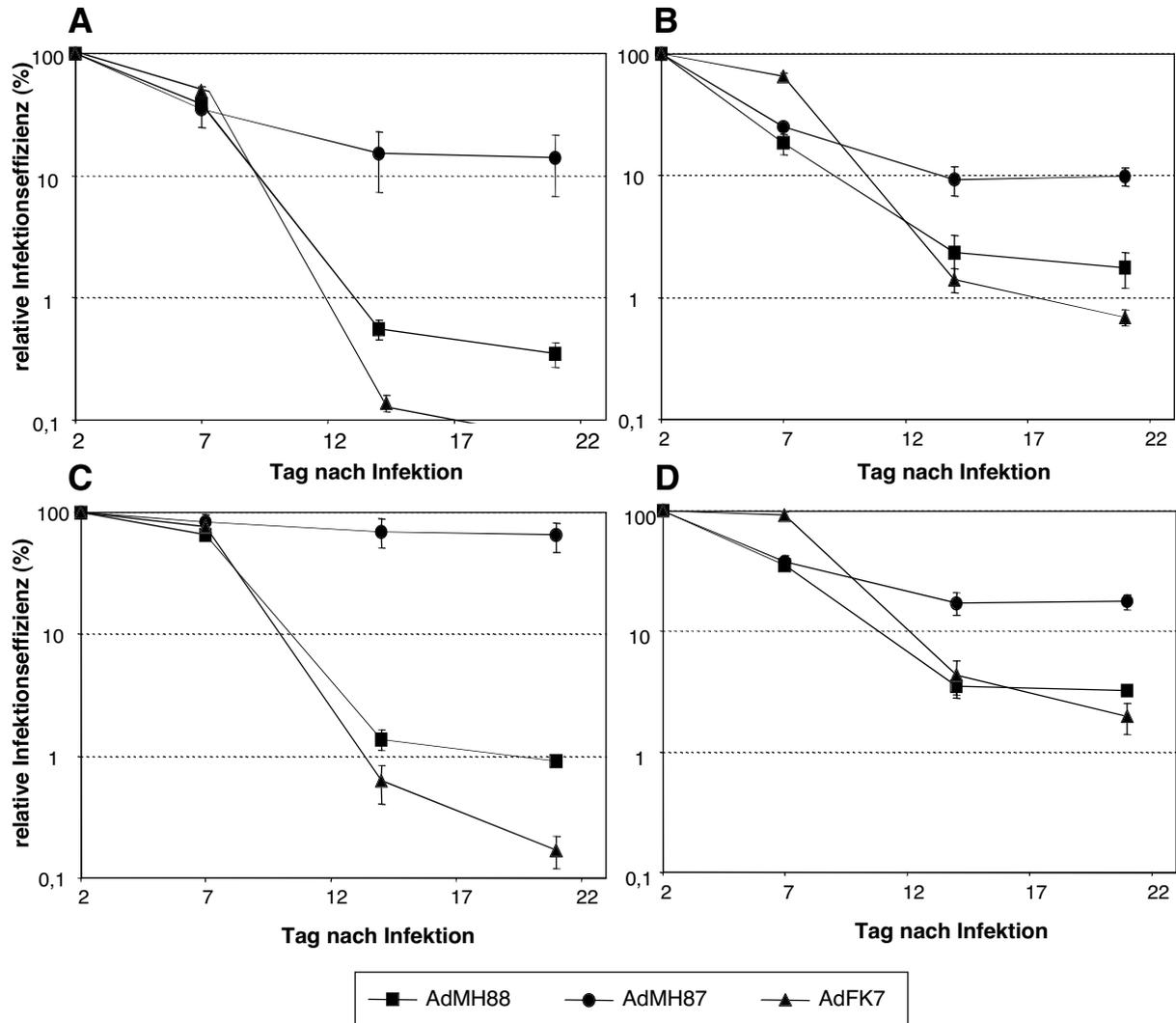


Fig. 30: Infektionsanalyse. HeLa und A549 Zellen wurden mit MOI 30 und 100 infiziert und für 21 Tage in Kultur gehalten. An den Tagen 2, 7, 14 und 21 wurde ein Aliquot abgenommen, mit 2% Formaldehyd fixiert und im FACS auf GFP Expression untersucht. In der FACS Analyse wurde pro Probe die GFP Expression von 20000 Zellen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts von je 3 Versuchen. Auf der Y-Achse ist die relative Infektionseffizienz dargestellt; als 100% Wert wurde die Anzahl GFP positiver Zellen an Tag 2 verwendet. Auf der X-Achse ist die Zeit in Tagen dargestellt. Die absoluten Werte an Tag 2 entsprechen 70-99 % GFP positiver Zellen. (A) A549 Zellen mit MOI 30 infiziert, (B) HeLa Zellen mit MOI 30 infiziert, (C) A549 Zellen mit MOI 100 infiziert, (D) HeLa Zellen mit MOI 100 infiziert.

h nach Transfer wurde der Anteil GFP positiver Zellen im FACS analysiert. Dabei konnte lediglich in Zellen, die mit dem Überstand von AdMH87 infizierten A549 Zellen inkubiert wurden, GFP Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten entsprachen den Erwartungen, da nur in AdMH87 infizierten Zellen das FV Hüllprotein exprimiert wird und aus diesem Grund nur hier Partikelfreisetzung möglich ist. Des weiteren bestätigt dieser Befund die ordnungsgemäße Proteinexpression des Vektors AdMH87.

Die niedrigere Gentransfer Rate der Ad-FV Vektoren in HeLa Zellen im Gegensatz zu A549 Zellen bei ähnlicher primärer Infektionseffizienz und ähnlicher Stärke der FV Proteinexpression (Daten nicht gezeigt) ist vermutlich auf eine zelltypspezifische Persistenz der Ad Vektoren zurückzuführen

3.2.2 Tet Promotor regulierte Ad-FV Hybridvektoren

3.2.2.1 Konstruktion von Ad-FV Tet Hybridvektoren

Zur Konstruktion expressionsregulierbarer Ad-FV Hybridvektoren wurden regulatorische Promotoren nach dem Tet-on Prinzip (Gossen & Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) verwendet. In diesem System wird ein reverser Tet Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert. Die Expression der zu regulierenden Genprodukte wird von einem CMV-Minimalpromotor mit rtTA Bindungsstellen kontrolliert. In Anwesenheit von Doxycyclin bindet der rtTA an die Bindungsstellen am Promotor und induziert die Genexpression. In Abwesenheit von Doxycyclin kann der rtTA nicht an seine regulatorischen Sequenzen im CMV-Minimalpromotor binden, und dadurch keine Genexpression induzieren.

Das Plasmid pMH88Tet (T. Juretzek) diente als Ausgangsplasmid der Klonierungen. Es enthält anstelle des CMV-Promotors einen CMV-Minimalpromotor mit zwei heptamerisierten Tet-Operatoren in verschiedener Orientierung (Gossen et al., 1992) aus dem Plasmid pUHD10-3 (H. Bujard). Dieser Promotor kontrolliert die Expression des bereits beschriebenen FV Vektors MH88. Hinter dem FV Vektor wurde eine rtTA Expressionskassette aus dem Plasmid pUHG17-1 (Gossen et al., 1995) mit dem BGH (Rinder-Wachstumshormon) Polyadenylierungssignal unter Kontrolle eines CMV-Promotors eingefügt.

Als Kontrollvektor wurde AdMH89Tet hergestellt, der eine Mutation im pol Startcodon enthält (pol ATG zu CTG). Das Plasmid pMH89Tet (pol ATG zu CTG) wurde durch Ligation eines pMH89 *PacI/SwaI* 1830 bp Fragments in ein pMH88Tet 12744 bp *PacI/SwaI* Fragment kloniert. Das Plasmid pMH87Tet wurde durch Ligation eines 6045 bp *PacI/NotI* pMH87 Fragments in ein 11380 *PacI/NotI* pMH88Tet Fragment hergestellt. Die Ad-FV Hybridvektorplasmide pAdMH88Tet und pAdMH89Tet (Fig. 31 A) wurden durch Ligation eines pMH88Tet *MluI/NotI* bzw. eines pMH89 *MluI/NotI* 7457 bp Fragments und eines pMH88Tet *MssI/NotI* 2897 bp Fragments in ein 23550 bp AdMH88 *MluI/Eco47III* Vektorfragment kloniert. Das Ad-FV Hybridvektorplasmid pAdMH87Tet (Fig. 31 B) wurde durch Ligation eines pMH87Tet 10284 bp *MluI/NotI* Fragments und eines 2897 bp pMH88Tet *MssI/NotI* Fragments in ein 19692 bp AdMH87 *MluI/Eco47III* Vektorfragment hergestellt.

Die Integrität aller Konstrukte konnte durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse bestätigt werden.

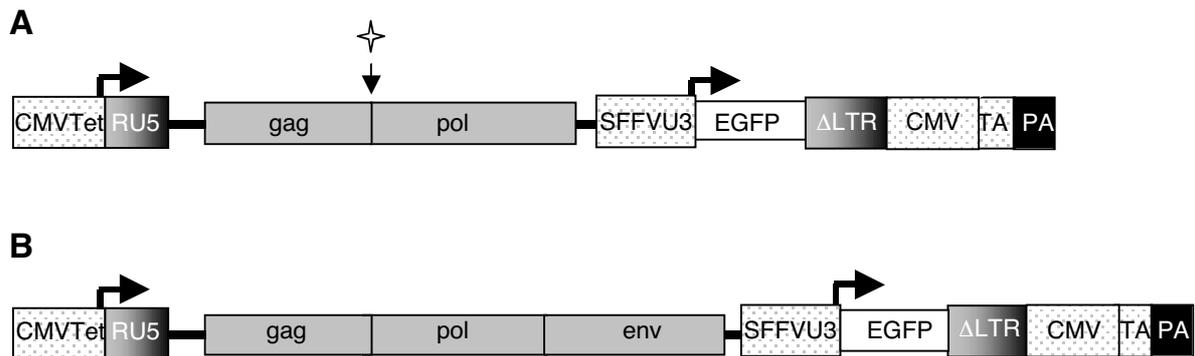


Fig. 31: Schematische Darstellung der FV Vektor Kassetten der Ad-FV Hybridvektoren AdMH88Tet, AdMH89Tet und AdMH87Tet. (A) AdMH88Tet; an der mit dem Stern markierten Stelle wurde bei AdMH89Tet die Punktmutation pol ATG zu CTG eingefügt. (B) AdMH87Tet. (CMVTet) CMV-Minimalpromotor mit heptamerisierten Tet Operatoren in verschiedener Orientierung; (TA) rtTA reverser Tet Transaktivator; (PA) BGH-Polyadenylierungssignal.

Die FV Vektorkassetten in den Ad-FV Hybridvektorplasmiden mit Tet Regulation wurden auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft (Fig. 32). Dazu wurden die Plasmide pAdMH88Tet, pAdMH89Tet und pAdMH87Tet in 293T Zellen transfiziert. Um die Funktionalität anhand der Partikelfreisetzung zu testen, wurde zusätzlich zu

pAdMH88Tet PFV env, und zu pAdMH89Tet PFV Pol und Env Expressionsplasmide cotransfiziert. Die Zellen wurden mit Doxycyclin inkubiert, 48 h nach Transfektion wurde ein Überstandstransfer auf HT1080 Zellen durchgeführt. Nach weiteren 48 h konnte der Anteil GFP positiver Zellen im FACS analysiert werden (Fig. 32). Bei pAdMH87Tet transfizierten Zellen war ohne Doxycyclin ein geringer basaler Vektortransfer feststellbar, während mit Doxycyclin ein effizienter Vektortransfer stattfand. pAdMH88Tet transfizierte Zellen benötigten zur Vektorfreisetzung zusätzlich Env Expression, bei pAdMH89 transfizierten Zellen kam es erst nach zusätzlicher Env und Pol Expression zur detektierbarem Gentransfer. Damit kann die Inaktivierung des pol ORF von AdMH89Tet bestätigt werden. Diese Befunde belegen die Funktionalität der Proteinexpression und Regulation der Genexpression der FV Vektor-kassetten in den Ad-FV Vektoren auf Plasmidbasis. Daraufhin wurden die Ad-FVTet Vektoren wie zuvor beschrieben (3.2.1.1) hergestellt; dabei wurden Titer bis zu 10^{10} iU/ml erreicht .

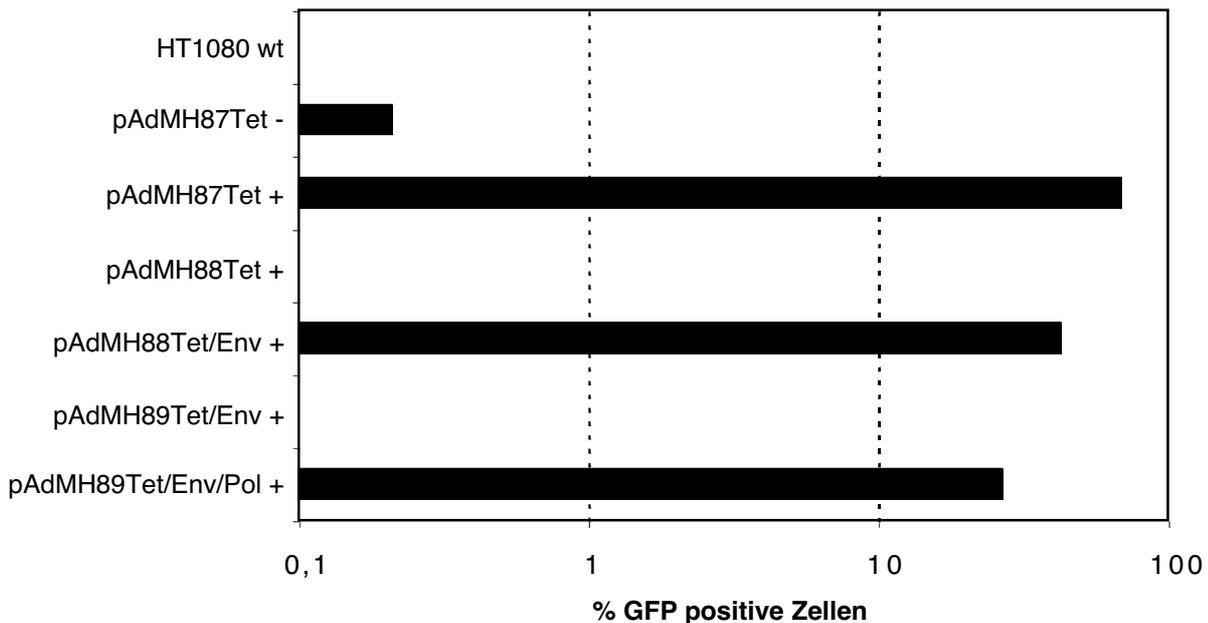


Fig. 32: Funktionalitätstest der Tet regulierten Ad-FV Hybridvektoren AdMH88Tet, AdMH89Tet und AdMH87Tet. Die Plasmide pAdMH88Tet, pAdMH89Tet und pAdMH87Tet wurden mittels Calciumphosphat Transfektion in 293T Zellen transfiziert. Zusätzlich wurden Cotransfektionen mit PFV Env (pczHFVenvEM02) und PFV Pol (pcpol-2) Expressionsplasmiden durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden mit (+) oder ohne (-) 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert, die Zugabe erfolgte nach Abnahme der Transfektionslösung an Tag 1. Am Tag nach der Transfektion wurde eine Natriumbutyratinduktion mit (+) oder ohne (-) 1 µg/ml Doxycyclin durchgeführt, 12 h nach Ende der Induktion wurden zellfreie Überstände auf HT1080 Zellen transferiert. Der Anteil GFP positiver Zellen konnte 48 h nach dem Überstandstransfer bestimmt werden, dabei wurden 20000 Zellen pro Probe analysiert.

3.2.2.2 Analyse der viralen Genexpression

Zur Analyse der Genexpression wurden A549 Zellen mit MOI 100 für 48 h entweder in Gegenwart von 1 µg/ml Doxycyclin oder ohne Doxycyclin mit Ad-FV Tet Hybridvektoren infiziert. Aus den infizierten Zellen wurden Lysate gewonnen, die auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot Verfahren mittels Immunblot analysiert wurden. Es fanden monoklonale α Gag, α Pol RT und α Pol IN Antikörper sowie ein polyklonales α PFV Env Leaderpeptid Serum Verwendung. Im Western Blot (Fig. 33 A) waren die Gag pr71/p68 Doppelbanden bei AdMH88Tet und AdMH87Tet infizierten Zellen gut zu detektieren, bei AdMH89Tet war wegen der nicht vorhandenen viralen Protease nur pr71 detektierbar. Aufgrund der starken Gag Expression in AdMH88Tet infizierten Zellen wurde in diesem Western Blot zusätzlich 1/3 verdünntes Lysat aufgetragen, um die Induktion des Gag Proteins besser darzustellen. Man kann davon ausgehen, dass die Gag Expression ohne Doxycyclin auf einer Basalaktivität des Tet Promotorsystems beruht, die vor allem bei der starken Proteinexpression des AdMH88Tet Vektors sichtbar wird (Fig. 33 A). Um zu bestätigen, dass bei allen Proben die gleiche Proteinmenge geladen wurde, wurde ein Immunblot mit einem monoklonalen α - β -Aktin-Antikörper durchgeführt (Fig. 33 A). In Fig. 33 B konnte bei einem Immunblot mit denselben Lysaten wie in Fig. 33 A mit einer Mischung monoklonaler α Pol Antikörper bei AdMH88Tet und AdMH87Tet die Expression des Pol Vorläuferproteins (pr127), der Reversen Transkriptase/RNaseH/Protease (p80 RT) und der Integrase (p40 IN) nachgewiesen werden. In AdMH89Tet infizierten Zellen wurde schwach ein Protein von etwa 110 kD detektiert, bei dem es sich vermutlich um ein Pol Genprodukt, das von einem späteren Startcodon translatiert wurde, handelt. Auch bei der Pol Expression konnte wie bei der von Gag für AdMH88Tet eine verstärkte Expression mit und eine schwache ohne Doxycyclin detektiert werden. Es war nur möglich Env Expression in AdMH87Tet infizierten Zellen in Gegenwart von Doxycyclin nachzuweisen, sowohl das Env Vorläuferprotein gp130 als auch das Env Leaderpeptid gp18 waren deutlich nachweisbar (Fig. 33 B). Die Expressionsanalyse zeigte eine ordnungsgemäße Expression der FV Proteine in mit Ad-FV Hybridvektoren infizierten Zellen und belegte die Induzierbarkeit der FV Proteinexpression durch Doxycyclin.

