

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. A. Rethwilm

**Die Rolle der purinreichen Sequenzen  
für die Replikation von Prototyp-Foamyviren**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Nicole Barg  
aus Michelstadt**

**Würzburg, September 2010**

**Referent:** Professor Dr. med. A. Rethwilm  
**Ko-Referent:** Professor Dr. rer. nat. R. Martini  
**Dekan:** Professor Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 02.03.2011

Die Promovendin ist Ärztin.

meinen Eltern  
und Piri †

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Retroviren – Aus vielen Gründen Gegenstand intensiver Forschung</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Humanmedizinische Relevanz von PFV</b>	<b>3</b>
1.2.1	Prädisponierende Eigenschaften von FV für die Gentherapie	4
1.2.1.1	Apathogenität	4
1.2.1.2	Größe	5
1.2.1.3	Zellen	5
1.2.2	Nachteilige Eigenschaften von FV für die Gentherapie	6
<b>1.3</b>	<b>Retroviren – Ein Überblick</b>	<b>7</b>
1.3.1	Foamyviren als eigene Subfamilie der Retroviren	7
1.3.2	Aufbau der Retroviren	9
1.3.2.1	Das retrovirale Partikel	9
1.3.2.2	Genom der Retroviren	10
1.3.2.3	Virusproteine	11
1.3.3	Replikation der Retroviren	13
1.3.3.1	Aufnahme des Virus in die Zelle	13
1.3.3.2	Reverse Transkription	14
1.3.3.3	Integration	16
1.3.3.4	Transkription und Translation	17
1.3.3.5	Morphogenese	17
<b>1.4</b>	<b>Besonderheiten bei Foamyviren</b>	<b>18</b>
1.4.1	Virusproteine	18
1.4.1.1	Capsid	18
1.4.1.2	Enzyme	19
1.4.1.3	Hüllprotein	19
1.4.1.4	Akzessorische Proteine	20
1.4.2	Das Genom	20
1.4.3	Replikation	21
1.4.3.1	Adsorption	21
1.4.3.2	Integration	21
1.4.3.3	Transkription	22
1.4.3.4	Translation und Morphogenese	22
1.4.3.5	Reverse Transkription	23
1.4.4	Die Polypurintrakte	25
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Enzyme</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Antibiotika</b>	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Kompetente Bakterien</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b>Größen- und Längenstandards</b>	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Antikörper</b>	<b>30</b>
<b>2.7</b>	<b>Plasmide</b>	<b>30</b>
2.7.1	Retrovirale Vektoren	30
2.7.2	Expressionsplasmide	30
<b>2.8</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>31</b>
2.8.1	Mutationssynthesepimer	31
2.8.2	Sequenzierungsprimer	33
<b>2.9</b>	<b>Kits</b>	<b>33</b>
<b>2.10</b>	<b>Sonstige Materialien</b>	<b>34</b>
<b>2.11</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>34</b>
2.11.1	Bakterienkultur	34
2.11.2	DNA-Klonierung und –analyse	35
2.11.3	Zellkultur	36
2.11.4	LTR lacZ-Titration	37
2.11.5	HBS-Transfektion	38
2.11.6	FACS	38
2.11.7	Arbeit mit Proteinen	38
2.11.8	Standardlösungen und Puffer	39