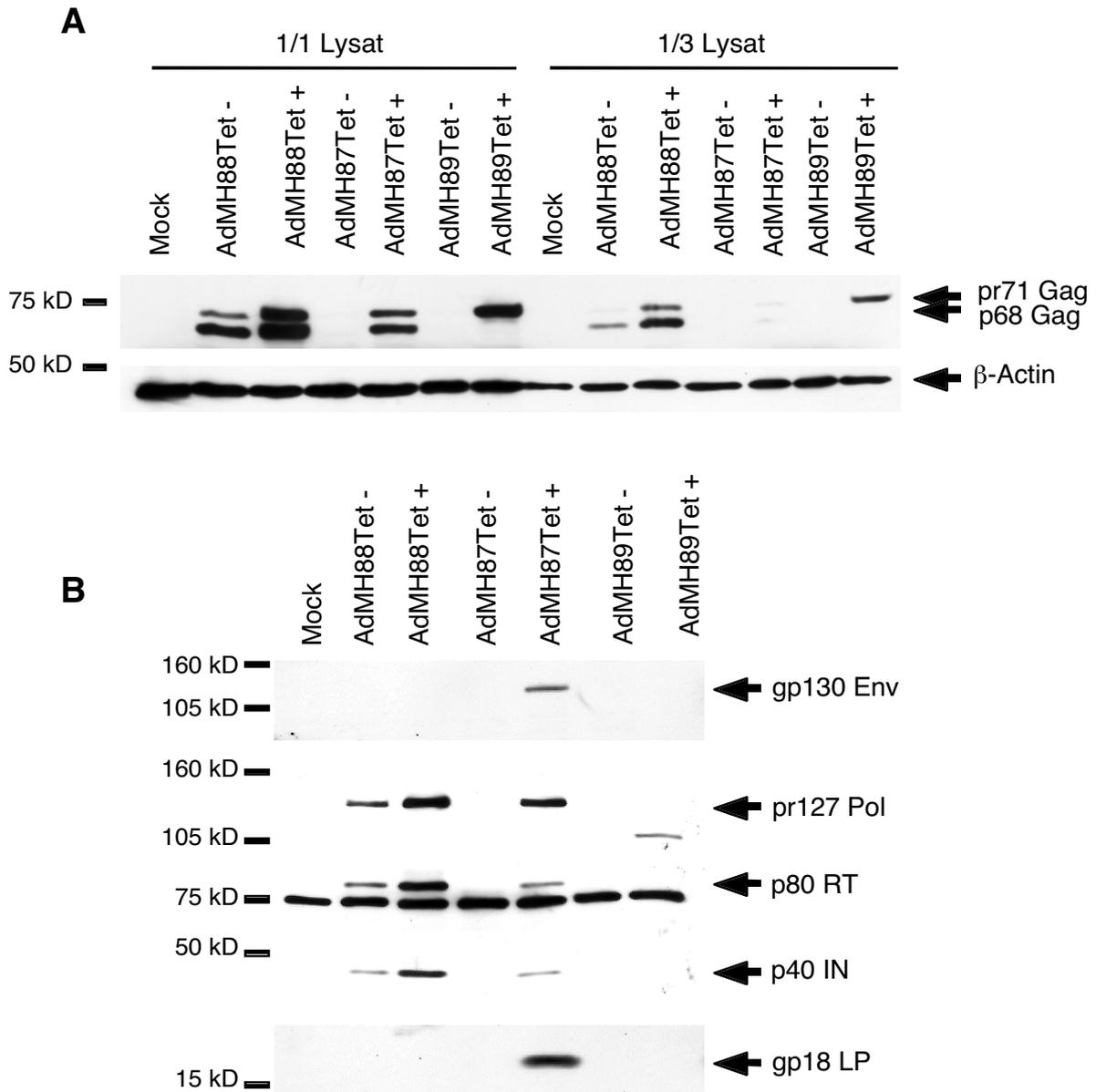


Fig. 33: Western Blot Analyse von Ad-FV Tet Vektoren infizierten A549 Zellen. Die Zellen wurden für 48 h mit MOI 100 mit (+) oder ohne (-) 1 µg/ml Doxycyclin infiziert. Die Lysate wurden auf einem 7,5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der Immunblot wurde bei Fig. 33 A mit Maus-αGag SGG1 Hybridomaüberstand (1:5) und einem monoklonalen Maus-αHuman β-Actin Antikörper (1:5000) durchgeführt, als sekundärer AK diente ein Ziege-αMaus IgG HRP Antikörper (1:1000). Bei Fig. 33 B wurde als primärer Antikörper Maus αPFV RT 15E10 Hybridomaüberstand (1:3) und Maus αPFV IN 3E11 Hybridomaüberstand (1:3) verwendet, als sekundärer Antikörper diente wie zuvor ein Ziege-αMaus IgG HRP Antikörper (1:1000). Zur Analyse der Env Expression wurde als primärer Antikörper Kaninchen-αPFV Env2-69 Serum (1:300), als sekundärer Antikörper Schwein-αHase IgG HRP (1:1000) verwendet.

3.2.2.3 Infektionsanalyse

Zur Analyse der Transduktionsaktivität der Tet regulierten Ad-FV Hybridvektoren wurden A549 Zellen mit den HC-Ad Vektoren AdMH88Tet, AdMH87Tet, AdMH89Tet und AdFK7 mit MOI 100 und MOI 30 infiziert. An den Tagen 2, 7, 14, 21 und 28 nach Infektion wurden die infizierten Zellen im FACS auf GFP Expression analysiert. In Fig. 34 ist der relative Anteil GFP positiver Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt, als 100% Wert ist der Anteil GFP positiver Zellen an Tag 2 nach Infektion festgelegt.

Bei Infektionsexperimenten mit MOI 100 in Gegenwart von Doxycyclin fand man nach 28 Tagen in den AdMH87Tet infizierten Zellen einen um den Faktor 866 größeren Anteil GFP positiver Zellen als in den AdFK7 infizierten Zellen, bei MOI 30 um den Faktor 528. Ohne Doxycyclin war die Effizienz des Markergentransfers bei MOI 100 um den Faktor 84, bei MOI 30 um den Faktor 81 niedriger als in Anwesenheit von Doxycyclin. Das bedeutete allerdings auch einen ungefähr um den Faktor 7-10 höheren Markergentransfer von AdMH87Tet infizierten Zellen ohne Doxycyclin im Gegensatz zu AdFK7 infizierten Zellen, was damit eine messbare Basalaktivität des CMV-Minimalpromotors bestätigte (Fig. 34). AdMH88Tet mit MOI 100 und MOI 30 infizierte Zellen zeigten im Vergleich zu AdFK7 infizierten Zellen ebenfalls eine erhöhte Anzahl GFP positiver Zellen, allerdings nur um den Faktor 4-5 (Fig. 34). Die als Kontrolle eingesetzte Pol Mutante AdMH89Tet unterschied sich bei Infektionsversuchen in der Anzahl GFP positiver Zellen 28 Tage nach Infektion mit MOI 30 und MOI 100 nicht signifikant von dem HC-Ad Vektor AdFK7 (Fig. 34). Diese Ergebnisse belegten einen langfristig stabileren Markergentransfer von Ad-FV Hybridvektoren im Gegensatz zu reinen HC-Ad Vektoren. Voraussetzung dafür ist eine funktionelle Induktion der FV Vektor Expression. Der Vektor AdMH88Tet, der zum Gentransfer nur den intrazellulären Replikationszyklus nutzen kann, zeigte im Gegensatz zu HC-Ad Vektoren eine um den Faktor 4-5 erhöhte stabile Gentransferrate, während der Vektor AdMH87Tet, der neben dem intrazellulären Replikationszyklus auch einen extrazellulären Sekundär-zyklus vollziehen kann, eine ungefähr um den Faktor 900 erhöhte stabilen Markergentransfer ermöglichte. Um die Integrität der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Daten in Versuchen bis zu 70 Tagen nach Infektion bestätigt. Dabei ergaben sich im Zeitraum von Tag 28 nach Infektion bis zu Tag 70 nach Infektion keine maßgeblichen Änderungen in dem Anteil GFP positiver Zellen.

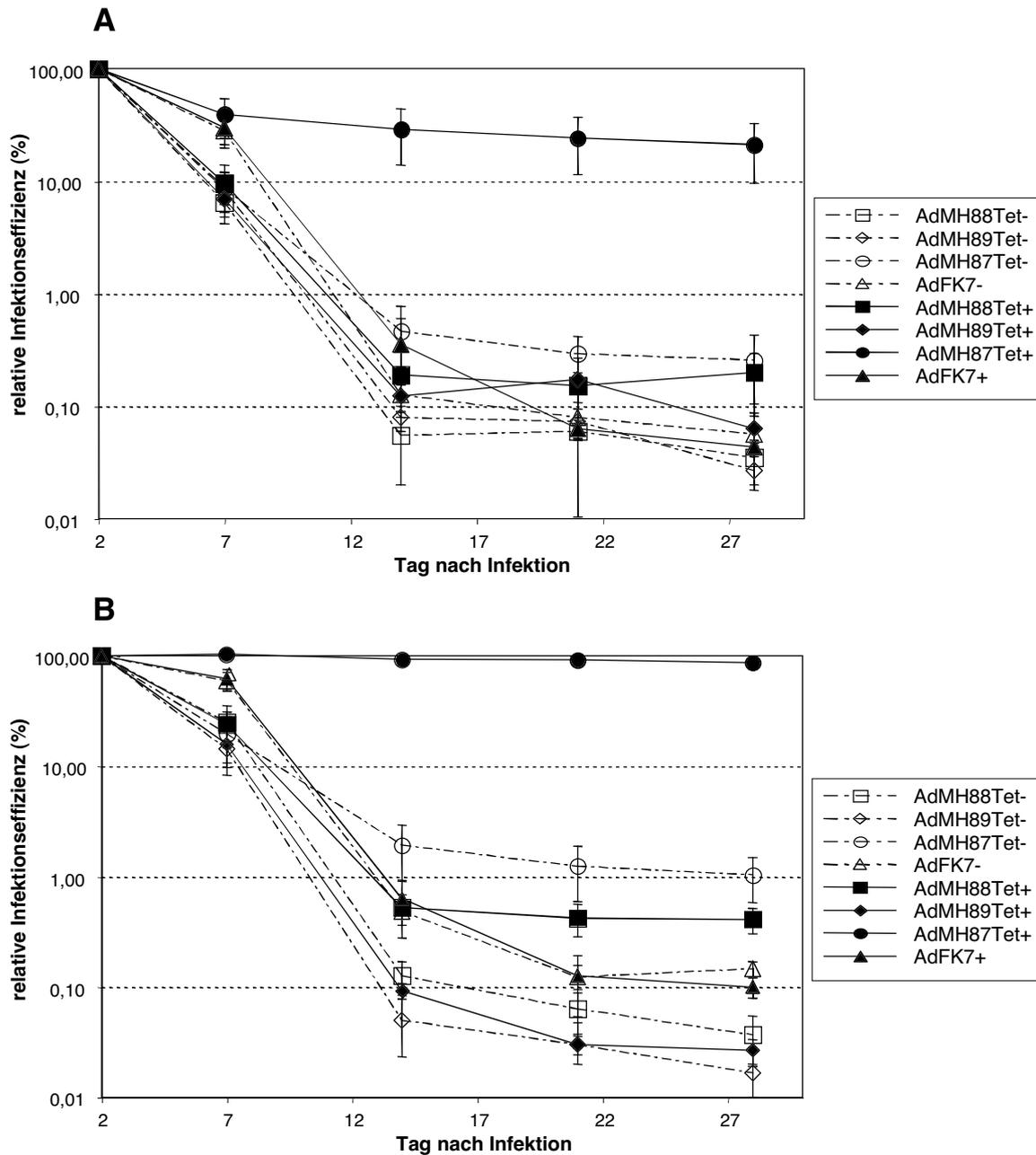


Fig. 34: Analyse der Transduktionseffizienz von Tet regulierten Ad-FV Hybridvektoren. A549 Zellen wurden mit MOI 30 und 100 infiziert und für 28 Tage ohne (-) oder mit (+) 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin in Kultur gehalten. Frisches Medium mit Doxycyclin wurde bei der Infektion, an Tag 1, 2, 4, 7 und 10 nach Infektion zugeben. An den Tagen 2, 7, 14, 21 und 28 wurde ein Aliquot abgenommen, mit 2 % Formaldehyd fixiert und im FACS auf GFP Expression untersucht. In der FACS Analyse wurde pro Probe die GFP Expression von 20000 Zellen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts von je drei Versuchen. Die offenen Symbole stehen für Infektionen ohne Doxycyclin während die geschlossenen Symbole für Infektionen mit Doxycyclin stehen. Auf der X-Achse ist die relative Infektionseffizienz dargestellt; als 100% Wert wurde die Anzahl GFP positiver Zellen an Tag 2 verwendet. Die absoluten Werte an Tag 2 entsprechen 70-99 % GFP positiver Zellen. (A) A549 Zellen mit MOI 30 infiziert. (B) A549 Zellen mit MOI 100 infiziert.

Jeweils an Tag sieben nach Infektion wurde zur Analyse der Partikelfreisetzung zellfreier Überstand von allen infizierten Zellen der in Fig. 34 dargestellten Versuche auf HT1080 Zellen transferiert. Infektiöse Partikel im Überstand konnten nur bei AdMH87Tet mit MOI 30 und MOI 100 infizierten Zellen, die mit Doxycyclin kultiviert wurden, detektiert werden (Fig. 35). Durch diese Analyse konnte in AdMH87Tet infizierten Zellen die Freisetzung von Vektor Partikeln, die über einen extrazellulären Infektionsweg andere Zellen infizieren können, nachgewiesen werden.

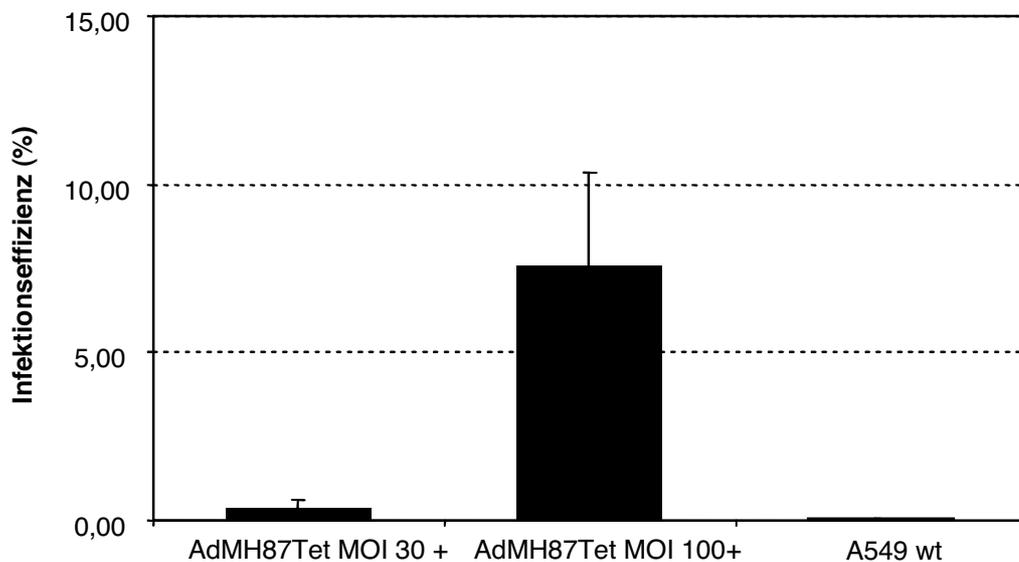


Fig. 35: Überstandtransfer von Ad-FV Hybridvektor infizierten Zellen an Tag 7 nach Infektion. Zellfreie Überstände von Ad-FV Hybridvektor infizierten Zellen von dem in Fig. 34 dargestellten Infektionsexperiment wurden auf je $1,5 \times 10^4$ HT1080 Zellen übertragen. Die HT1080 Zellen wurden für 6 h mit den Überständen kultiviert, 48 h nach Transfer wurde eine FACS Analyse zur Detektion des Anteils GFP positiver Zellen mit je 20000 Zellen pro Probe durchgeführt. Auf der Y-Achse ist der absolute Anteil GFP positiver Zellen dargestellt, auf der X-Achse die Infektion, von der der Überstand abgenommen wurde. Da infektiöse Partikel im Überstand nur bei AdMH87Tet mit MOI 30 und MOI 100 infizierten Zellen mit Doxycyclin detektiert werden konnten, sind nur diese Ergebnisse dargestellt.

Zur Bestimmung der notwendigen Dauer der Doxycyclingabe um einen optimalen stabilen Gentransfer zu erreichen, wurden A549 Zellen mit AdMH88Tet und AdMH87 Tet für 28 Tage wie zuvor infiziert. Doxycyclin wurde in verschiedenen Zeitintervallen zugeben, die Anzahl GFP positiver Zellen wurde an den Tagen 2, 7, 14, 21 und 28 im FACS ermittelt (Fig. 36). Bei AdMH88Tet infizierten Zellen war bereits nach einem

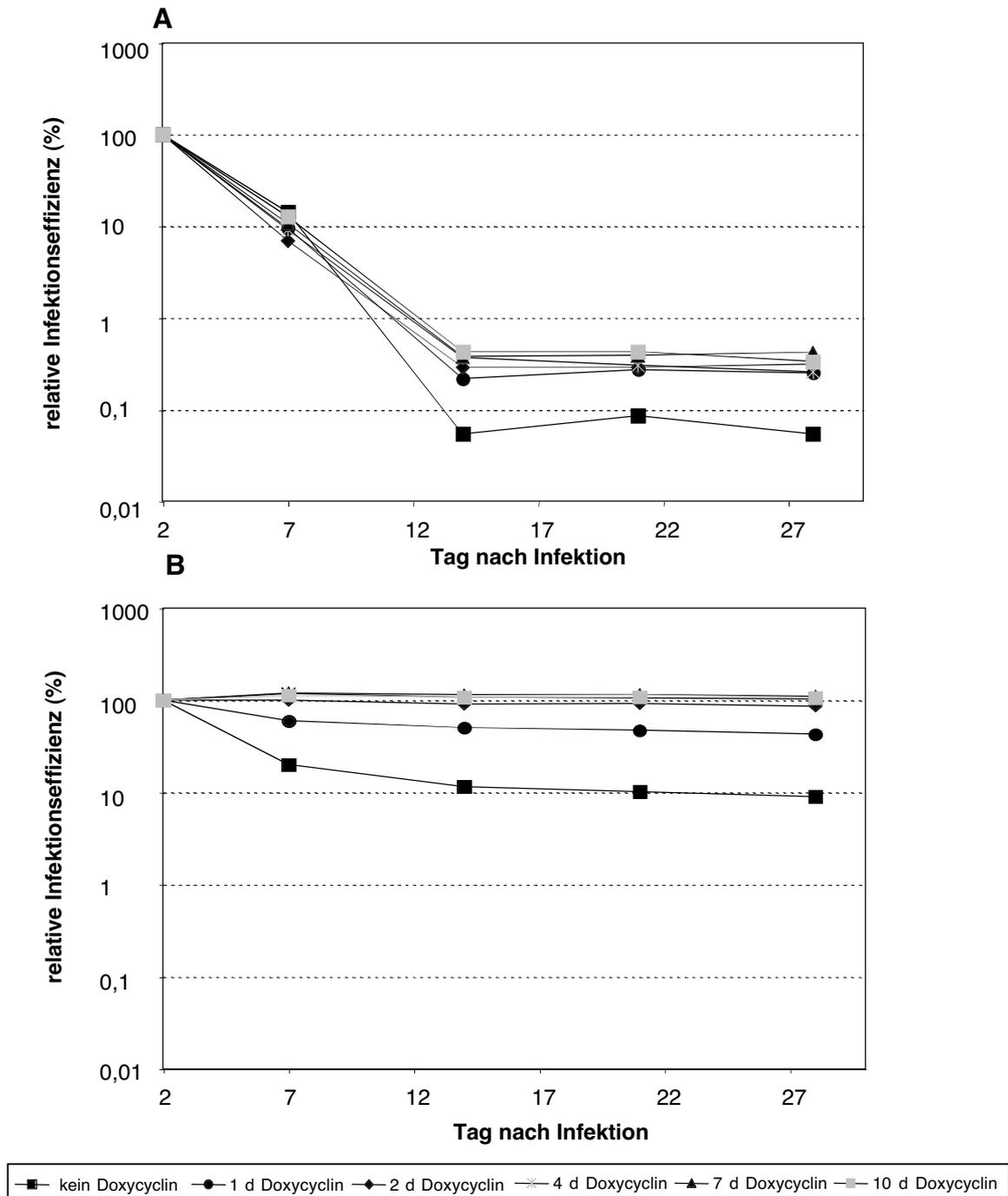


Fig. 36: Determination der notwendigen Dauer der Doxycyclingabe, um einen optimalen Gentransfer zu erreichen. A549 Zellen wurden mit MOI 100 mit AdMH88Tet (A) und AdMH87Tet (B) infiziert und für verschiedene Dauer ohne oder mit 1 µg/ml Doxycyclin in Kultur gehalten. Frisches Medium mit Doxycyclin wurde bei der Infektion, an Tag 1, 2, 4, 7 und 10 nach Infektion zugeben. An den Tagen 2, 7, 14, 21 und 28 wurde ein Aliquot abgenommen, mit 2% Formaldehyd fixiert und im FACS mit je 20000 Zellen pro Probe auf GFP Expression untersucht. Auf der X-Achse ist die relative Infektionseffizienz dargestellt; als 100% Wert wurde die Anzahl GFP positiver Zellen an Tag 2 festgelegt. Die Daten konnten durch einen Wiederholungsversuch bestätigt werden.

Tag eine weitgehend optimale Induktion des Gentransfers erreicht, die mit längeren Doxycyclingaben nur noch leicht gesteigert werden konnte (Fig. 36 A). Bei AdMH87Tet infizierten Zellen wurde ein optimaler Gentransfer nach ein bis zwei Tagen Doxycyclingabe erreicht, der nach weiterer Doxycyclingabe ebenfalls nur leicht gesteigert werden konnte. Wie bei den Infektionsversuchen bereits gezeigt (Fig. 34) ist die Gentransferrate bei AdMH88Tet durch Induktion der Genexpression mit Doxycyclin etwa um den Faktor 5, bei AdMH87Tet etwa um den Faktor 10 erhöht worden.

3.2.2.4 Die Gentransferaktivität von Ad-FV Tet Hybridvektoren in HuH7

Leberzellen

Zur Analyse der Gentransferaktivität von Ad-FV Tet Hybridvektoren in Leberzellen (zur Vorbereitung von in vivo Analysen) wurden HuH7 Zellen wie zuvor mit Ad-FV Tet Hybridvektoren infiziert (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Analyse konnte mit oder ohne Doxycyclin kein erhöhter stabiler Gentransfer bei AdMH87Tet und AdMH88Tet infizierten Zellen im Gegensatz zu reinen HC-Ad Vektor oder AdMH89Tet infizierten Zellen beobachtet werden. Die HuH7 Zellen konnten allerdings gut primär mit Ad-FV Vektoren infiziert werden. Zur Analyse der Ursache wurde die Proteinexpression mittels Western Blot Analyse von 48 h mit Ad-FV Tet Vektoren mit MOI 100 infizierten HuH7 Zellen und als Kontrolle HT1080 Zellen untersucht (Fig. 37). Die Infektion wurde mit oder ohne 1 µg/ml Doxycyclin durchgeführt. Die PFV Gag Expression wurde mit einem αPFV Gag Antikörper analysiert, dabei zeigte sich bei infizierten HT1080 Zellen eine sehr gut detektierbare Gag Expression, während die Gag Expression bei infizierten HuH7 Zellen sehr viel schwächer war und erst bei besonders langer Belichtung des Röntgenfilms detektiert werden konnte (Fig. 37 A). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Analyse der Pol Expression beobachtet. Hier wurden Pol Proteine deutlich schwächer in infizierten HuH7 Zellen als in vergleichbar infizierten HT1080 Zellen exprimiert (Fig. 37 B). Die starke Überbelichtung in Fig. 37 A+B macht die Doxycyclin induzierte Proteinexpression schlecht sichtbar. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde die Gag Expression mit neuen Lysaten noch einmal untersucht, dabei wurde zur Verifizierung der Ladung gleicher Proteinmengen pro Probe ein αhuman β-Aktin Antikörper verwendet. Zusätzlich wurden auch Lysate von 48 h mit MOI 100 infizierten Ad-FV Hybridvektoren ohne Tet-Promotor aufgetra-

Ergebnisse

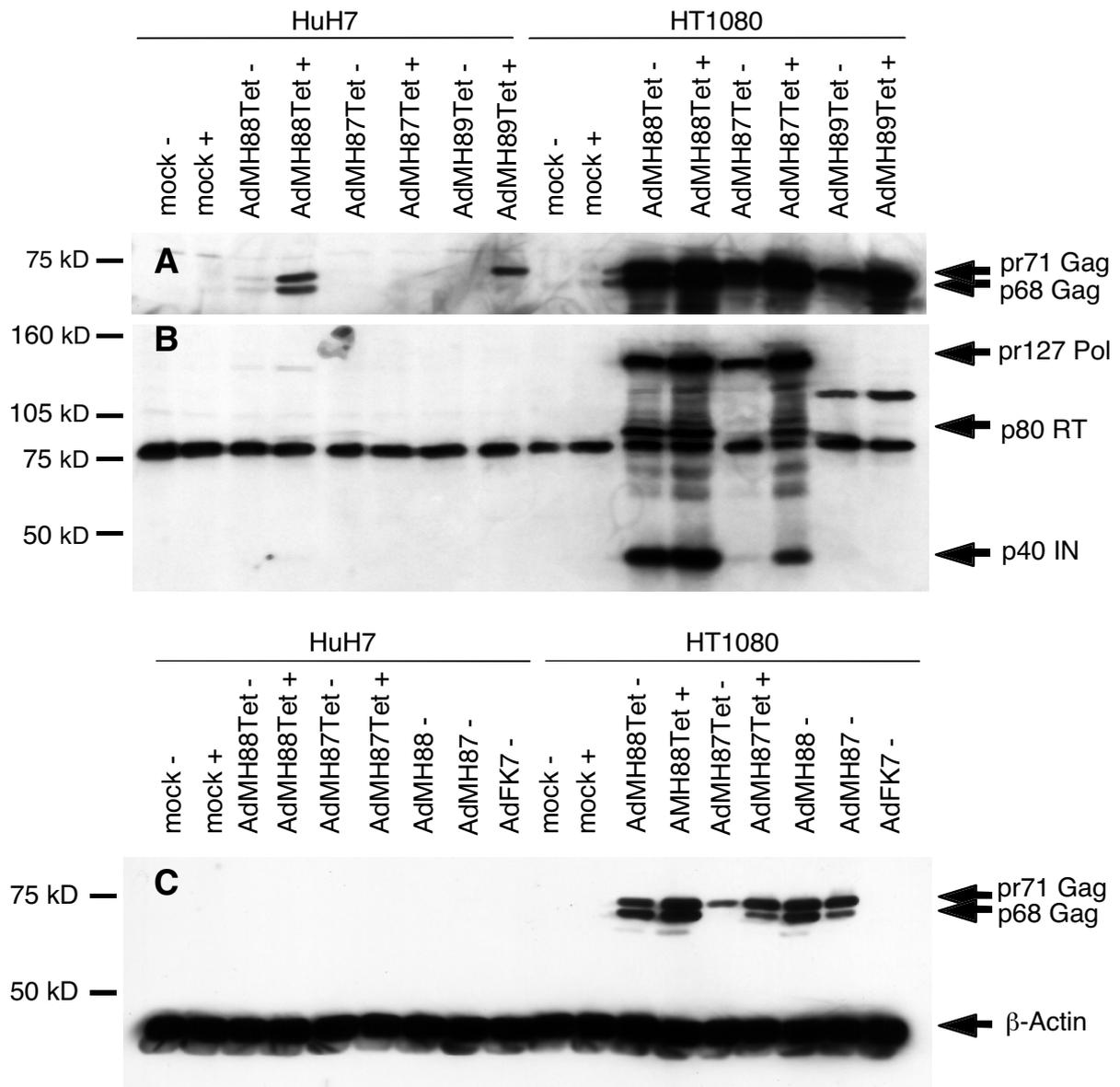


Fig. 37: Western Blot Analyse der Gag und Pol Expression von mit Ad-FV Hybridvektoren infizierten HuH7 und HT1080 Zellen. HuH7 und HT1080 Zellen wurden mit MOI 100 mit den jeweiligen Ad-FV Hybridvektoren für 48 h infiziert, bei Ad-FVTet Vektoren wurde kein (-) oder 1 µg/ml (+) Doxycyclin zugegeben. Die Zellen wurden lysiert und die Zelllysate auf einem 7,5% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Elektro Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die Proteinexpression konnte mittels Immunblot mit den jeweiligen Antikörpern analysiert werden. (A) Als primärer Antikörper wurde α PFV Gag SGG1 Hybridomaüberstand (1:5) verwendet, als sekundärer Ziege α Maus IgG -HRP (1:1000). (B) Als primärer Antikörper wurde α PFV RT 15E10 Hybridomaüberstand (1:3) und α PFV IN Hybridomaüberstand 3E11 (1:3) verwendet, als sekundärer Antikörper Ziege α Maus IgG -HRP (1:1000). (C) Als primärer Antikörper wurde α PFV Gag SGG1 Hybridomaüberstand (1:5) und monoklonaler α human β -Actin Antikörper (1:5000) verwendet, als sekundärer AK Ziege α Maus IgG -HRP (1:1000).

gen, um festzustellen, ob die schwache Proteinexpression ihre Ursache im Tet System hat oder generell ein Expressionsproblem der Ad-FV Vektoren ist. Wie in Fig. 37 C deutlich zu sehen, war die Gag Expression von Ad-FV und Ad-FVTet Vektoren in infizierten HT1080 Zellen gut detektierbar, während in infizierten HuH7 Zellen fast keine Proteinexpression sichtbar war. Anhand der β -Aktin Bande konnte festgestellt werden, dass bei allen Proben annähernd dieselbe Proteinmenge geladen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Ad-FV als auch Ad-FVTet Vektoren in der humanen Leberzelllinie HuH7 eine sehr schwache Proteinexpression zeigen. Vermutlich ist diese schwache Proteinexpression die Ursache dafür, dass in Infektionsexperimenten mit HuH7 Zellen keine erhöhte stabile GFP Expression von Ad-FV Tet Vektor infizierten Zellen im Gegensatz zu HC-Ad Vektor infizierten Zellen beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.5 Integratanalyse

Mit Ad-FVTet Vektoren mit MOI 100 in Gegenwart von 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin infizierte A549 Zellen wurden 30 Tage nach Infektion im FACS Zellsorter analysiert. GFP positive AdMH87Tet/AdMH88Tet infizierte Zellen wurden in der Zellsortierung angereichert; AdMH89Tet und AdFK7 infizierte Zellen konnten nicht angereichert werden, da für eine Zellsortierung der Anteil GFP positiver Zellen zu gering war. Aus den sortierten Zellen wurden durch limitierende Verdünnung Einzelzellklone hergestellt, die Einzelzelllinien wurden im FACS auf GFP Expression untersucht. Aus Einzelzelllinien mit homogener GFP Expression wurde genomische DNA präpariert, die genomische DNA konnte in der Southern Blot Analyse zur Integratanalyse verwendet werden. Es wurde ebenfalls virale DNA direkt aus den Ad-FV Hybridvektoren präpariert, die in der Southern Blot Analyse untersucht wurde. Genomische DNA der Einzelzellklone wurde mit *EcoRI* verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die DNA wurde mit einer ^{32}P markierten FV gag/pol Sonde hybridisiert (Fig. 27). Bei einem integrierten reversen Transkript des FV Vektors werden Banden verschiedener Größe mit einer Mindestgröße von 5435 bp erwartet, da sich nur eine *EcoRI* Schnittstelle im Genom des Vektors befindet; die

Ergebnisse

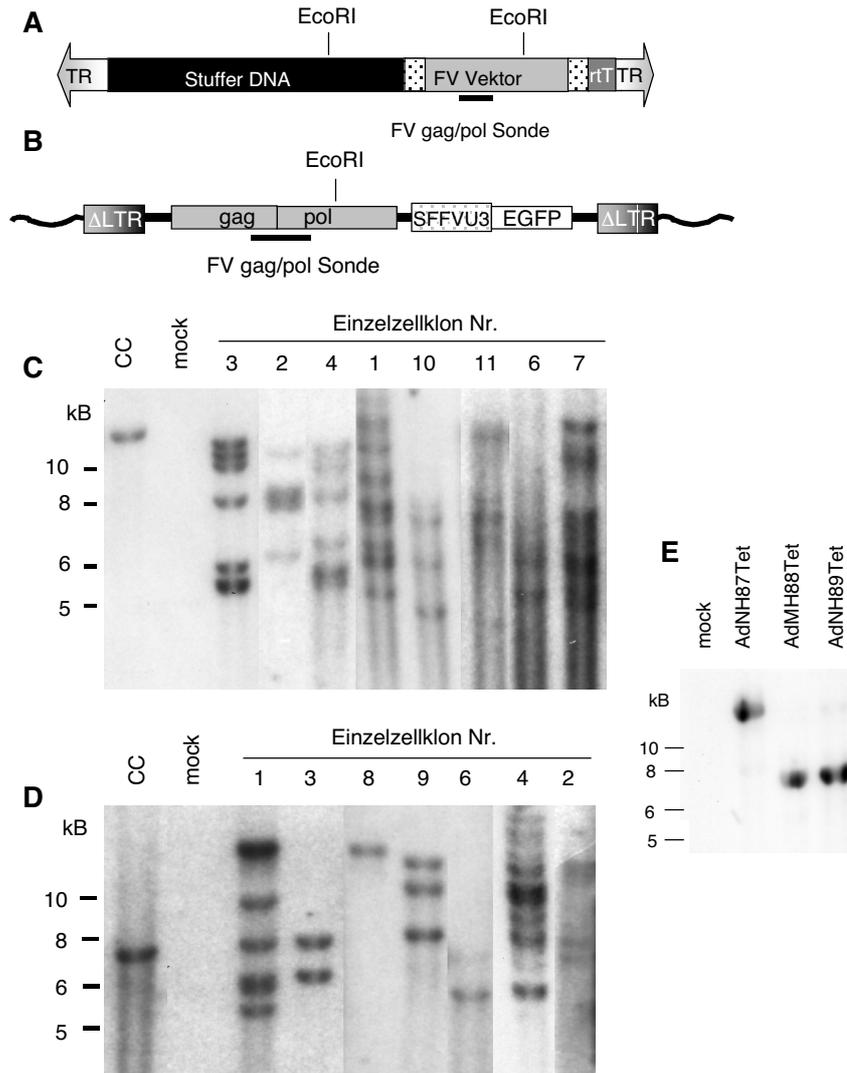


Fig. 38: Southern Blot Analyse von Einzelzellklonen AdMH88Tet und AdMH87Tet infizierter A549 Zellen mit FV gag/pol Sonde. Jeweils 10 µg genomische DNA wurde EcoRI verdaut, auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und mit einem Saugblot auf eine Nylonmembran übertragen. Die DNA auf dem Blot wurde mit einer ^{32}P dATP markierten FV gag/pol Sonde (Fig. 27) für 3 h hybridisiert. (A) Schematische Darstellung des viralen Genoms von Ad-FVTet Vektoren mit den darin enthaltenen EcoRI Schnittstellen und der Region, die mit der FV gag/pol Sonde hybridisiert. (B) Schematische Darstellung des revers transkribierten Integrats von AdMH88Tet mit der darin enthaltenen EcoRI Schnittstelle und der Region, die mit der FV gag/pol Sonde hybridisiert. (C) Southern Blot Analyse von genomischer DNA AdMH87Tet infizierter Zellen mit einer FV gag/pol Sonde. Als Negativkontrolle (mock) wurde A549 wt genomische DNA verwendet, als Positivkontrolle A549 wt genomische DNA mit einer Kopie des Plasmids pAdMH87 pro Genom. (D) Southern Blot Analyse von genomischer DNA AdMH88Tet infizierter Zellen mit einer FV gag/pol Sonde. Als Negativkontrolle (mock) diente A549 wt genomische DNA, als Positivkontrolle A549 wt genomische DNA mit einer Kopie des Plasmids pAdMH88 pro Genom. (E) Southern Blot Analyse von viraler DNA aus Ad-FV Hybridvektoren mit PFV gag/pol Sonde; es wurden je 2 ng virale DNA mit 10 µg genomischer DNA von A549 wt Zellen aufgetragen. Als mock Kontrolle wurden 10 µg genomische A549 wt DNA aufgetragen.

andere Schnittstelle liegt im Genom der Zielzelle (Fig. 38 B). Bei einem adenoviralen Genom wird bei AdMH88Tet eine interne 7207 bp Bande, bei AdMH87Tet eine interne 14441 bp Bande erwartet (Fig. 38 A). Zur Kontrolle wurde virale DNA ebenfalls im Southern Blot mit einer FV gag/ pol Sonde analysiert (Fig. 38 E). In genomischer DNA AdMH87Tet infizierter Zellen konnten in Einzelzellklonen multiple Banden nachgewiesen werden (Fig. 38 C). Die detektierten Banden lagen über der prognostizierten Mindestgröße (Fig. 38 B). Ihre Anzahl bewegte sich zwischen vier und über zehn, so dass von multiplen Integrationsereignissen in den AdMH87 Tet infizierten Zellen ausgegangen werden kann. Auch in AdMH88Tet infizierten Zellen konnten multiple Integrate nachgewiesen werden, hier liegt die Anzahl der Integrate zwischen einem und zehn (Fig. 38 D).

In viraler DNA konnten mit der FV gag/pol Sonde im Genom der Hybridvektoren nur die prognostizierten internen Banden detektiert werden (Fig. 38 E), die in den Einzelzellklonen so nicht mehr nachweisbar sind. In manchen Einzelzellklonen sind, neben anderen Banden, solche sichtbar, die im Größenbereich der internen Banden liegen könnten.

Weiterhin wurde genomische DNA der Einzelzellklone in der Southern Blot Analyse mit einer Adenovirus ITR Sonde (Fig. 27) hybridisiert (Fig. 39). Es konnte in genom-

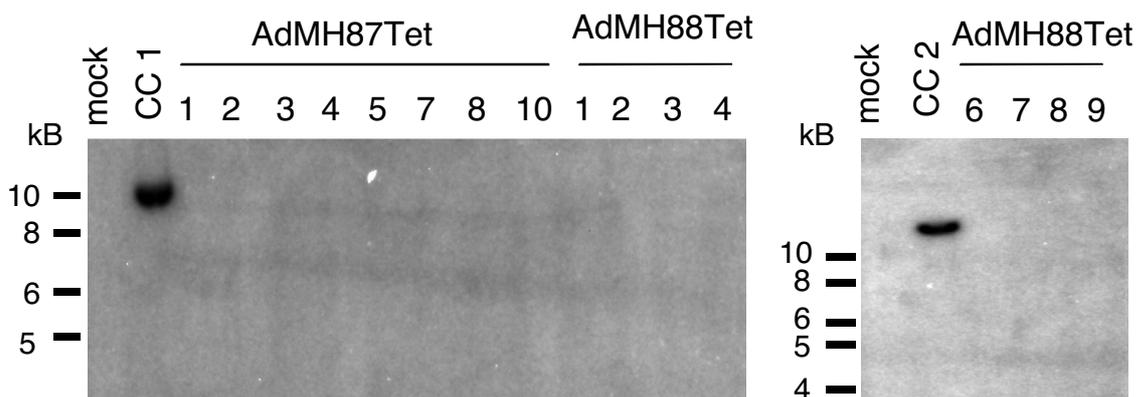


Fig. 39: Southern Blot Analyse von Einzelzellklonen AdMH87Tet und AdMH88Tet infizierter A549 Zellen mit Ad ITR Sonde. Jeweils 10 µg genomischer DNA wurde NcoI verdaut, auf einem 0,8 % Agarsegel aufgetrennt und mit einem Saugblot auf eine Nylonmembran übertragen. Die DNA auf dem Blot wurde mit einer ³²P dATP markierten Ad ITR Sonde (Fig. 27) für 3 h hybridisiert. Als Negativkontrolle (mock) wurde A549 wt genomische DNA verwendet, als Positivkontrolle A549 wt genomische DNA mit einer Kopie des Plasmids pAdMH88 (CC1) bzw pAdMH87 (CC2) pro Genom.

scher DNA der Einzelzellklone AdMH87Tet und AdMH88Tet infizierter Zellen keine adenovirale ITR Sequenz (Fig. 39) nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen waren gut detektierbar (Fig. 39), so dass von einer ausreichenden Sensitivität der Sonde ausgegangen werden konnte. Aufgrund dieser Analysen kann man davon ausgehen, dass in den Einzelzellklonen integrierte FV Vektor Genome nachgewiesen wurden.