<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung, Nachweis und Aufreinigung von DNA.....</b>	<b>41</b>
3.1.1	Transformation.....	41
3.1.1.1	Kurze Transformation.....	41
3.1.1.2	Lange Transformation.....	42
3.1.1.3	Spezielle Transformation nach site directed Mutagenese.....	42
3.1.2	DNA-Präparation.....	42
3.1.2.1	DNA-Präparation in kleiner Menge (Mini-Präparation).....	42
3.1.2.2	DNA-Präparationen in großer Menge (Maxi-Präparation).....	44
3.1.3	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	45
3.1.4	DNA-Reinigung (Phenol-Chloroform-Fällung und Ethanol-Präzipitation).....	45
3.1.4.1	Phenol-Chloroform-Fällung.....	46
3.1.4.2	Ethanol-Präzipitation.....	46
3.1.5	Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	46
3.1.6	Agarosegel-Elektrophorese.....	47
3.1.7	Gel-Elution.....	48
3.1.7.1	GeneClean III-Kit.....	49
3.1.7.2	QIAquick Gel Extraction Kit.....	49
3.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	49
3.1.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	50
3.1.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	51
3.1.10.1	Präparativer Ansatz.....	52
3.1.10.2	Sequenzierung.....	52
3.1.11	Site directed Mutagenese.....	53
3.1.11.1	PCR-Reaktion.....	53
3.1.11.2	Transformation nach site directed Mutagenese.....	55
<b>3.2</b>	<b>Arbeit mit Zellkulturen.....</b>	<b>56</b>
3.2.1	Zellen auftauen.....	56
3.2.2	Zellen einfrieren.....	56
3.2.3	Kultivierung von adhärennten Zellen.....	56
3.2.4	Zellen aussäen.....	57
3.2.5	Transfektion.....	59
3.2.5.1	Das Vier-Plasmid-System.....	59
3.2.5.2	Polyfect-Transfektion.....	60
3.2.5.3	HBS-Transfektion = Calciumphosphat-Transfektion.....	61
3.2.5.4	PEI-Transfektion.....	62
3.2.6	Induktion.....	63
3.2.7	Überstandabnahme.....	63
3.2.8	Virus-Titration durch die lacZ-Methode.....	64
3.2.9	FACS.....	65
<b>3.3</b>	<b>Arbeit mit Proteinen.....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Herstellung von Zell-Lysaten.....	65
3.3.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE).....	66
3.3.3	Halbtrockenblot-Verfahren (Western Blot).....	67
<b>3.4</b>	<b>Viruspartikelpräparation.....</b>	<b>68</b>
3.4.1	Partikelgewinnung.....	68
3.4.2	Präparation der Proteine im Viruspartikel.....	68
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Mutation der zentralen purinreichen Sequenzen.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2</b>	<b>Übersicht.....</b>	<b>71</b>
<b>4.3</b>	<b>Das Grundlagenexperiment: Replikationseffizienz im proviralen Kontext.....</b>	<b>72</b>
4.3.1	Replikationseffizienz.....	73
4.3.2	Untersuchung der Proteinproduktion.....	74
4.3.3	Zusammenfassung des Grundlagenexperiments.....	76
<b>4.4</b>	<b>Pol-Funktionalität.....</b>	<b>77</b>
4.4.1	Überprüfung der Pol-Funktionalität.....	77
4.4.2	Pol-Funktionalität und Bedeutung für das Grundlagenexperiment.....	80
<b>4.5</b>	<b>Das modifizierte Grundlagenexperiment.....</b>	<b>81</b>
4.5.1	Replikationseffizienz im proviralen Kontext unter Ausschaltung des „Pol-Effektes“.....	81
4.5.2	Replikationseffizienz.....	82

---

4.5.3	Untersuchung der Proteinproduktion .....	83
4.5.4	Zusammenfassung .....	84
<b>4.6</b>	<b>Untersuchung der Transduktionseffizienz im viralen Vektor-Kontext mit pMD9...</b>	<b>85</b>
4.6.1	Transduktionseffizienz.....	86
4.6.2	Proteinproduktion der transfizierten Zellen .....	88
4.6.3	Untersuchung der Partikel auf virale Proteine .....	89
4.6.4	Zusammenfassung.....	90
<b>4.7</b>	<b>Zusammenfassung aller Experimente .....</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
<b>5.1</b>	<b>Aussage der Experimente.....</b>	<b>92</b>
<b>5.2</b>	<b>Aussagekraft des Grundlagenexperiments .....</b>	<b>92</b>
<b>5.3</b>	<b>Aussagekraft des modifizierten Grundlagenexperiments.....</b>	<b>93</b>
<b>5.4</b>	<b>Aussagekraft der pMD9-Transduktion.....</b>	<b>94</b>
<b>5.5</b>	<b>Die Rolle der purinreichen Sequenzen für PFV im Einzelnen .....</b>	<b>95</b>
5.5.1	Die Elemente A und B.....	95
5.5.1.1	Effekt auf die Pol-Inkorporation.....	95
5.5.1.2	Effekt auf die reverse Transkription .....	96
5.5.2	Das Element C .....	97
5.5.2.1	Effekt auf die Gag-Expression .....	97
5.5.2.2	Effekt auf die reverse Transkription .....	100
5.5.3	Das Element D .....	100
5.5.4	Die Plusstrang-Diskontinuität bei PFV ist ein <i>gap</i> .....	101
5.5.5	Mögliche Funktion und Entstehung des <i>gaps</i> .....	104
5.5.6	Mögliche Ursache der variablen <i>gap</i> -Länge .....	105
5.5.7	Zusammenfassung.....	106
<b>5.6</b>	<b>Welchen Einfluss haben die Element A, B und C auf die Replikation? .....</b>	<b>108</b>
<b>5.7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>123</b>
<b>7.1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>7.2</b>	<b>Summary.....</b>	<b>124</b>
<b>7.3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>7.4</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>7.5</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Retroviren – Aus vielen Gründen Gegenstand intensiver Forschung