4. Diskussion

4.1 Die pH-Abhängigkeit der FV Env vermittelten Penetration

Über die ersten Schritte der foamyviralen Penetration ist bisher nichts bekannt. Die Mechanismen viraler Penetration umhüllter Partikel können in direkte Fusion oder rezeptorvermittelte Endocytose eingeteilt werden (Marsh & Pelchen-Matthews, 2000; Russell & Marsh, 2001). Bei endocytotischen Aufnahmemechanismen findet meist ein pH-abhängiger Schritt statt, der den viralen Partikeln die Möglichkeit gibt, intrazelluläre Kompartimente zu verlassen. Während bei direkter Fusion die Fusionsaktivität des Hüllproteins durch den Kontakt mit dem zellulären Rezeptor aktiviert wird und dadurch eine Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran stattfindet, wird bei endocytotischen Eintrittswegen die Fusionsaktivität des Hüllproteins oft erst durch ein saures Milieu, wie es in endosomalen Kompartimenten vorherrscht, aktiviert (Klasse et al., 1998; Russell & Marsh, 2001).

In dieser Studie wurde gezeigt, dass Foamyviren einen pH-abhängigen, vermutlich endocytotischen Eintrittsweg nutzen, und dass die FV Env Fusionsaktivität pH-abhängig aktiviert wird.

4.1.1 Die Abhängigkeit von lysosomotropen Agenzien der FV Env vermittelten Infektion

In dieser Arbeit wurden mit verschiedenen FV Glykoproteinen pseudotypisierte MuLV Partikel verwendet, da FV nicht mit heterologen Hüllproteinen pseudotypisiert werden können (Pietschmann et al., 1999). Diese haben den Vorteil, dass ein direkter Vergleich zwischen Partikeln, die sich lediglich im Hüllprotein unterscheiden, möglich ist. So konnten FV Env pseudotypisierte Partikel mit MuLV-A Env pseudotypisierten Partikeln, die einen pH-unabhängigen Eintrittsweg nutzen (McClure et al., 1990), und mit VSV-G pseudotypisierten Partikeln, die einen pH-abhängigen Eintrittsweg nutzen (Matlin et al., 1982), verglichen werden.

Der Vergleich zwischen FV Env pseudotypisierten MuLV Capsiden und FV Env pseudotypisierten FV Capsiden in dieser Arbeit (Fig. 16) und in anderen Studien (Lindemann et al., 1997; Pietschmann et al., 1999; Lindemann et al., 2001) lässt vermuten,

dass FV Pseudotypen mit MuLV und PFV Capsiden ein annähernd gleiches Infektionsverhalten zeigen.

Die Infektion von Zielzellen mit MuLV Pseudotypen in Gegenwart von lysosomotropen Agenzien und die anschließende Analyse durch EGFP Markergen-Transfer zeigte, dass die Infektion von PFV Env Pseudotypen, ebenso wie die von VSV-G Pseudotypen, von Ammoniumchlorid, Bafilomycin A1, Concanamycin A und Nigericin inhibiert wird (Fig. 15). Allerdings findet in Gegenwart von Chloroquin keine Inhibition der FV Env vermittelten Infektion statt, wohl aber eine der VSV-G vermittelten Infektion (Fig. 15).

Ammoniumchlorid und Chloroquin sind schwache Basen, die den pH-Wert endosomaler und lysosomaler Kompartimente erhöhen und damit eine pH-abhängige Infektion inhibieren können (Mellmann et al., 1986; Russell & Marsh, 2002). Für viele Viren, die pH-abhängige, endocytotische Eintrittsmechanismen nutzen, wie z.B. Alphaviren (Helenius et al., 1982; Wahlberg & Garoff, 1992) oder Orthomyxoviren (Skehel & Wiley, 2000), konnte eine Inhibition durch schwache Basen gezeigt werden. Die Ursache für die Hemmung der VSV-G vermittelten Infektion durch Chloroquin, nicht aber der PFV Env vermittelten Infektion, ist momentan nicht bekannt; vermutlich unterscheidet sich der PFV Env vermittelte Eintritt von dem VSV-G vermittelten. Allerdings wurde ein ähnliches Phänomen auch bei der Infektion von Moskitozellen durch Sindbis Virus beobachtet (Hernandez et al., 2001). Hier wurde festgestellt, dass in Moskitozellen die Sindbis Virus Infektion von Ammoniumchlorid, nicht aber von Chloroquin inhibiert wurde, obwohl der pH-Wert in Endosomen durch beide Substanzen erhöht wurde. Die Autoren vermuten als Ursache verschiedene Arten von Endosomen, die entweder nur Ammoniumchlorid-sensitiv oder Ammoniumchlorid- und Chloroquin-sensitiv sind (Hernandez et al., 2001).

Concanamycin A und Bafilomycin A1 sind Inhibitoren vakuolärer ATPasen, die reversibel die Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente inhibieren (Drose & Altendorf, 1997). Bafilomycin A1 inhibiert auch generell die Möglichkeit der Fusion früher Endosomen mit späten Endosomen (Clague et al., 1994). Durch die Wirkung vakuolärer ATPase Inhibitoren konnte bereits die Inhibition der Penetration verschiedener Viren, die pH-abhängige, endocytotische Eintrittswege nutzen, gezeigt werden, so z.B. für Alphaviren (Perez & Carrasco, 1994; Glomb-Reinmund & Kielian, 1998), Rhabdoviren (Palokangas et al., 1994) und Orthomyxoviren (Guinea & Carrasco, 1995). Die Hemmung der PFV Env vermittelten Infektion durch vakuoläre ATPase Inhibitoren

zeigt die Abhängigkeit der PFV Infektion von diesen und weist damit auf eine pH-Abhängigkeit der PFV Infektion hin.

Nigericin wird als Prototyp der carboxylischen Ionophoren betrachtet (Pressman, 1976). Carboxylische Ionophoren bilden Komplexe mit Kationen und erhöhen den pH-Wert intrazellulärer Kompartimente durch Austausch von Wasserstoffionen gegen Calciumionen (Pressman, 1976). Es konnte bereits gezeigt werden, dass carboxylische Ionophoren die Penetration von Viren, die einen pH-abhängigen Eintrittsmechanismus nutzen, hemmen (Marsh et al., 1982; Borrow & Oldstone 1994; Irurzun et al., 1997). In dieser Arbeit wurde die PFV Env vermittelte Infektion sowie die VSV-G vermittelte Infektion von Nigericin gehemmt, jedoch nicht die MuLV-A Env vermittelte Infektion (Fig. 19). Auch diese Daten weisen auf eine pH-Abhängigkeit der PFV Infektion hin.

Da die beschriebenen Effekte lysosomotroper Agenzien sowohl bei PFV Env pseudotypisierten MuLV Capsiden als auch bei PFV Env pseudotypisierten PFV Capsiden (Fig. 16) und wt PFV Virus (Fig. 17) zu beobachten sind, kann man einen Capsid-spezifischen Effekt ausschließen, und von einer Wirkung der verwendeten Agenzien auf die Hüllprotein vermittelte Infektion ausgehen. Ebenso kann man ein Zelllinienspezifisches Artefakt ausschließen, da ähnliche Ergebnisse auch bei vergleichbaren Experimenten mit Zelllinien anderer Spezies (3T3, QT-6, XC, BHK) erzielt wurden (Daten nicht gezeigt). Deshalb kann man annehmen, dass bei der PFV Env vermittelten Infektion vermutlich in Zellen verschiedener Spezies derselbe Eintrittsweg genutzt wird.

Env Pseudotypen verschiedener FV Spezies zeigten ein ähnliches Inhibitionsverhalten wie PFV Env Pseudotypen (Fig. 18); allerdings wurde die PFV Env vermittelte Infektion im Vergleich zur Env vermittelten Infektion anderer FV Spezies von Concanamycin A etwas schwächer inhibiert (Fig. 18). Bei der Analyse der pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität von verschiedenen FV Hüllproteinen hat sich gezeigt, dass nur PFV Env bei neutralem pH eine signifikante basale Fusionsaktivität aufweist (Fig. 21). Diese Beobachtung kann die schwächere Inhibition der PFV Env vermittelten Infektion erklären, wenn man bei PFV Env von der Möglichkeit ausgeht, dass, zumindest zu einem gewissen Anteil, auch eine pH-unabhängige Infektion möglich ist.

In einer aktuellen Studie wurde die Wirkung von lysosomotropen Agenzien auf die Infektion von amphotropen und ecotropen MuLV Partikeln analysiert. Dabei wurde

die These aufgestellt, dass die Wirkung von lysosomotropen Agenzien nicht die pH-Abhängigkeit der Infektion reflektiert, sondern die Partikelstabilität während der Infektion (Katen et al., 2001). Die Autoren vermuteten, dass lysosomotrope Agenzien möglicherweise die Infektion pH-abhängiger und pH-unabhängiger Viren inhibieren können, so dass die registrierte Hemmung lediglich dem Titerverlust während der reversiblen Infektionshemmung entspricht (Katen et al., 2001). In dieser Arbeit konnte kein Einfluss von Concanamycin A und Ammoniumchlorid auf die Partikelstabilität festgestellt werden (Fig. 20). Im Gegensatz zu den in Katen et al., 2001 publizierten Daten konnte hier eine annähernd gleiche Partikelstabilität für VSV-G und MuLV-A Pseudotypen registriert werden (Fig. 20). Da in dieser Arbeit trotz annähernd gleicher Partikelstabilität ein stark unterschiedliches Infektionsverhalten von MuLV-A Env und VSV-G Pseudotypen in Gegenwart lysosomotroper Agenzien festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Infektionsanalysen mit lysosomotropen Agenzien in dieser Arbeit nicht die Partikelstabilität reflektieren. Auch weisen die Ergebnisse der pH-abhängigen Fusionsanalysen (Fig. 21) auf eine pH-abhängige Aktivierung bzw. Verstärkung der FV Env Fusionsaktivität hin. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Partikelstabilität von MuLV Env und VSV-G Pseudotypen in dieser Untersuchung und der Katen et al., 2001 Publikation können möglicherweise auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen und auf die verwendeten Zelllinien der jeweiligen Arbeiten zurückzuführen sein.

4.1.2 Die pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität des FV Hüllproteins

Weder MuLV-A Env noch MuLV-E Env exprimierende Zellen bilden in saurem Milieu Syncytien; und damit wird die Fusionsaktivität von MuLV Env vermutlich in saurem Milieu nicht aktiviert (Ragheb & Anderson, 1994). Da allerdings MuLV Env erst durch die Entfernung des R-Peptids im Verlauf der Partikelreifung durch die virale Protease fusionsaktiv wird (Green et al., 1981; Ragheb & Anderson, 1994), wurde in dieser Arbeit zur weiteren Kontrolle eine R-Peptid defiziente Mutante (MuLV-A R-) verwendet. Während MuLV-A Env exprimierende Zellen in saurem wie neutralem Milieu keine Fusionsaktivität aufwiesen, waren MuLV-A R- Env exprimierende Zellen bei jedem pH-Wert des umgebenden Mediums stets stark fusionsaktiv. Bei beiden MuLV-A Hüllproteinen wurde keine signifikante Änderung der Fusionsaktivität bei ver-

schiedenen pH-Werten registriert. Aufgrund dieser Daten kann man annehmen, dass die Fusionsaktivität von MuLV-A Env, wie bereits beschrieben (Rein et al., 1994; Yang & Compans, 1997), pH-unabhängig reguliert wird. VSV-G exprimierende Zellen bildeten bei saurem pH Syncytien aus, die maximale Fusionsaktivität lag bei pH 6,0 (Fig. 21+22). Die VSV-G vermittelte Infektion ist pH-abhängig und VSV benutzt einen endocytotischen Eintrittsweg (Skehel & Wiley, 2000; Russell & Marsh, 2001), so dass die Ergebnisse im Bereich der Erwartung lagen. Die maximale Fusionsaktivität um pH 6,0 könnte auf eine Aktivierung der Fusionsaktivität in frühen Endosomen hinweisen.

In der Fusionsanalyse zeigte sich, dass die Fusionsaktivität aller FV Hüllproteine in saurem Milieu aktiviert wird (Fig. 21+22); ähnliche Ergebnisse wurden bereits für ASLV Env publiziert (Mothes et al., 2000). Nur bei PFV Env exprimierenden Zellen wurde eine basale Fusionsaktivität festgestellt, die in saurem Milieu um das zwei- bis dreifache gesteigert werden konnte. Alle anderen FV Hüllproteine zeigten keine signifikante Fusionsaktivität bei neutralen pH-Werten, aber eine starke Induktion der Fusionsaktivität in saurem Milieu (Fig. 21). Bei PFV Env wurde bereits eine Fusionsaktivität bei neutralem pH beobachtet, die maßgeblich von der membranspannenden Domäne von Env beeinflusst wird (Pietschmann et al., 2000). Vermutlich kann die PFV Env vermittelte Infektion auch pH-unabhängig verlaufen. Diese Daten korrelieren mit dem inhibitorischen Effekt von Concanamycin A auf die PFV Env vermittelte Infektion (Fig. 18); in Gegenwart dieses Agens wurde die Infektion von PFV Pseudotypen etwas schwächer als die Infektion von anderen FV Pseudotypen inhibiert. Die Ursache der basalen Fusionsaktivität von PFV Env im Gegensatz zu anderen FV Env ist momentan nicht bekannt; möglicherweise handelt es sich um eine *in vitro* Adaption, da die provirale Sequenz, aus der die PFV env Sequenz kloniert wurde, von einem Virusisolat stammt, das zuvor oft *in vitro* passagiert wurde. Klärung würde eine Analyse nah verwandter Primatenfoamyvirusisolate bringen, von denen PFV mit hoher Wahrscheinlichkeit abstammt (Herchenröder et al., 1994).

Im Gegensatz zu ASLV Env, dessen Fusionsaktivität erst nach längerer Exposition in saurem Milieu aktiviert wird (Mothes et al., 2000), reicht bei FV Env eine Exposition von 30 sec aus, um die maximale Fusionsaktivität zu erreichen (Fig. 22). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass FV Env möglicherweise einen ähnlichen Mechanismus zur Fusionsaktivierung wie klassische pH-abhängige virale Glykoproteine, wie z.B. Influenza Haemagglutinin oder VSV-G benutzt, deren Fusionsaktivität wahr-

scheinlich durch eine sofortige Konformationsänderung bei Exposition in saurem Milieu aktiviert wird (White et al., 1981; Skehel & Wiley, 2000). VSV und Influenza werden durch Endocytose aufgenommen (Skehel & Wiley, 2000); die schnelle Aktivierung der FV Env Fusionsaktivität weist ebenfalls auf einen endocytotischen Aufnahmeweg von FV Env hin. Auch die maximale Fusionsaktivität von FV Hüllproteinen bei pH 5,5-5,0 weist auf einen endocytotischen Aufnahmemechanismus hin. Da in späten Endosomen ein pH-Wert von 5,5-5,0 vorliegt (Russell & Marsh, 2001), könnte bei einem endocytotischen Aufnahmeweg die Fusionsaktivität von FV Env in späten Endosomen aktiviert werden, um eine Verschmelzung der viralen Hüllmembran mit der endosomalen Membran zu ermöglichen.

4.1.3 Die foamyvirale Penetration

Die retrovirale Penetration verläuft nach bisherigem Wissen pH-unabhängig über direkte Fusion (McClure et al., 1994); als Ausnahme ist bisher lediglich MMTV, das vermutlich pH-abhängig endocytotische Eintrittswege nutzt (Redmond et al., 1984) und ASLV bekannt, bei dem erst kürzlich eine pH-Abhängigkeit beschrieben wurde (Mothes et al., 2000). Neuere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass viele Retroviren, wie z.B. HIV, möglicherweise auch durch endocytotische Mechanismen in Zellen aufgenommen werden können (White, 2000; Matthias Dittmar, persönliche Mitteilung). Somit ist es schwer, eine eindeutige Aussage über einen retroviralen Eintrittsmechanismus zu treffen.

Die FV Env vermittelte Infektion ist von vakuolären ATPasen abhängig und wird von schwachen Basen und carboxylischen Ionophoren inhibiert. Des Weiteren wird die Fusionsaktivität von FV Env durch ein saures Milieu aktiviert und die maximale Fusionsaktivität wird bei pH 5,5-5,0 erreicht. Diese Daten weisen auf einen pH-abhängigen Eintrittsweg hin. Für Viren, deren Infektion pH-abhängig verläuft, wurden in vielen Fällen bereits endocytotische Eintrittswege nachgewiesen (Russell & Marsh, 2001). So benutzt z.B. VSV, dessen Glykoprotein in dieser Arbeit als Kontrolle verwendet wurde, einen endocytotischen Eintrittsweg (Matlin et al., 1982; Skehel & Wiley, 2000). Die sehr schnelle pH-abhängige Aktivierung der Fusionsaktivität deutet ebenfalls auf einen endocytotischen Eintrittsweg hin, wie er z.B. von Influenza benutzt wird. Dabei ändert das Influenza Haemagglutinin in saurem Milieu, wie es in Endosomen vorherrscht, seine Konformation und wird fusionsaktiv (Skehel & Wiley,

2000). Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann man für die FV Penetration, mit der Ausnahme von PFV, bei dem auch möglicherweise pH-unabhängige Eintrittswege möglich sind, einen endocytotischen Aufnahmemechanismus postulieren. Dieser Eintrittsweg unterscheidet sich allerdings von dem von VSV, da die FV Env vermittelte Infektion im Gegensatz zur VSV-G katalysierten Infektion nicht von Chloroquin inhibiert wird.

Foamyviren sind möglicherweise das evolutionäre Bindeglied zwischen Orthoretroviren und Hepadnaviren (Linial, 1999; Lecellier & Saib, 2000). Da Hepadnaviren mit hoher Wahrscheinlichkeit endocytotische Eintrittswege nutzen (Breiner & Schaller, 2000), sind diese Ergebnisse auch im evolutionären Kontext interessant.

4.2 Konstruktion und Analyse von Ad-FV Hybridvektoren

Das funktionale Ziel der in dieser Arbeit entwickelten Ad-FV Hybridvektoren ist die Kombination der Vorteile adenoviraler Vektoren mit denen foamyviraler Vektoren, um ein effizientes System zum somatischen Gentransfer zu schaffen. Während adenovirale Vektoren in hohen Titern herstellbar sind (bis 10^{12} iU/ml) und ein sehr großes Verpackungslimit haben (bis 35 kB bei HC-Ad Vektoren), können FV Vektoren nur in Titern bis 10^8 iU/ml hergestellt werden und haben ein Verpackungslimit von ca. 9 kB. FV Vektoren integrieren allerdings, wie alle retroviralen Vektoren, stabil in das Genom der Zielzelle, während adenovirale Vektoren transient im Cytoplasma persistieren, und nur zu einem sehr geringen Anteil von 0,001%-1% zufällig integrieren (Harui et al., 1999). Die Konstruktion von integrationsfähigen Vektoren, die mit hohen Titern hergestellt werden können, ist das Hauptziel der Entwicklung von Adenovirus-Retrovirus Hybridvektoren. Ad-FV Vektoren bieten sich als gute Alternative zu den bisher für die Konstruktion von Adenovirus-Retrovirus Hybridvektoren verwendeten Gammaretroviren an. Ihre offensichtliche Apathogenität (Meiering & Linial, 2001) und die Möglichkeit, über den intrazellulären Reintegrationsmechanismus ohne extrazelluläre Retrovirus Partikel Zielzellen stabil zu transduzieren (Heinkelein et al., 2000), bietet einen Gewinn an Sicherheit in der Anwendung.

4.2.1 Funktionalität der Ad-FV Hybridvektoren ohne regulierbare Expression

Zunächst wurden in dieser Arbeit Ad-FV Vektoren hergestellt, die den FV Vektor unter Kontrolle eines CMV-Promotors (Immediate-early-Promotor des humanen CMV) konstitutiv exprimieren. Diese Vektoren konnten in mit herkömmlichen HC-Ad Vektoren vergleichbaren Titern (10^8 - 10^{10} iU/ml) hergestellt werden. Sie zeigten in der Southern Blot Analyse verschiedener Regionen der Vektorgenome die erwarteten Banden, was auf funktionale virale Genome schließen lässt (Fig. 28). In infizierten Zellen konnte bei den Ad-FV Vektoren AdMH88 und AdMH87 eine funktionale FV Expression festgestellt werden. Bei der Integrasemutante AdMH91 wurde allerdings keine Gag Expression detektiert (Fig. 29). Dieser Vektor wurde deshalb in Folgeversuchen nicht mehr eingesetzt.

Um die Fähigkeit der Vektoren zum langfristigen Gentransfer (GT) zu überprüfen, wurden Zellen mit den Vektoren infiziert und der Verlauf der Transgenexpression für 21 Tage analysiert. In einzelnen Kontrollexperimenten wurde der Verlauf der Transgenexpression bis zu einer Dauer von 56 Tagen beobachtet, dabei ergab sich keine signifikante Änderung des Anteils GFP positiver Zellen zu dem, der an Tag 21 gemessen wurden. Daraus kann man schließen, dass die an Tag 21 gemessenen Werte einen validen Anhaltspunkt zur Feststellung einer stabilen Transduktionsrate bieten. Infektionen mit dem Env exprimierenden Hybridvektor AdMH87 mit MOI 100 zeigten zelllinienabhängig einen ungefähr um den Faktor 10 bis 400 größeren Anteil langfristig transduzierter Zellen als mit dem HC-Ad Vektor AdFK7 infizierte Zellen, mit MOI 30 ungefähr um den Faktor 15-200 (Fig. 30). Durch Überstandtransfer von Ad-FV Vektoren infizierten Zellen konnte die Produktion von infektiösen Vektorpartikeln in AdMH87 infizierten Zellen, und damit Transduktion durch einen Sekundärzyklus, belegt werden. Bei mit AdMH88 mit MOI 100 infizierte Zellen, bei denen die retrovirale Integration nur über den intrazellulären Reintegrationszyklus verlaufen kann, da keine FV Partikel freigesetzt werden können, wurde zelllinienabhängig eine um den Faktor 2-5 höhere langfristige Transduktionsrate als mit AdFK7 beobachtet. Bei Infektionen mit MOI 30 lag die langfristige Transduktionsrate etwa um den Faktor 3 bis 5 höher als bei AdFK7 infizierten Zellen (Fig. 30). Der HC-Ad Vektor AdFK7 (Kreppel et al., 2002) exprimiert das EGFP Markergen lediglich transient, zelllinienabhängig sank der Anteil transduzierter Zellen nach 10-14 Tagen wie für adenovirale Vektoren in vitro beobachtet (Soifer et al., 2001) unter 1%-0,1%

des ursprünglichen Wertes in den Bereich des Detektionslimits ab (Fig. 30). Die dennoch über den gesamten Zeitraum GFP exprimierenden Zellen, die mit AdFK7 infiziert wurden, sind vermutlich auf eine spontane adenovirale Integration zurückzuführen. Spontane Integrationen kommen zelllinienabhängig und vektorabhängig bei humanen Zellen zu einem Anteil von 0,001-1 % der gesamten Population infizierter Zellen vor, dabei werden jedoch oft nur Teile des adenoviralen Genoms integriert oder es kommen Duplikationen von Teilen des Genoms vor (Harui et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ad-FV Hybridvektoren AdMH88 und AdMH87 funktional hergestellt werden konnten, jedoch nicht die Integrase inaktivierte Mutante AdMH91. Die Vektoren AdMH88 und AdMH87 konnten in hohen Titern hergestellt werden und zeigten eine deutlich erhöhte stabile Transduktion *in vitro* gegenüber herkömmlichen HC-Ad Vektoren. Die Partikelfreisetzung von AdMH87 infizierten Zellen, und die im Gegensatz zu AdMH88 infizierten Zellen hohe Effizienz des langfristigen Markergentransfers, deutet mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen Transduktionsmechanismus durch einen Sekundärzyklus über extrazelluläre Vektorpartikel hin. AdMH88 infizierte Zellen zeigten einen um den Faktor 2-5 größeren Anteil stabil transduzierter Zellen. Es wurde bereits gezeigt, dass in einem Adenovirus-MuLV Hybridvektorensystem die LTRs mit *cis* aktiven Sequenzen allein, ohne weitere virale Genprodukte, zur Integration ausreichend sind (Zheng et al., 2000; 2002; 2003). Mit diesem System konnten *in vitro* Transduktionraten von 1,3% bis 8% erreicht werden. Da in den Infektionsversuchen mit Ad-FV Vektoren eine Kontrolle mit gleicher Vektorstruktur, aber mit nicht funktionellen Proteinen (z.B. Integrase) fehlt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Anteil stabil transduzierter Zellen möglicherweise nicht durch reguläre FV Vektor Integration, initiiert durch FV Proteinexpression, sondern lediglich durch die LTR Sequenzen im FV Vektorgenom zustande kam. Zur genaueren Untersuchung des stabilen Gentransfers in Abhängigkeit von der Expression der FV Proteine wurden Ad-FV Vektoren mit regulierbaren Promotoren konstruiert. Dabei wurde auch ein Kontrollvektor mit nicht funktionellem FV pol ORF hergestellt.

4.2.2 Funktionalität von Ad-FV Hybridvektoren mit regulierbarer Expression

In den Ad-FV Vektoren mit regulierbarer Genexpression (Ad-FVTet) wurde zur Kontrolle der Promotoraktivität das mit Doxycyclin induzierbare Tet-on System verwendet

(Gossen & Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Als Kontrolle zum Nachweis der FV Integration wurde der Vektor AdMH89Tet verwendet, der dem AdMH88Tet entspricht, aber durch eine Mutation des pol Startcodons Pol nicht exprimieren kann. Durch Transfektion der Plasmide, die die jeweiligen Ad-FVTet Vektoren enthalten, konnte die Funktionalität der FV Vektoranteile auf Plasmidbasis bestätigt werden. Dazu wurde der Überstand der transfizierten Zellen auf Zielzellen übertragen, und der Transfer des EGFP Gens durch den Vektor analysiert. Während in mit pAdMH87Tet transfizierte Zellen GT nachgewiesen werden konnte, war ein GT in pAdMH88Tet transfizierte Zellen, die kein env ORF im Vektor enthalten, erst bei Cotransfektion mit einem Env exprimierendem Plasmid zu detektieren (Fig. 32). pAdMH89Tet transfizierte Zellen, die kein env ORF und ein nicht voll translatierbares pol ORF im Vektor enthalten, waren erst nach Cotransfektion mit einem Env und mit einem Pol exprimierendem Plasmid zu einem GT in der Lage. Auch die expressionsregulierbaren Ad-FV Vektoren konnten mit zu herkömmlichen HC-Ad Vektoren vergleichbaren Titern von 10^8 bis 10^{10} iU/ml hergestellt werden.

In der Expressionsanalyse konnte in Ad-FVTet infizierten Zellen eine ordnungsgemäße Proteinexpression der FV Genprodukte nachgewiesen werden (Fig. 33). In AdMH88Tet und AdMH89Tet infizierten Zellen wurden die Gag Proteine pr71/p68 nachgewiesen, in AdMH89Tet infizierten Zellen nur das Vorläuferprotein pr71 Gag, da wegen des Fehlens der viralen Protease keine Prozessierung mehr stattfinden konnte. Das Pol Vorläuferprotein, die Integrase und die Reverse Transkriptase konnten ebenfalls in AdMH88Tet und AdMH87Tet infizierten Zellen nachgewiesen werden (Fig. 33), in AdMH89Tet infizierten Zellen wurde ein schwach exprimiertes ca. 110 kD großes Protein detektiert. Dieses Protein ist vermutlich ein pol Produkt, das durch die Benutzung eines späteren Startcodons exprimiert wurde. Die Induzierbarkeit der FV Proteinexpression mit Doxycyclin konnte anhand der Expressionsanalyse gezeigt werden. In AdMH88Tet infizierten Zellen wurde eine Basalexpression der FV Proteine nachgewiesen, die durch Doxycyclin allerdings deutlich verstärkt wurde, während in AdMH87Tet und AdMH89Tet infizierten Zellen nur in Gegenwart von Doxycyclin FV Proteinexpression detektierbar war. Der Funktionalitätstest der Ad-FVTet Vektoren auf Plasmidbasis weist ebenfalls auf die Induzierbarkeit der FV Proteinexpression hin.

Der langfristige GT durch Ad-FVTet Vektoren wurde durch Infektionsanalysen untersucht. Dabei wurden Zellen infiziert und in regelmäßigen Abständen bis 28 Tage

nach Infektion wurde der Anteil stabil Transgen exprimierender Zellen bestimmt. In einzelnen Kontrollexperimenten bis zu einer Dauer von 70 Tagen konnte keine signifikante Änderung des Anteils GFP positiver Zellen zu den an Tag 28 gemessenen Werten festgestellt werden. Daraus kann man schließen, dass die an Tag 28 gemessenen Werte einen validen Anhaltspunkt zur Feststellung einer stabilen Transduktionsrate bieten.

Die langfristig stabilen GT Raten von in Gegenwart von Doxycyclin mit AdMH87Tet und AdMH88Tet infizierten Zellen waren signifikant höher als die der mit dem HC-Ad Vektor AdFK7 oder dem Ad-FV Kontrollvektor AdMH89Tet infizierten Zellen (Fig. 34). Man konnte in AdMH87Tet infizierten Zellen etwa um den Faktor 500-900 mehr langfristig GFP exprimierende Zellen als in AdFK7 infizierten Zellen nachweisen. Mit diesem Vektor wurde auch ein um den Faktor 100-200 höherer Anteil stabilen GTs als mit AdMH88Tet erzielt. Im Überstand von AdMH87Tet infizierten Zellen konnte auch die Freisetzung infektiöser FV Vektorpartikel detektiert werden (Fig. 35), was wie die Infektionsdaten auf stabile Transduktion durch einen Sekundärzyklus über extrazelluläre Partikel hinweist und die postulierte Funktion des Vektors bestätigt. Auch ohne Doxycyclin lag der Anteil langfristig GFP exprimierender Zellen um den Faktor 10 höher als in mit herkömmlichen HC-Ad Vektoren transduzierten Zellen (Fig. 34). In AdMH88Tet infizierten Zellen, die zur stabilen Transduktion auf den intrazellulären Reintegrationszyklus angewiesen sind, wurde in Gegenwart von Doxycyclin ebenfalls eine Erhöhung des Anteils langfristig transduzierter Zellen, um den Faktor 8-10 gegenüber AdFK oder AdMH89Tet infizierten Zellen, beobachtet. Der Vektor AdMH89Tet entspricht in der Vektorstruktur dem AdMH88Tet, besitzt aber ein nicht funktionelles pol ORF. Mit AdMH89Tet infizierte Zellen wiesen einen vergleichbaren Anteil langfristig GFP positiver Zellen wie AdFK7 infizierte Zellen auf. Diese Daten deuten auf die Notwendigkeit der Pol Expression für die langfristige Transgenexpression in Zielzellen, und damit auf eine Transduktion durch den intrazellulären Reintegrationszyklus bei AdMH88Tet hin. Die erhöhte Persistenz der Transgenexpression durch Ad-FV Hybridvektoren ist damit wahrscheinlich auf die FV Proteinexpression, und nicht auf die Vektorstruktur allein zurückzuführen.

Ohne die Zugabe von Doxycyclin wurden bei gleicher initialer Primärtransferrate in Infektionsexperimenten mit AdMH87Tet und AdMH88Tet signifikant niedrigere Raten persistierender GTs beobachtet, während mit AdFK7 und AdMH89Tet kein signifikanter Unterschied feststellbar war. Die Induzierbarkeit des stabilen GT durch Doxy-

cyclin belegt zusätzlich die Rolle der FV Proteinexpression bei der Etablierung persistierender GTs durch Ad-FVTet Vektoren. Der bei AdMH87Tet infizierten Zellen ohne Doxycyclin höhere Anteil langfristig GFP positiver Zellen im Vergleich zu AdMH89Tet oder AdFK7 infizierten Zellen kann durch eine niedrige basale Aktivität des CMVTet Promotors, die auch schon beim Funktionalitätstest der Vektorplasmide detektiert wurde, erklärt werden.

Der HC-Ad Vektor AdFK7 exprimiert das EGFP Markergen lediglich transient, zelllinienabhängig sank der Anteil transduzierter Zellen nach 10-14 Tagen wie für adenovirale Vektoren in vitro beobachtet (Soifer et al., 2001) unter 1%-0,01% des ursprünglichen Wertes ab (Fig. 30). Die längerfristig stabile Markergenexpression von AdMH89Tet und AdFK7 infizierten Zellen ist vermutlich auf spontane adenovirale Integrationen zurückzuführen.

Die Zugabe von Doxycyclin ist bei AdMH87Tet und AdMH88Tet für ungefähr 2 Tage notwendig um einen optimalen Markergentransfer zu erhalten (Fig. 36). Die adenoviral transient transduzierten Zellen verlieren das adenovirale Genom relativ schnell, schon nach 7 Tagen sind nur noch 10% der nach 2 Tagen nach Infektion GFP exprimierenden Zellen Markergen positiv. Dieser Befund wird durch die Tatsache unterstützt, dass bereits 10 Tage nach Infektion keine Freisetzung foamyviraler Vektorpartikel von AdMH87Tet infizierten Zellen mehr detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Der schnelle Verlust des adenoviralen Genoms, von dem die FV Proteine exprimiert werden, macht möglicherweise eine längere Induktion der Transkription unnötig.

Der hohe Anteil langfristig GFP positiver Zellen weist auf reguläre retrovirale Integrationsereignisse hin. In der Southern Blot Analyse 28 Tage infizierter Zellen war es möglich, multiple Integrate des FV Vektors in AdMH87Tet und AdMH88Tet infizierten Zellen nachzuweisen (Fig. 38). Es konnten auch keine adenoviralen ITR Sequenzen detektiert werden (Fig. 39). Mit Adenovirus-Retrovirus Hybridvektoren konnten in vergleichbaren Analysen mit einem Ad5 Zweitgenerations-MuLV Hybridvektor ein bis zwei Integrate (Zheng et al., 2000), mit einem Ad5 HC-Ad-LINE-1 (Retrotransposon) (Soifer et al., 2001) Hybridvektor ein Integrat pro zellulärem Genom nachgewiesen werden. Die vergleichsweise hohe Anzahl von Integraten in AdMH87Tet/AdMH88Tet infizierten Zellen ist vermutlich durch die in dieser Arbeit verwendete relativ hohe MOI bedingt, die zur besseren Analyse der Vektoren ausgewählt wurde. Eine hohe Anzahl von Integraten kann Vor- und Nachteile haben. So bewirken mehr Integrate

eine höhere Transgenexpression, allerdings auch eine erhöhte Gefahr wichtige zelluläre Gene oder regulatorische Sequenzen durch die Integration zu beschädigen. Im Tiermodell wurde bereits gezeigt, dass die retrovirale Integration von MuLV Vektoren Leukämien induzieren kann (Li et al., 2002). In einem gentherapeutischen Ansatz mit MuLV Vektoren wurden mittels ex vivo Gentransfer von Knochenmarkstammzellen 10 von 11 Patienten von X-chromosomal gekoppelter γ -Ketten Immundefizienz (X-SCID) geheilt (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Allerdings entwickelten zwei Patienten nach der Behandlung eine Leukämie (Check, 2002; Hacein-Bey-Albina et al., 2003), die mit hoher Sicherheit durch die Integration des MuLV Vektorgenoms in ein an der Entwicklung von Leukämie beteiligtes Gen (CMO-2) ausgelöst wurde. Die Insertionsmutagenese von MuLV, die zur Bildung von Leukämien führt, ist ein Prozess natürlicher Pathogenität (Tsichlis & Lazo, 1991; Rosenberg & Jolicoeur, 1997). Bei FV infizierten natürlichen Wirten oder zoonotisch infizierten Menschen wurde bisher keine Pathogenität nachgewiesen (Meiering & Linial, 2001).

Eine funktionale Proteinexpression der FV Vektor Kasette konnte in infizierten A549 und HT1080 Zellen gezeigt werden, in HuH7 Zellen war die Expression foamyviraler Proteine jedoch sehr schwach und konnte nur an der Detektionsgrenze nachgewiesen werden. In Infektionsversuchen mit HuH7 Zellen war bei gleicher primärer Infektionsrate wie bei A549 oder HeLa Zellen keine erhöhte Persistenz des Markergentransfers in von AdMH87Tet oder AdMH88Tet infizierten Zellen nachweisbar. HuH7 Zellen sind allerdings genauso effizient wie A549 oder HeLa Zellen von FV infizierbar (Daten nicht gezeigt). Daher kann man von einer deutlich niedrigeren Effizienz der Genexpression der FV Vektorkasette, wahrscheinlich durch eine niedrigere Aktivität des CMV-Promotors bzw. des CMV-Minimalpromotors in HuH7-Leberzellen, ausgehen. In der Literatur wurden allerdings keine besonders niedrigen Aktivitäten des CMV-Promotors in Leberzellen beschrieben, so wurden in der Leberzelllinie Hep-G2 und in in vivo Expressionsversuchen in der Leber von Mäusen mit verschiedenen, in Hinblick auf den Promotor und das Polyadenylierungssignal vergleichbaren, CMV-Promotor Expressionskonstrukten auf Plasmidbasis gute Ergebnisse erzielt (Xu et al., 2001). Auch mit der Genexpression von CMV-Promotor getriebenen Proteinen von Ad Erstgenerationsvektoren in primären Hepatocyten wurden gute Ergebnisse erzielt (Okada et al., 2000).

Diese Daten belegen, dass das Ad-FV Vektorsystem eine signifikante Zelltyp-abhängigkeit aufweist, eine weitere Untersuchung der Zellspezifität des Ad-FV Vektorsystems ist daher notwendig.