Retroviren zeichnen sich durch eine einzigartige Replikationsstrategie unter den Viren aus. Ihre Erbinformation, das Genom, ist die RNA – wie bei vielen anderen Viren auch (genannt seien die Familien der Picornaviren, Togaviren oder Flaviviren mit zahlreichen humanpathogenen Vertretern) – jedoch sind Retroviren auf Grund ihres Enzyms reverse Transkriptase (RT) in der Lage, diese RNA als Matrize zur Synthese von DNA zu verwenden. 1970 warf die Entdeckung der RT ein bis dahin gültiges Dogma der Molekularbiologie um (D. Baltimore et al., 1970): Bis dato hatte man den Weg von DNA über Transkription zu RNA für unidirektional gehalten, die Entdeckung der RT widerlegte diese Annahme. Für ihre Arbeit zur RT erhielten die beteiligten Forscher 1975 den Nobelpreis für Medizin.

Es ist jedoch nicht die RT alleine, welche die Retroviren einzigartig macht. So verfügen auch Hepadnaviren über eine RT, was erst wesentlich später entdeckt wurde (u.a. Hirota et al., 1987). Hepadnaviren sind jedoch nicht in der Lage, ihr virales Genom ins Wirtsgenom zu integrieren. Die Fähigkeit zur Integration des Genoms in eine Wirtszelle ist eine weitere Besonderheit der Retroviren (de la Maza et al., 1975; Steffen und Weinberg, 1978; Varmus et al., 1973). Integration ist auch bei Adeno-assoziierten Viren Bestandteil der Replikation, aber diese besitzen keine RT und die Replikation der DNA-Viren verläuft im ursprünglich als unidirektional angesehenen Weg. Es ist also die Kombination aus reverser Transkription und Integration, die Retroviren zu Retroviren macht.

Ihre einzigartige Molekularbiologie ist *ein* Grund für das Interesse der Forschung an Retroviren. Ein weiterer Grund ist, dass zu ihnen einige bedeutende human- und tierpathogene Erreger gehören. Der bekannteste Vertreter ist das Human Immunodeficiency Virus (HIV). Seit der Erstbeschreibung von HIV in den 80er-Jahren (u.a. Barre-Sinoussi et al., 1983) richtet sich das Augenmerk der virologischen Forschung verstärkt auf Retroviren, v.a. auf Grund der weltweit immer noch zunehmenden Zahl von HIV-Kranken und AIDS (autoimmune deficiency syndrome). Seitdem gibt es zahlreiche Bestrebungen, die retrovirale