4.2.3 Vorteile und Einsetzbarkeit der Ad-FV Hybridvektoren im Vergleich zu anderen Hybridvektor Systemen

Virale Vektoren gewinnen zunehmend an Bedeutung für gentherapeutische Zwecke, da Viren als natürlicher Mechanismus zur Expression fremder genetischer Information in humane Zellen effizienten Gentransfer und komplexe Regulation der Genexpression ermöglichen (Lazo & Yunta, 2000). Herkömmliche virale Vektorsysteme sind allerdings in der Gentransfereffizienz limitiert (1.4.1), so dass zur Zeit eine verstärkte Suche nach Alternativen stattfindet. Es gibt vielfältige Ansätze für Hybridvektorsysteme, um die Vorteile verschiedener Vektoren zu kombinieren. Hauptsächlich haben sich im Bereich der adenoviralen Hybridvektorsysteme Ad-Retrovirus sowie Ad-Retrotransposon Hybridvektoren, Ad-AAV Hybridvektoren und Ad-Herpesvirus Systeme als erfolgversprechende Ansätze etabliert (Lam & Breakefield, 2000). Bei diesen Systemen steht die Verlängerung der adenoviralen Persistenz im Vordergrund, durch retrovirale Integration, AAV Integration oder herpesvirale dauerhafte Persistenz. Neben adenoviralen Hybridvektorsystemen wurden auch andere, wie z.B. Herpesvirus-Retrovirus Vektoren, entwickelt (Lam & Breakefield, 2000).

Die Vektoren AdMH87/AdMH87Tet weisen im Vergleich zu bisher publizierten Adenovirus-Retrovirus Hybridvektoren mit Sekundärzyklus viele Vorteile auf. Adenovirus-Retrovirus Vektoren, die wie AdMH87/AdMH87Tet in den Adenovirus infizierten Zellen retrovirale Partikel freisetzen, wurden bisher auf MuLV Basis konstruiert (Feng et al., 1997; Reynolds et al., 1999; Caplen et al., 1999). Der in diesen Konstrukten verwendete Ad Vektor beruht wie bei Ad-FV Vektoren auf Ad 5 Basis, allerdings wurden adenovirale Erst- oder Zweitgenerationsvektoren verwendet. Diese adenoviralen Vektoren enthalten ein vollständiges Ad Genom, bei dem lediglich die E1A/E1B und bei einigen die E3 Region deletiert und durch eine Transgen Kassetten ersetzt wurde. Bei den hier beschriebenen Ad-FV Hybridvektoren handelt es sich um HC-Ad Vektoren (Kochanek et al., 2001), die keine adenoviralen Sequenzen außer den ITRs und dem Verpackungssignal enthalten. Der Vorteil der HC-Ad Vektoren liegt in einer erhöhten Sicherheit in der Anwendung; da keine adenoviralen Gene mehr vorhanden

sind, findet auch keine residuale Ad Genexpression mehr statt (O'Neal et al., 2000, Kochanek et al., 2001). Transkomplementierungen und Rekombinationsereignisse aufgrund adenoviraler Sequenzen sind fast ausgeschlossen (Kochanek et al., 2001). In bisher publizierten Ad-MuLV Hybridvektoren mit Sekundärzyklus wurden, hauptsächlich aufgrund des niedrigen Verpackungslimits der verwendeten adenoviralen Vektoren, Zwei- (Feng et al., 1997; Reynolds et al., 1999) oder Vier-Vektorsysteme (Caplen et al., 1999) zur Expression der zur retroviralen Partikelbildung notwendigen Proteine verwendet. Der Nachteil dieser Systeme liegt darin, dass zur erfolgreichen Infektion eine größeren Partikelanzahl notwendig ist; eine Zelle muss zur Produktion von retroviralen Partikeln von zwei oder mehr verschiedenen adenoviralen Partikeln zugleich infiziert werden. Durch die größere Anzahl an Partikeln erhöht sich auch die Gefahr von starken Immunreaktionen des Wirts.

Es wurde auch ein HC-Ad-MuLV Hybridvektor beschrieben, der in Zielzellen replikationsfähige ecotrope MuLV Partikel freisetzt. Dieses System ist allerdings in dieser Form nicht einsetzbar, da die Vektorkomponenten im Primärzyklus keine murinen Zellen infizieren können, im Sekundärzyklus allerdings nur murine Zellen (Soifer et al., 2002). Es dient deshalb bisher nur der Beantwortung grundwissenschaftlicher Fragestellungen. Die Freisetzung von replikationsfähigen Partikeln in Zielzellen birgt auch schlecht einschätzbare Risiken.

Mit AdMH87/AdM87Tet konnte in dieser Arbeit ein im Vergleich mit bisherigen Publikationen von Ad-MuLV Vektoren sehr effizientes System vorgestellt werden, das hauptsächlich über extrazelluläre retrovirale Partikel eine stabile Transduktionsrate von bis zu 80-100% der infizierten Zellpopulation bewirkt, etwa um den Faktor 15-900 mal effizienter als herkömmliche adenovirale Vektoren (3.2.2.3). Ein Vergleich zur Effizienz des Transgentransfers mit bisher publizierten Ad-MuLV Systemen und AdMH87/AdMH87Tet ist wegen der stark unterschiedlichen experimentellen Methoden nur bedingt möglich. Um einen aussagekräftigen Vergleich durchzuführen wäre ein direkter Vergleich verschiedener Systeme im gleichen Ansatz notwendig.

Ad-Retrovirus Hybridvektoren, die wie AdMH88/AdMH88Tet ohne extrazelluläre Retroviruspartikel stabil transduzieren, wurden bisher nur auf der Basis von Ad5 Erst-/Zweitgenerationsvektoren und MuLV verwendet (Zheng et al., 2000; 2002; 2003) (Murphy et al., 2002). Dabei wurden zwei verschiedene Ansätze beschrieben, zum einen ein System, bei dem die Struktur des Vektors für die Integration ausreichend ist. Die Retrovirus Kasette enthält lediglich die LTRs und cis aktive Sequenzen,

retrovirale Proteine sind zur stabilen Integration nicht notwendig (Zheng et al., 2000; Zheng & Baum, 2002; Zheng et al., 2003). Mit diesem System konnten in vitro Integrationsraten bis zu 8% erzielt werden, allerdings sind auch hier Vergleiche mit AdMH88/AdMH88Tet wegen der unterschiedlichen experimentellen Ansätze zur Analyse des GT nur bedingt möglich. Zum anderen wurde auch ein chimäres Vektorsystem beschrieben, das mittels MuLV Integrase MuLV 2-LTR-Zirkel integriert (Murphy et al., 2002). Die Entwicklung eines ähnlichen Systems für FV wurde verfolgt, blieb jedoch erfolglos, da die FV Integrase keine 2-LTR-Zirkel integrieren kann (Russell et al., 2002). Auf Ad5 HC-Ad-Vektor Basis, wie AdM88/AdMH88Tet, konnte ein erfolgreicher Gentransfer mit einem Ad-Retrotransposon Vektor gezeigt werden (Soifer et al., 2001). Der Ad-Retrotransposon Vektor ist allerdings im Bereich der humanen in vivo Anwendung nicht unbedenklich, da ein humanes LINE Element verwendet wurde. Solche Retrotransposons oder Fragmente solcher transposablen Elemente sind häufig im humanen Genom zu finden (Boeke & Stoye, 1997), was die Gefahr einer Rekombination oder Transkomplementation stark erhöht. Die Integrationsfrequenz mit den chimären Ad-LINE Vektoren war allerdings gering und lag nahe bei der zufälligen Integrationsrate (Soifer et al., 2001; Kochanek et al., 2001). Mit AdMH88/AdMH88Tet Vektoren konnten 0,5%-2% der primär infizierten Zielzellen stabil transduziert werden. Die retrovirale Transduktionsrate liegt damit zwar niedriger als in anderen Systemen, wo sie bei bis zu 8% lag (Zheng et al., 2003), und deutlich niedriger als die von AdMH87, aber signifikant höher als die von herkömmlichen HC-Ad Vektoren. Die Mechanismen des intrazellulären Reintegrationszyklus sind allerdings noch nicht voll verstanden. Durch weitere Erkenntnisse in diesem Bereich kann möglicherweise die Effizienz des stabilen Gentransfers weiter erhöht werden. Auch ist, wie bereits erwähnt, ein Vergleich mit anderen Hybridvektorsystemen nur bedingt möglich.

Aus sicherheitstechnischer Sicht stellt ein auf HC-Ad Vektoren basierendes Ad-FV Vektorsystem gegenüber einem auf Ad Erst-/Zweitgenerationsvektoren basierendem MuLV System eine deutliche Verbesserung dar. Für Murine Leukämieviren sind im Gegensatz zu FV pathogene Wirkungen bekannt (Tschlis & Lazo, 1991; Rosenberg & Jolicoeur, 1997; Li et al., 2002). Wie bereits erwähnt, sind auch pathogene Wirkungen durch die MuLV Vektor-Integration beim Menschen bekannt (Hacein-Bey-Albina et al., 2003), ähnliche Effekte als Auswirkung der FV Integration konnten bisher jedoch nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu FV (Pietschmann et al.,

1999) können auch im MuLV System Pseudotypisierungen mit heterologen Hüllproteinen von anderen Viren (Palu et al., 2000), möglicherweise endogenen Retroviren, die in Zielzellen für die MuLV codierenden Adenoviren vorhanden sind, stattfinden. FV Systeme sind daher wegen ihrer offensichtlichen Apathogenität (Meiering & Linial, 2001) aus sicherheitsrelevanten Gründen sehr attraktive Vektorsysteme. Allerdings könnte die relativ starke Expression der FV Gag/Pol Proteine von Ad-FV Hybridvektoren zu toxischen Effekten führen, wenn auch bisher in vivo keine pathogenen Wirkungen von FV Infektionen beobachtet wurden.

Mit der Anwendung adenoviraler Erst-/Zweitgenerationsvektoren wurden in vivo verschiedene, teilweise lebensbedrohliche Nebenwirkungen bekannt. Der Fall eines Patienten, der im klinischen Versuch mit solchen adenoviralen Vektoren (E1/E4 deleteerte Ad 5 Vektoren) wegen Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz behandelt wurde, was zu seinem Tod durch multiples Organversagen/Toxisches Schocksyndrom führte, rückte die Gefahren der Gentherapie stark in das öffentliche Bewusstsein (Lehrmann, 1999; Stolberg, 1999). Die toxischen Wirkungen adenoviraler Vektoren (Rooke et al., 2000; Morral et al., 2002) sind nicht nur auf die möglicherweise trotz der E1 Deletion in Erstgenerationsvektoren stattfindende Expression viraler Proteine zurückzuführen, sondern auch teilweise auf durch Ad Capside bewirkte Immunreaktionen. Es hat sich herausgestellt, dass Ad Capside allein toxische Symptome hervorrufen können (Higginbotham et al., 2000). HC-Ad Vektoren, die den adenoviralen Vektor der Ad-FV Hybridvektoren darstellen, zeigen deutlich weniger Toxizität in vivo als Ad Erst-/Zweitgenerationsvektoren (O'Neal et al., 2000; Kochanek et al., 2001). Es ist bisher allerdings nicht möglich HC-Ad Vektoren ohne Helferviruskontamination herzustellen, wenn diese auch relativ gering ausfällt (Kochanek et al., 2001; Kreppel et al., 2002[b]). Da es sich bei den Helferviren jedoch prinzipiell um $\Delta E1A$ Erstgenerationsvektoren handelt, ist bei der Verwendung von geringfügig helferviruskontaminierten HC-Ad Vektoren gegenüber der Anwendung reiner Erstgenerationsvektoren mit deutlich weniger unerwünschten Nebeneffekten zu rechnen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass Adenovirus-Retrovirus Hybride neben anderen Hybridvektorsystemen einen vielversprechenden Ansatz darstellen, um der begrenzten Anwendbarkeit herkömmlicher Vektorsysteme zu begegnen. Die hier konstruierten Ad-FV Hybridvektoren konnten mit einem ausreichend hohen Titer bis zu 10^{10} iU/ml produziert werden und Zellen in vitro mit hoher Effizienz stabil transdu-

zieren. Im Hinblick auf eventuelle Anwendungen ergeben sich jedoch eine Reihe offener Fragen. So ist z.B. der Transfer des Ad-FV Systems in verschiedenen Zelltypen sowie in ruhenden und primären Zellen noch genauer zu untersuchen. Ebenfalls ist die mögliche Toxizität der Vektoren durch FV Gag/Pol Expression noch zu analysieren. Zur Verbesserung der Vektoren könnte die Spezifität des Systems durch Verwendung gewebsspezifischer Promotoren oder die Rezeptorspezifität der Adenoviren durch Veränderung der adenoviralen Fibernköpfe (Lam & Breakefield, 2000; Imperiale, 2000) erhöht werden.

Im Vergleich mit anderen Modellen zur Konstruktion von Ad-Retrovirus Hybriden, vor allem im Hinblick auf Effizienz und Sicherheit, stellen die hier vorgestellten Ad-FV Vektoren aussichtsreiche Kandidaten für die Weiterentwicklung eines Ad-Retrovirus Vektorsystems dar.

5. Literaturverzeichnis

- Achong, B.G., Mansell, P.W., Epstein, M.A.** (1971). A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *J. Pathol.* **103**, 18
- Ali, M., Taylor, G.P., Pitman, R.J., Parker, D., Rethwilm, A., Cheinsongpopov, R., Weber, J.N., Bieniasz, P.D., Bradley, J. and McClure, M.O.** (1996). No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 1473-1483
- Baldwin, D.N. and Linial, M.L.** (1998). The roles of pol and env in the assembly of human foamy virus. *J. Virol.* **72**, 3658-3665
- Baldwin, D.N. and Linial, M.L.** (1999). Proteolytic activity, the carboxy terminus of gag and the primer binding site are not required for pol incorporation into foamy virus particles. *J. Virol.* **73**, 6378-6393
- Baltimore, D.** (1970). RNA dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* **226**, 1211-1213
- Barre-Sinoussi, F., Cherman, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome. *Science* **220**, 868-871
- 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
- Bieniasz, P.D., Rethwilm, A., Pitman, R., Daniel, M.D., Chrytie, I. and McClure, M.O.** (1995). A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from gorilla. *Virology* **207**, 217-228
- Birnboim, H.C. and Doley, J.** (1970). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513
- Bodem, J., Löchelt, M., Yang, P. and Flügel, R.M.** (1997). Regulation of gene expression by human foamy virus and potentials of foamy virus vectors. *Stem Cells* **15**, 141-147
- Boeke, J.D. and Stoye, J.P.** (1997). Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: *Retroviruses*, Coffin et al., (Eds), Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1st edition, 343-437
- Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D. and Rethwilm, A.** (1998). Cells expressing the human foamy virus bet protein are resistant to productive superinfection. *Virology* **250**, 194-204
- Boneva, R.S., Switzer, W.M., Spira, T., Shanmugan, V., Bhullar, J.E., Cummins, J., Hussain, W., Heneine, W., Folks, T.M. and Chapman, G.A.** (2002). Human infection with simian foamy virus: Preliminary results from a long-term follow-up study. *Fourth International Conference on Foamy Viruses, Abstract Book*, 10
- Borrow, P. and Oldstone, M.B.** (1994). Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* **198**, 1-9
- Breiner, K.M. and Schaller, H.** (2000). Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection. *J. Virol.* **74**, 2203-2209
- Brooks, J.I., Rud, E.W., Pilon, R.G., Smith, J.M., Switzer, W.M. and Sandstrom, P.A.** (2002). Cross-species retroviral transmission from maquaques to human beings. *Lancet* **360**, 387-388
- Brown, P.O.** (1997). Integration. In *Retroviruses*, Coffin et al., (Eds), Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1st edition, 161-205

- Callahan, M.E., Switzer, W.M., Matthews, A.L., Roberts, B.D., Heneine, W., Folks, T.M. and Sandstrom, P.A.** (1999). Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact orf-2 accessory reading frame. *J. Virol.* **73**, 9316-9324
- Caplen, J.N., Higginbotham, J.N., Scheel, J.R., Vahanian, N., Yoshida, Y., Hamada, H., Blaese, R.M. and Ramsey, W.J.** (1999). Adenoviral-retroviral chimeric viruses as in vivo transducing agents. *Gene Ther.* **6**, 454-459
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L and Fischer, A.** (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672
- Check, E.** (2002). Regulators split on gene therapy as patient shows sign of cancer. *Nature* **419**, 445-446
- Chermann, J.C.** (2001). A brief reflection on the development of human retrovirology: The past, the present and the future. *J. Hum. Virol.* **4**, 289-295
- Clague, M.J., Urbe, S., Aniento, F. and Gruenberg, J.** (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J. Biol. Chem.* **269**, 21-24
- Cole, C.N.** (1996). Polyomavirinae: The viruses and their replication. in *Fundamental Virology 3rd edition*, 917-945. Lipcott-Raven Press, Philadelphia.
- Cullen, B.R.** (1991). Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *J. Virol.* **65**, 1053-1056
- Drose, S. and Altendorf, K.** (1997). Bafilomycins and Concanamycins as Inhibitors of V-ATPase and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**, 1-8
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P.** (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* **7**, 379-387
- Einfeld, D. and Hunter, E.** (1988). Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8688-8692
- Emerman, M. and Malim, H.** (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* **280**, 1880-1884
- Enssle, J., Jordan, I., Maurer, B. and Rethwilm, A.** (1996). Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the gag protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4137-4141
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Maurer, 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 lifecycle. *J. Virol.* **71**, 7312-7317
- Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Maurer, B., Schweizer, M., Neuman-Haefelin, D. and Rethwilm, A.** (1999). An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J. Gen. Virol.* **80**, 1445-1452
- Erlwein, O. and Rethwilm, A.** (1993). Bel-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology* **196**, 256-268
- Feng, M., Jackson, W.H. Jr, Goldman, C.K., Rancourt, C., Wang, M., Dusing, S.K., Siegal, G. and Curiel, D.T.** (1997). Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat. Biotechnol.* **9**, 866-870
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Müller, J.G. and Rethwilm, A.** (1998). Foamy virus particle formation. *J. Virol.* **72**, 1610-1615
- Giron, M.L., de The, H. and Saib, A.** (1998). An evolutionary conserved splice generates a secreted env-bet fusion protein during foamy virus infection. *J. Virol.* **72**, 4906-4910

- Glomb-Reinmund, S. and Kielian, M.** (1998). The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of semliki forest virus and sindbis virus. *Virology* **248**, 372-381
- Goepfert, P.A., Wang, G. and Mulligan, M.J.** (1995). Identification of an ER retrieval signal in a retroviral glycoprotein. *Cell* **82**, 543-544
- Goepfert, P.A., Shaw, K., Ritter, 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
- Goncalves, M.A., Pau, M.G., de Vries, A.A. and Valerio, D.** (2001). Generation of a high-capacity hybrid vector: Packaging of recombinant adenoassociated virus replicative intermediates in adenovirus capsids overcomes the limited cloning capacity of adenoassociated virus vectors. *Virology* **288**, 236-246
- Gossen, M. and Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547-5551
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H.** (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769
- Green, N., Shinnick, T. M., Witte, O., Ponticelli, A., Sutcliffe, J. G. and Lerner, R. A.** (1981). Sequence-specific antibodies show that maturation of molony leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6023-6027
- Gruenert, D.C., Novelli, D., Dallapiccola, B. and Colosimo, A.** (2002). Genome medicine: Gene therapy for the millenium, 30 september-3 october 2001, Rome, Italy. *Gene Ther.* **9**, 653-657
- Guinea, R. and Carrasco, L.** (1995). Requirement for vacuolar proton ATPase activity during entry of influenza virus into cells. *J. Virol.* **69**, 2306-2312
- Hacein-Bey-Albina, S., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M.** (2002). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Int. J. Haematol.* **76**, 295-298
- Hacein-Bey-Albina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo M. and Fischer, A.** (2003). A serious event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255-256
- Hahn, H., Baunach, G., Bräutigam, S., Mergia, A., Neumann-Haefelin, D., Daniel, M.D., McClure, M.O. and Rethwilm, A.** (1994). Reactivity of primate sera to foamy virus gag and bet proteins. *J. Gen. Virol.* **75**, 2635-2644
- Harui, A., Suzuki, S., Kochanek, S. and Mitani, K.** (1999). Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J. Virol.* **73**, 6141-6146
- He, F., Blair, W.S., Fukushima, J. and Cullen, B.** (1996). The human foamy virus bel-1 transcription factor is a sequence specific DNA binding protein. *J. Virol.* **70**, 3902-3908
- Heinkelein, M., Schmidt, M., Fischer, N., Moebes, A., Lindemann, D., Enssle, J. 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
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenroeder, O. and Rethwilm, A.** (2000). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *EMBO J.* **19**, 3436-3455

Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D. and Rethwilm, A. (2002[a]). Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs. *J. Virol.* **76**, 3744-3784

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

Helenius, A., Marsh, M. and White, J. (1982). Inhibition of semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. *J. Gen. Virol.* **58**, 47-61

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

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

Hernandez, R., Luo, T. and Brown, D.T. (2001). Exposure to low pH is not required for penetration of mosquito cells by sindbis virus. *J. Virol.* **75**, 2010-2013

Higginbotham, J.N., Seth, P., Blaese, R.M. and Ramsey, W.J. (2002). The release of inflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells in vitro following exposure to adenovirus variants and capsid. *Hum. Gene Ther.* **13**, 2495-2507

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

Horwitz, M.S. (2001). Adenoviruses. in: Knipe, D.M and Howley, P.M (Eds.) *Fields Virology*, Lippcott-Raven Philadelphia. **4th edition**, 2301-2326

Hunter, E. (1997). Viral entry and receptors. In *Retroviruses*, Coffin et al., (Eds), *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, **1st edition**, 71-120

Imperiale, M.J. (2000). Molecular biology of adenovirus gene therapy vectors. in: *Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy*, **1st edition**, Eaton Publishing, 119-128

Imrich, H., Heinkelein, M., Herchenröder, O. and Rethwilm, A. (2000). Primate foamy virus pol proteins are imported into the nucleus. *J. Gen. Virol.* **81**, 2941-2947

Irurzun A., Nieva J.L., and Carrasco L. (1997). Entry of Semliki forest virus into cells: effects of concanamycin A and nigericin on viral membrane fusion and infection. *Virology* **227**, 488-492

Jarmy, G., Picard-Maureau, M., Heinkelein, M., Tobaly-Tapiero, J., Saib, A., Rethwilm, A. and Lindemann, D. (2003). Pseudotyping of Murine Leukemia Virus and Human Immunodeficiency Virus type 1 particles by Foamy Virus envelope proteins is determined primary by glycoprotein leader peptides. *Manuskript in Vorbereitung.*

Johnson, R.H., Oginnusi, A.A. and Ladds, P.W. (1983). Isolation and serology of bovine spumavirus. *Aust. Vet.* **60**, 147

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

Katen, L., Januszkeski, J.J., Anderson, W.F., Hasenkrug, K.J. and Evans, L.H. (2001). Infectious entry by amphotropic as well as ecotropic murine leukemia viruses occurs through an endocytotic pathway. *J. Virol.* **75**, 5018-5026

- Klasse, P.J., Bron, R. and Marsh, M.** (1998). Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells. *Adv. Drug. Del. Rev.* **34**, 65-91
- Konvalinka, J., Löchelt, M., Zentgraf, H., Flügel, R.M. and Kräusslich, 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
- Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H., Chan, S. and Caskey, C.T.** (1996). A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full length dystrophin and β -Galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5731-5736
- Kochanek, S., Schiedner, G. and Volpers, C.** (2001). High-capacity „gutless“ adenoviral vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**, 454-463
- Kreppel, F., Luther, T.T., Semkova, I., Schraermeyer, U. and Kochanek, S.** (2002[a]). Long-term transgene expression in the RPE after gene transfer with a high-capacity adenoviral vector. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1965-1970
- Kreppel, F., Biermann, V., Kochanek, S. and Schiedner, G.** (2002[b]). A DNA-based method to assay total and infectious particle contents and helper virus contamination in high-capacity adenoviral vector preparations. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1151-1156
- Lam, P.Y. and Breakefield, X.O.** (2000). Hybrid vector designs to control the delivery, fate and expression of transgenes. *J. Gene. Med.* **2**, 395-408
- Lamb, R. A.** (1993). Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes. *Virology* **197**, 1-11
- Lazo, P.A. and Yunta, M.** (2000). Gene therapy using viral vectors: Strategy and design issues. in: *Viral vectors: Basic science and gene therapy*, Eaton Publishing, 597-607
- Lecellier, C.H. and Saib, A.** (2000). Foamy viruses: Between retroviruses and pararetroviruses. *Virology.* **271**, 1-8
- Lecellier, C.H., Vermeulen, W., Bachelerie, F., Giro, M.L. and Saib, A.** (2002[a]). Intra- and intercellular trafficking of the foamy virus auxiliary bet protein. *J. Virol.* **76**, 3388-3394
- Lecellier, C.H., Neves, M., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J. and Saib, A.** (2002[b]). Further characterization of equine foamy virus reveals unusual features among the foamy viruses. *J. Virol.* **76**, 7220-7227
- Lehrman, S.** (1999). Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* **401**, 517-518
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K., Heinkelein, M., Schmid, M., Lindemann, D., von Kalle, C., Rethwilm, A., William, D. and Hanenberg, H.** (2003). Comparison of three retroviral vector systems for transduction of NOD/SCID repopulating CD34+ cord blood cells. *Submitted for publication.*
- Li, Z., Düllmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Kühlcke, K., Eckert, H.G., Fehse, B. and Baum, C.** (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**, 497
- Lindemann, D., Bock, M., Schweizer, M. and Rethwilm, A.** (1997). Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J. Virol.* **71**, 4815-4820
- 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
- Lindemann, D., Heinkelein, M. and Rethwilm, A.** (2000). Aspects of foamy virus vectors: Host range and replication-competent vectors. In: *Viral Vectors: Basic science and gene therapy*, Eaton Publishing, 515-522
- 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 budding. *J. Virol.* **75**, 5762-5771

- Lindemann, D. and Goepfert, P.A.** (2003). The foamy virus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, im Druck.
- Linial, M.L.** (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J. Virol.* **73**, 1447-1455
- Linial, M.L.** (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol.* **8**, 284-289
- 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.* **21**, 4226-4230
- Löchelt, M., Flügel, R.M. and Aboud, M.** (1994). The human foamy virus internal promoter directs expression of the functional bel-1 transactivator and bet protein early after infection. *J. Virol.* **68**, 638-645
- Löchelt, M., Yu, S.F. and Flügel, R.M.** (1995). The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity. *Virology* **206**, 601-610
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K.** (1982). Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J. Mol. Biol.* **15**, 609-631
- Marsh, M., Wellsted, J., Kern, H., Harms E. and Helenius, A.** (1982). Monensin inhibits Semliki Forest virus penetration into culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5297-5301.
- Marsh, M. and Pelchen-Matthews, A.** (2000). Endocytosis in viral replication. *Traffic* **1**, 525-532
- McClure, M.O., Sommerfelt, M.A., Marsh, M. and Weiss, R.A.** (1990). The pH independence of mammalian retrovirus infection. *J. Gen. Virol.* **71**, 767-773
- Meiering, C.D. and Linial, M.L.** (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 165-176
- Meiering, C.D., Rubio, C., May, C. and Linial, M.L.** (2001). Cell-type-specific regulation of the two foamy virus promoters. *J. Virol.* **75**, 6547-6557
- Meiering, C.D. and Linial, M.** (2002). Reactivation of a complex retrovirus is controlled by a molecular switch and is inhibited by a viral protein. *Proc. Acad. Sci. USA* **99**, 15130-15135
- Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A.** (1986). Acidification of the endocytotic and exocytotic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 663-700
- Mergia, A. and Wu, M.** (1998). Characterization of provirus clones of simian foamy virus type 1. *J. Virol.* **72**, 817-822
- 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
- Morozov, V.A., Copeland, T.D., Nagashima, K., Gonda, M.A. and Oroszlan, S.** (1997). Protein composition and morphology of human foamy virus intracellular cores and extracellular particles. *Virology* **228**, 307-317
- Morrall, N., O'Neal, W.K., Rice, K., Leland, M.M., Piedra, P.A., Aguilar-Córdova, E., Dee Carey, K., Beaudet, A.L. and Langston, C.** (2002). Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum. Gene Ther.* **13**, 143-154
- Morsy, M.A., Gu, M.C., Motzel, S., Zhao, J., Lin, J., Su, Q., Allen, H., Franklin, L., Parks, R.J., Graham, F.L., Kochanek, S., Bett, A.J. and Caskey, C.T.** (1998). An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7866-7871

- Mothes, W., Boerger, A.L., Narayan, S., Cunningham, J.M. and Young, J.A.** (2000). Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. *Cell* **103**, 679-689
- Muranyi, W. and Flügel, R.W.** (1991). Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J. Virol.* **65**, 727-735
- Murphy, S.J., Chong, H., Bell, S., Diaz, R.M. and Vile, R.G.** (2002). Novel integrating adenoviral/retroviral hybrid vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **13**, 745-760
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J.** (1982). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858-3863
- Nassal, M. and Schaller, H.** (1993). Hepatitis virus B replication. *Trends Microbiol.* **1**, 221-228
- Nestler, U., Heinkelein, M., Lucke, M., Meixensberger, J., Scheurlen, W., Kretschmer, A. and Rethwilm, A.** (1997). Foamy virus vectors for suicide gene therapy. *Gene Therapy* **4**, 1270-1277
- Netzer, K.O., Rethwilm, A., Maurer, B. and ter Meulen, V.** (1990). Identification of the major immunogenic structural proteins of human foamy virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 1237-1241
- Nussbaum, O. and Loyter, A.** (1987). Quantitative determination of virus-membrane fusion events. *FEBS Letters* **221**, 61-67
- Nussbaum, O., Roop, A. and Andersen, W.F.** (1993). Sequences determining the pH dependence of viral entry are distinct from the host-range determining region of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J. Virol.* **67**, 7402-7405
- Okada, Y., Saito, S., Fujisawa, K., Fujiwara, T. and Tanaka, N.** (2000). Adenovirus-mediated viral IL-10 gene transfer prolongs survival of xenogeneic spheroidal aggregate-cultured hepatocytes. *Transpl. Int.* **13**, 485-493
- O'Neal, W.K., Zhou, H., Morral, N., Langston, C., Parks, R.J., Graham, F.L., Kochanek, S. and Beaudet, A.L.** (2000). Toxicity associated with repeated administration of first-generation adenovirus vectors does not occur with a helper-dependent vector. *Mol. Med.* **6**, 179-195
- Palokangas, H., Metsikkö, K. and Väänänen, K.** (1994). Active vacuolar H⁺-ATPase is required for both endocytotic and exocytotic processes during viral infection. *J. Bio. Chem.* **269**, 17577-17588
- Palu, G., Parolin, C., Takeuchi, Y. and Pizzato, M.** (2000). Progress with retroviral gene vectors. *Rev. Med. Virol.* **3**, 185-202
- Parks, G.P. and Todaro, G.J.** (1971). Biological properties of syncytium-forming („foamy“) viruses. *Virology* **47**, 673-638
- Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A. and Graham, F.L.** (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13565-13570
- Pelkmans, L. and Helenius, A.** (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic* **3**, 311-320
- Perez, L. and Carrasco, L.** (1994). Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J. Gen. Virol.* **75**, 2595-2602
- Pfrepper, K.I., Rackwitz, H.R., Schnölzer, M., Heid, H., Löchelt, M. and Flügel, R.M.** (1998). Molecular characterization of proteolytic processing of the pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J. Virol.* **72**, 7648-7652
- Pfrepper, K.I., Löchelt, M., Rackwitz, H.R., Schnölzer, M., Heid, H. and Flügel, R.M.** (1999). Molecular characterization of proteolytic processing of the gag proteins of human foamy virus. *J. Virol.* **73**, 7907-7911

- 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 evolutionary conserved positively charged amino acid in the putative membrane spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J. Virol.* **74**, 4474-4482
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C.** (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7415-7419
- Pope, B. and Kent, H.M.** (1996). High efficiency 5 min transformation of Escherichia Coli. *Nucleic Acids Res.* **24**,536-537
- Pressman, B.C.** (1976). Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 501-530
- Ragheb, J.A. and Anderson, W.F.** (1994). pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: implications for the role of the R-peptide and p12ETM in viral entry. *J. Virol.* **68**, 3220-3231
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. and Gardner, M.B.** (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33**, 1027-1033.
- Redmond, S., Peters, G. and Dickson, C.** (1984). Mouse mammary tumor virus can mediate cell fusion at reduced pH. *Virology* **133**, 393-402
- Regenmortel, M.H.V. van, Fauquet, C.M. and Bishop, D.H.L. (Eds.)** (2000). Virus taxonomy-classification and nomenclature of viruses. *Academic Press 1st Edition*
- Rein, A., Mirro, J., Haynes, J. G., Ernst, S. M. and Nagashima, K.** (1994). Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein. *J. Virol.* **68**, 1773-1781
- Renshaw, R.W., Gonda, M.A. and Casey, J.W.** (1991). Structure and transcriptional status of bovine syncytial virus in cytopathic infections. *Gene* **105**, 179-184
- Rethwilm, A.** (1995). Regulation of foamy virus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **193**, 1-24
- Rethwilm, A.** (1996). Unexpected replication pathways of foamy viruses. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **13**, 248-253
- Reynolds, P.N., Feng, M. and Curiel, D.T.** (1999). Chimeric viral vectors- the best of both worlds? *Mol. Med. Today* **Jan**, 25-31
- Rooke, R., Grave, I., Christ, M., Lusky, M., Michou, A.I. and Mehtali, M.** (2000). Adenovirus mediated gene transfer: In vivo persistence of transduced cells and control of transgene expression. in: *Viral vectors: Basic science and gene therapy*, Eaton Publishing, **1st edition**, 153-170
- Rosenberg, N. and Jolicoeur, P.** (1997). Retroviral pathogenesis. In *Retroviruses*, Coffin et al., (Eds), *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, **1st edition**, 475-586
- Russell, D.W. and Miller, A.D.** (1996). Foamy virus vectors. *J. Virol.* **70**, 217-222
- Russell, D.W. and Marsh, M.** (2001). Endocytosis in pathogen entry and replication. In: *Endocytosis, Frontiers in Molecular Biology* **36**, 247-281 (Oxford University Press)
- Russell, W.C.** (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**, 2573-2604

- Rusell R.A., Critchley, R., Vassaux, G. and McClure, M.O.** (2002). Human foamy virus integrase fails to catalyze the integration of a circular DNA molecule containing an LTR junction sequence. *Gene Ther.* **9**, 1326-1332
- 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
- Sato, M., Suzuki, S., Kubo, S. and Mitani, K.** (2002). Replication and packaging of helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther.* **9**, 472-476
- Schagger, H. and Jagow, G.** (1987). Tricine –sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDA. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379
- Schiedner, G., Hertel, S., Johnston, M., Biermann, V., Dries, V. and Kochanek, S.** (2002). Variables affecting in vivo performance of high-capacity adenovirus vectors. *J. Virol.* **76**, 1600-1609
- Schliephake, A.W. and Rethwilm, A.** (1994). Nuclear localization of foamy virus gag precursor proteins. *J. Virol.* **68**, 4946-4954
- Schmidt, M. and Rethwilm, A.** (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210**, 167-178
- Schweizer, M., Turek, R., Hahn, H., Schliephake, A., Netzer, K.O., Eder, G., Reinhardt, M., Rethwilm, A. and Neumann-Haefelin, D.** (1995). Markers of foamy virus infections in monkeys, apes and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 161-170
- Shaw, K.L., Lindemann, D., Mulligan, M.J. and Goepfert, P.A.** (2003). The retroviral envelope glycoprotein of foamy virus is sufficient for particle budding and release. *J. Virol* (im Druck)
- Shayakhmetov, D.M., Carlson, C.A., Stecher, H., Li, Q., Stamatoyannopoulos, G. and Lieber, A.** (2002). A high-capacity, capsid-modified hybrid adenovirus-Adeno-associated virus vector for stable transduction of human hematopoietic cells. *J. Virol.* **76**, 1135-1143
- Shenk, T.E.** (2001). Adenoviridae: The viruses and their replication. In Knipe, D.M and Howley, P.M. (Eds.) in: *Fields Virology*, Lippcott-Raven Philadelphia. **4th ed.**, 2265-2300
- Sieczkarski, S.B. and Whittaker, G.R.** (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* **83**, 1535-1545
- Skehel, J.J and Wiley, D.C.** (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza haemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 531-569
- Soifer, H., Higo, C., Kazazian, H.H., Moran, J.V., Mitani, K. and Kasahara, N.** (2001). Stable integration of transgenes delivered by a retrotransposon-adenovirus hybrid vector. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1417-1428
- Soifer, H., Higo, C., Logg, C.R., Ja-Lu Jih, L., Shichinoe, T., Harboe-Schmidt, E., Mitani, K. and Kasahara, N.** (2002). A novel, helper-dependent adenovirus-retrovirus hybrid vector: Stable transduction by a two-stage mechanism. *Mol. Ther.* **5**, 599-608
- 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
- Stolberg, S.G.** (1999). The biotech death of Jesse Gelsinger. *New York Times Sunday Magazine*, 28. Nov.

- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemain, M.C., Lecellier, C.H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M.L., de The, H. and Saib, A.** (2000). Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J. Virol.* **74**, 4064-4073
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Giron, M.L., Neves, M., Koken, M., Saib, A. and de The H.** (2001). Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N terminus of Gag. *J. Virol.* **75**, 4367-4375
- Temin, H.M. and Mizutani, S.** (1970). RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous-Sarcoma Virus. *Nature* **226**, 1211-1213
- Trobridge, G., Vassilopoulos, G., Josephson, N. and Russell, D.W.** (2002[a]). Gene transfer with foamy virus vectors. *Meth. Enzymol.* **386**, 628-648
- Trobridge, G., Josephson, N., Vassilopoulos, G., Mac, J. and Russell, D.W.** (2002[b]). Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol. Ther.* **6**, 321-328
- Tsichlis, P.N. and Lazo, P.A.** (1991). Virus-host interactions and the pathogenesis of murine and human oncogenic retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **171**, 95-171
- Vogt, P.K.** (1997[a]). Historical introduction to the general properties of retroviruses. In *Retroviruses*, Coffin et al., (Eds), *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, **1st edition**, 1-26
- Vogt, P.K.** (1997[b]). Retroviral virions and genomes. In *Retroviruses*, Coffin et al., (Eds), *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, **1st edition**, 27-70
- Wahlberg, J.M. and Garoff, H.** (1992). Membrane fusion process of semliki forest virus I: Low pH induced rearrangement in spike protein quarternary structure precedes virus penetration into cells. *J. Cell Biol.* **116**, 339-348
- Wang, G. and Mulligan, M.J.** (1999). Comparative sequence analysis and predictions for the env glycoproteins of foamy viruses. *J. Gen. Virol.* **80**, 245-254
- Weiss, R.A.** (1996). Foamy viruses bubble on. *Nature* **380**, 201
- Weiss, R.A.** (2002). HIV receptors and cellular tropism. *Life* **53**, 201-205
- White, J.K., Matlin, A. and Helenius, A.** (1981). Cell fusion by semliki forest, influenza and vesicular stomatitis virus. *J. Cell Biol.* **89**, 674-679
- White, J. M.** (1992). Membrane fusion. *Science* **258**, 917-924
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S.D., Flügel, R.M. and Löchelt, 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., Flügel, R.M. and Löchelt, M.** (2001). Specific interaction of a novel foamy virus env leader protein with the n-terminal gag domain. *J. Virol.* **75**, 7995-8007
- Winkler, L., Bodem, J., Haas, L., Zemba, M., Delius, H., Flügel, R.M. and Löchelt, M.** (1997). Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins show distinct features different from those of primate spumavirus. *J. Virol.* **71**, 6727-6741
- Xu, Z.L., Mitzuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T. and Hayakawa, T.** (2001). Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* **272**, 149-156
- Yang, C. and Compans, R. W.** (1997). Analysis of the murine leukemia virus R peptide: Delineation of the molecular determinants which are important for its fusion inhibition activity. *J. Virol.* **71**, 8490-8496

- Yu, S.F. and Linial, M.L.** (1993). Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay. *J. Virol.* **67**, 6618-6624
- Yu, S.F., Baldwin, D.N., Gwynn, S.R., Yendapalli, S. and Linial, M.L.** (1996[a]). Human foamy virus replication: A pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* **271**, 1579-1581
- Yu, S.F., Edelmann, K., Strong, R.K., Moebes, A., Rethwilm, A. and Linial, M.L.** (1996[b]). The carboxyl terminus of the human foamy virus gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J. Virol.* **70**, 8255-8262
- Yu, S.F., Sullivan, M.D. and Linial, M.L.** (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J. Virol.* **73**, 1565-1572
- Zemba, T., Wilk, T., Rutten, T., Wagner, A., Flügel, R.M and Löchelt, M.** (1998). The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus is required for efficient virus infectivity. *Virology* **247**, 7-13
- Zheng, C., Baum, B.J., Iadarola, M.J. and O'Connell, B.C.** (2000). Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector. *Nat. Biotechnol.* **18**, 176-180
- Zheng C. and Baum, B.J.** (2002). Long-term expression after infection by the hybrid vector AdLTR-luc is from integrated transgene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 34-40
- Zheng, C., Wang, J. and Baum, B.** (2003). Integration efficiency of a hybrid adenoviral vector. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **300**, 115-120

6. Anhang

6.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zum einen die Penetration von Foamyviren (FV) unter besonderer Berücksichtigung des FV Hüllglykoproteins (Env) untersucht, zum anderen wurden Adenovirus-Foamyvirus (Ad-FV) Hybridvektoren zur Kombination der Vorteile beider Vektorsysteme konstruiert und analysiert. Das Ziel war die Herstellung von Ad-FV Vektoren mit hohen Titern, die stabil in das Genom des Wirts integrieren.

Über die Penetration von FV ist bisher wenig bekannt. Umhüllte Viren können entweder durch direkte Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran oder durch rezeptorvermittelte Endocytose, oft mit einem pH-abhängigen Fusions Schritt der viralen Membran mit der Membran intrazellulärer Kompartimente, in Zielzellen gelangen. In dieser Studie wurde die Abhängigkeit der FV Env vermittelten Infektion verschiedener FV Spezies von lysosomotropen Agenzien mit MuLV oder Prototyp FV (PFV) Pseudotypen analysiert. Ähnlich wie bei Vesikuläres Stomatitis Virus Glykoprotein (VSV-G) Pseudotypen wurde die FV Env vermittelte Infektion von fast allen Agenzien, die den endosomalen pH anheben, inhibiert. Allerdings hatte Chloroquin keine inhibitorische Wirkung auf die FV Env vermittelte Infektion im Gegensatz zu der VSV-G katalysierten, was auf einen unterschiedlichen Penetrationsmechanismus schließen lässt. Eine Analyse der pH-Abhängigkeit der FV Env Fusionsaktivität in einem Zell-Fusionsassay zeigte eine Induktion der Fusionsaktivität mit einer maximalen Stärke bei pH 5,5. Nur bei PFV Env wurde eine basale Fusionsaktivität bei neutralem pH detektiert. Die relativ schnelle Induktion der Fusionsaktivität in saurem Milieu weist auf eine Konformationsänderung des Hüllglykoproteins zur Transformation in einen fusionsaktiven Status hin. Aufgrund dieser Daten kann man von einem endocytotischen, pH-abhängigen Penetrationsmechanismus von FV ausgehen.

Zur Kombination der Vorteile von Adenoviren und FV wurde ein Ad-FV Hybridvektorsystem konstruiert um ein effizientes Werkzeug zum stabilen Gentransfer zu schaffen. Das System besteht aus adenoviralen Hochkapazitäts- (HC-Ad) Vektoren auf Adenovirus 5 Basis, die eine selbst-inaktivierende PFV Vektor Kasette unter Kontrolle eines humanen Cytomegalovirus- (hCMV) Promotors oder des reversen Tet

Transaktivator Systems (Tet) enthalten. In alle Vektoren ist eine Verstärktes Grün Fluoreszierendes Protein (EGFP) Expressionskassette als Markergen integriert. Es wurden sowohl FV Vektoren, die nach der Primärinfektion über einen intrazellulären Transduktionsmechanismus stabil integrieren, als auch solche, die über einen Sekundärzyklus mit Hilfe extrazellulärer Partikel stabil transduzieren können, hergestellt. Die Ad-FV Vektoren konnten mit zu herkömmlichen HC-Ad Vektoren vergleichbaren Titern bis zu 10^{10} iU/ml produziert werden. In Ad-FV infizierten Zellen war die erwartete FV Proteinexpression und ihre Induzierbarkeit bei Ad-FVTet Vektoren nachweisbar. Mit diesen Vektorsystemen infizierte Zellen zeigten eine signifikant höhere persistierende Transgenexpression im Vergleich zu mit HC-Ad oder Kontroll-Ad-FV Vektoren ohne ein funktionales FV pol ORF infizierten Zellen. Eine Southern Blot Analyse von Ad-FVTet infizierten Einzelzellklonen mit persistierender EGFP Expression belegte eine stabile Integration der FV Vektor Kassette.

In dieser Arbeit konnten Ad-FV Vektoren mit hohem Titer hergestellt werden, die eine, auch im Vergleich mit bisher publizierten Ad-Retrovirus Systemen, stark erhöhte Effizienz des persistenten Transgentransfers durch stabile Integration zeigten.

6.2 Summary

In this study, both, the analysis of the penetration mechanism of Foamy Viruses (FV), focusing on the FV envelope glycoprotein (Env), and the construction and analysis of Adenovirus (Ad)-FV hybrid vectors for efficient prolonged transgene expression, was addressed.

Little is known about the uptake of foamy viruses, a subfamily of retroviruses, into target cells. In general enveloped viruses use two different entry strategies, an endocytotic entry pathway, mostly involving a pH-dependent fusion process, and a pH-independent fusion process at the cell membrane. In this study, we examined the pH dependence of FV entry by analyzing FV Env mediated infectivity of target cells in the presence of weak bases, vacuolar ATPase inhibitors and carboxylic ionophores using Murine Leukemia Virus (MuLV) or FV vector pseudotypes. Similiar to Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein G (VSV-G) mediated uptake, FV Env mediated entry was inhibited by most agents used. However, in contrast to VSV-G pseudotypes, chloroquine failed to reduce the infectivity of FV Env pseudotypes, implying that the pathway is different from that of VSV-G. Various glycoproteins from other FV species

showed a similar inhibition pattern as the prototype FV (PFV). Analysis of the pH-dependence of the FV mediated fusion process in a cell-to-cell fusion assay revealed an induction of syncytia formation by a short exposure to acidic pH, peaking around pH 5.5. The very short time period of exposure to low pH necessary for the induction of fusion activity implies a conformational change of FV Env at low pH to transform to a fusogenic state. Interestingly, of all FV Env species analyzed only the PFV Env had a significant fusion activity at a neutral pH. Taken together, these data suggest a pH-dependent endocytotic pathway of infection of target cells by FV.

In this work, an adenoviral/foamyviral (Ad-FV) hybrid vector system was developed to exploit the favourable features of the two parental viral species for efficient and stable gene transfer. The system consists of high capacity (HC-Ad) Adenovirus 5 vectors containing self-inactivating PFV vector cassettes under control of a human cytomegalovirus- (hCMV) promoter or the reverse Tet transactivator system (Tet). The PFV Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) transfer vectors encoded by this vector cassettes could either transduce target cells by an intracellular retrotransposition step or by an additional secondary cycle with extracellular particles. The Ad-FV vectors could be produced with titers up to 10^{10} iU/ml, comparable to conventional Ad vectors. We were able to demonstrate the predicted pattern of PFV protein expression in Ad-FV vector infected cells and the induction of PFV protein expression in Ad-FVTet infected cells. Long-term analysis of cells infected by the chimeric vectors showed a significantly higher amount of persistent transgene expressing cells when compared to cells infected by a control vector containing a non-functional FV pol ORF or by a conventional HC-Ad vector. Southern blot analysis of persistently transgene expressing cells indicated stable integration of the PFV vector genome in cells infected by Ad-FVTet vectors. In summary, our results demonstrate the production of high titer Ad-FV hybrid vectors mediating, even compared to other published Ad-Retrovirus systems, prolonged transgene expression by stable integration.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

α -	Anti	IN	Integrase
ψ	Verpackungssignal	IRES	„internal ribosomal entry site“
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	ITR	„inverted terminal repeat“
μ	Mikro	kD	Kilodalton
AAV	Adeno-assoziiertes Virus	l	Liter
Abb.	Abbildung	J/cm^2	Joule pro Quadratcentimeter
Ad	Adenovirus	LP	Leaderpeptid
APS	Ammoniumpersulfat	LTR	„long terminal repeat“
ATP	Adenosintriphosphat	M	Molar
BFV	Bovines Foamyvirus	MBP	Maltose-Bindendes-Protein
bp	Basenpaar	MCS	„multiple cloning site“
BSA	Rinderserum Albumin	MEA	amphotropes MuLV Env
bzw.	beziehungsweise	min	Minute
CA	Capsid	mM	millimolar
CIAP	„calf intestine alkaline phosphatase“	MOI	„multiplicity of infection“
CMV	Cytomegalovirus	mRNA	„messenger RNA“
DNA	Deoxyribonukleinsäure	MuLV	Murines Leukämievirus
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat	NC	Nucleocapsid
ddNTP	Dideoxyribonukleotidtriphosphat	NLS	Kernlokalisationssignal
E. Coli	Escherichia Coli	nM	nanomolar
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat	OD	optische Dichte
EFV	Equines Foamyvirus	ORF	Offenes Leseraster
EGFP	„Enhanced green fluorescent protein“	ori	Replikationsstartpunkt
EM	Elektronenmikroskop(ie)	PBS	„Phosphate Buffered Saline“
Env	Hüllprotein	pbs	Primerbindungsstelle
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PCR	Polymerasekettenreaktion
EXK	Expressionskassette	PFV	„Prototype Foamy Virus“
EZK	Einzelzellklon	Pol	Polymerase
FACS	„fluorescence activated cell sorter“	PMSF	Phenylmethansulfoxyfluorid
FCS	Fötale Kälberserum	PP	Protein Probenpuffer
FFV	Felines Foamyvirus	ppt	Polypurintrakt
Fig.	Figur	PR	Protease
FV	Foamyvirus (Foamyviren)	RNA	Ribonukleinsäure
Gag	Gruppenspezifisches Antigen	rpm	Umdrehungen pro Minute
h	Stunde	RT	Raumtemperatur
HC-Ad	adenoviraler Hochkapazitätsvektor	RT	Reverse Transkriptase
HRP	Meerrettich-Peroxidase	rtTa	reverser Tet Transaktivator
HSRV	humanes Spumaretrovirus	SDS	Natriumlaurylsulfat

sec	Sekunde	Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
SFFV	Spleen Focus Forming Virus	tRNA	Transfer-RNA
SU	Oberflächen-Untereinheit	U	Enzymeinheit/Partikeleinheit
T	Tausend	VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
TM	Transmembran-Untereinheit	wt	Wildtyp
TP	Terminales Protein	z.B.	zum Beispiel

6.4 Abbildungsverzeichnis

Fig. 1:	Aufbau eines einfachen Retrovirus	3
Fig. 2:	Genomische RNA und Provirus eines einfachen Retrovirus	4
Fig. 3:	Der retrovirale Replikationszyklus am Beispiel eines einfachen Retrovirus	6
Fig. 4:	EM Aufnahme von FV und LM Aufnahme eines CPE	8
Fig. 5:	Genom und Genexpression eines Foamyvirus (PFV)	11
Fig. 6:	Schematische Zeichnung des PFV Hüllproteins	14
Fig. 7:	Der foamyvirale Replikationszyklus am Beispiel von PFV	15
Fig. 8:	Eintrittswege von Viren in eukaryotische Zellen	18
Fig. 9:	Foamyvirales Zwei-Plasmid Vektor System	24
Fig. 10:	Aufbau eines Adenovirus	25
Fig. 11:	Adenovirales Genom und adenovirale Vektoren	28
Fig. 12:	Schematische Zeichnung von Hüllproteinexpressionskonstrukten	75
Fig. 13:	Expression von FV Env LP- oder SU-MBP Fusionsproteinen	76
Fig. 14:	Western Blot Analyse der Expression von FV Hüllproteinen	78
Fig. 15:	Infektion von HT1080 Zellen mit MuLV Pseudotypen in Gegenwart lysosomotroper Agenzien	80
Fig. 16:	Infektion von HT1080 Zellen mit MuLV und PFV Pseudotypen in Gegenwart lysosomotroper Agenzien	82
Fig. 17:	Analyse der Infektions/Replikationsaktivität von HSRV-2 wt Virus in Gegenwart von lysosomotropen Agenzien	83
Fig. 18:	Infektion von HT1080 Zellen mit MuLV Pseudotypen in Gegenwart lysosomotroper Agenzien	86
Fig. 19:	Analyse des Einflusses von Nigericin auf die PFV Env und SFV-1 Env katalysierte Infektion von HT1080 Zellen	87
Fig. 20:	Analyse der Stabilität von pseudotypisierten MuLV Partikeln bei 37°C in Gegenwart von Ammoniumchlorid und Concanamycin A	90
Fig. 21:	Analyse der pH-abhängigen Fusionsaktivität von FV Hüllproteinen	92
Fig. 22:	Fusionsinduktion bei FV Env exprimierenden Zellen in saurem Milieu	94
Fig. 23:	Zeitkurs der Induktion der Fusionsaktivität von FV Hüllproteinen	95
Fig. 24:	Schematische Darstellung der verwendeten Vektoren	98

Fig. 25:	Schematische Darstellung der Verpackung der Ad-FV Hybridvektoren	99
Fig. 26:	Transduktionsmechanismus der Ad-FV Hybridvektoren	101
Fig. 27:	Schematische Darstellung der Regionen des viralen Genoms, die mit den jeweiligen Sonden in der Southern Blot Analyse hybridisieren	102
Fig. 28:	Southern Blot Analyse der viralen Genome	102
Fig. 29:	Western Blot Analyse der Proteinexpression von mit Ad-FV Hybridvektoren infizierten Zellen	104
Fig. 30:	Infektionsanalyse	105
Fig. 31:	Schematische Darstellung der FV Vektor Kassetten der Ad-FV Hybridvektoren AdMH88Tet, AdMH89Tet und AdMH87Tet	107
Fig. 32:	Funktionalitätstest der Tet regulierten Ad-FV Hybridvektoren AdMH88Tet, AdMH89Tet und AdMH87Tet	108
Fig. 33:	Western Blot Analyse von Ad-FVTet Vektoren infizierten A549 Zellen	110
Fig. 34:	Analyse der Transduktionseffizienz von Tet regulierten Ad-FV Hybridvektoren	112
Fig. 35:	Überstandstransfer von Ad-FV Hybridvektor infizierten Zellen an Tag 7 nach Infektion	113
Fig. 36:	Determination der notwendigen Dauer der Doxycyclingabe, um einen optimalen Gentransfer zu erreichen	114
Fig. 37:	Western Blot Analyse der Gag und Pol Expression von mit Ad-FV Hybridvektoren infizierten HuH7 und HT1080 Zellen	116
Fig. 38:	Southern Blot Analyse von Einzelzellklonen AdMH88Tet und AdMH87Tet infizierter A549 Zellen mit FV gag/pol Sonde	118
Fig. 39:	Southern Blot Analyse von Einzelzellklonen AdMH88Tet und AdMH87Tet infizierter A549 Zellen mit Ad ITR Sonde	119

6.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Taxonomie und Klassifizierung der Retroviren	2
Tab. 2:	Übersicht über Foamyvirus Isolate	9
Tab. 3:	Penetration von Viren, die vermutlich endocytotische Mechanismen nutzen	19
Tab. 4:	Vor- und Nachteile der am meisten verbreiteten viralen Vektoren für gentherapeutische Zwecke	22
Tab. 5:	Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten lysosomotropen Agenzien	79

6.6 Erklärungen

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „ Molekulare Analyse der Penetration von Foamyviren und Konstruktion und Charakterisierung von Foamyvirus-Adenovirus Hybridvektoren“ 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,

Marcus Picard Maureau

6.7 Lebenslauf

Persönliche Daten: **Marcus Picard Maureau**

Geboren am: 13.02.1974

Geburtsort: Tübingen

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1979-1984 Grund- und Vorschule Köppern

1984 Grundschule Kiedrich

1984-1993 Rheingaugymnasium Geisenheim

06/1993 Abitur

Wehrdienst:

07/1993-06/1994 5./Flugabwehrraketengruppe 42

Studium:

10/1994-01/2000 Biologie an der Universität Würzburg

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Virologie und Immunbiologie, Zell- und
Entwicklungsbiologie

11/1997-05/1998 Auslandssemester an der University of Notre Dame, USA

Diplomarbeit: „Analyse der Fusion von Foamyviren mit Zielzellen“

Diplombetreuer: Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies

Diplom: 03/2000

Promotion:

02/2000-02/2003 Am Institut für Virologie der Universität Würzburg
Arbeitsgruppe Rethwilm und Lindemann

Thema: „Molekulare Analyse der Penetration von Foamyviren und Konstruktion und Charakterisierung von Adenovirus-Foamyvirus Hybridvektoren“

Doktorvater: Prof. Dr. Axel Rethwilm

02/2000-11/2002 Promotionsstipendium des Europäischen Graduiertenkollegs „Gene regulation in and by microbial pathogenes“, Universität Würzburg

Würzburg, den

Marcus Picard-Maureau

6.8 Publikationsliste

Picard-Maureau, M., Kreppel, F., Lindemann, D., Juretzek, T., Herchenröder, O., Rethwilm, A., Kochanek, S. and Heinkelein, M. (2003). Foamy virus-adenovirus hybrid vectors. *Manuskript in Vorbereitung*

Jarmy, G., Picard-Maureau, M., Heinkelein, M., Tobaly-Tapiero, J., Saib, A., Rethwilm, A. and Lindemann, D. (2003). Pseudotyping of murine leukemia virus and human immunodeficiency virus type 1 particles by foamy virus envelope proteins is determined primarily by glycoprotein leader peptides. *Manuskript in Vorbereitung*

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**, *im Druck*

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 budding. *J. Virol.* **75**, 5762-5771