Replikationsstrategie, die Vorgänge bei Transkription und Translation im Einzelnen, sowie die Partikelmorphogenese genauer zu entschlüsseln – in der Hoffnung, strategische Replikationsschritte zu identifizieren und diese im Falle von HIV zu unterbinden. Die RT beispielsweise ist ein solch strategisches Instrument in der Replikation von HIV, daher sind Hemmer der RT wirksam in der Therapie von HIV-Kranken. Auch Protease (PR)-Hemmer werden im Rahmen der etablierten HAART (highly active antiretroviral treatment) erfolgreich eingesetzt. HAART ist dort wo verfügbar eine effektive Therapie, um das AIDS-Stadium, in welchem die durch HIV ausgelöste Immunschwäche ihre volle Ausprägung erlangt, deutlich heraus zu zögern. Eine Heilung der HIV-Infektion liegt jedoch noch in weiter Ferne. Die Integrase, welche die Integration ins Wirtsgenom vermittelt, ist die zweite Besonderheit im retroviralen Replikationszyklus neben der Existenz der RT – und derzeit ein neuer Mittelpunkt antiretroviraler Therapieversuche (u.a. Jaskolski et al., 2009). Die retrovirale Forschung sieht sich zudem mit wichtigen ökonomischen Gesichtspunkten konfrontiert. Bei weltweit ca. 33 Millionen HIV-Positiven ist die Bereitstellung von HAART finanziell schwierig, zumal die meisten HIV-Kranken (mit 22 Millionen etwa 2/3) in den Entwicklungsländern südlich der Sahara leben (Quelle: Presse zum Weltaidstag 2008). Die Bereitstellung von HAART zu adäquaten Preisen durch die Pharmaindustrie bei Sponsoring durch den Staat konnte in Südafrika durchgesetzt werden, in anderen Ländern haben die Menschen zum Teil jedoch nicht einmal Zugang zur medizinischen Grundlagerversorgung. Die Forschung ist hier Gegenstand eines politisch-ökonomischen Konflikts, der sicher als einer der schwierigsten unserer Zeit anzusehen ist.

Abgesehen von den Krankheiten, die sie auslösen können, zeichnen sich Retroviren auf der anderen Seite aber auch durch ihre Fähigkeit aus, in der Gentherapie als Vektoren Erfolge zu erzielen. Die retrovirale Fähigkeit zur Integration von Genen in ein Wirtsgenom macht es möglich, gesunde Wirtsgene in einen retroviralen Vektor einzubauen, welche dann kranke Gene in einer Körperzelle eines kranken Wirts funktional ersetzen können. Die ersten replikationsinkompetenten Vektoren wurden auf Basis von MLV (Murines Leukämievirus) konzipiert (Mann et al., 1983; Williams et al., 1984) und fanden bald erstmals Anwendung in der somatischen Gentherapie (Anderson et al., 1984). Heute stellen retrovirale Vektorsysteme eine gute Behandlungsalternative

z.B. für kongenitale Immundefizienzen wie die X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID), das Wiskott-Aldrich-Syndrom oder die chronisch granulomatöse Immunerkrankung (CGD = chronic granulomatous disease) dar (für einen Überblick siehe Qasim et al., 2009). Es gibt Bestrebungen, Immuntherapie für Krebserkrankungen mittels retroviraler Vektoren zu etablieren (für einen Überblick siehe Dotti et al., 2009). Auch im Feld der neurodegenerativen Erkrankungen wie etwa bei amyotropher Lateralsklerose (ALS), Chorea Huntington, M. Parkinson oder spinaler Muskelatrophie gibt es bereits Therapieversuche mit lentiviralen Vektoren (für einen Überblick s. Nanou et al., 2009). In peripheren Polyneuropathien soll eine Neuroregeneration durch Einsatz von retroviralen Vektoren induziert werden (für einen Überblick s. Federici et al., 2007; Zacchigna et al., 2009). Foamyviren (FV) eignen sich auf Grund einiger Besonderheiten unter den Retroviren besonders gut zur Gentherapie in hämatopoetischen Stammzellen. U.a. hierdurch erklärt sich, weshalb die nicht-humanpathogenen Viren humanmedizinisch relevant sind.

## 1.2 Humanmedizinische Relevanz von PFV

FV sind apathogen für Mensch und Tier. Es gibt demnach keine Krankheiten, deren Ätiopathogenese zu untersuchen wäre. FV stellen jedoch molekularbiologisch auf Grund ihrer Replikationsstrategie eine Besonderheit unter den RV dar und das Verständnis ihrer Biologie mag auch helfen, pathogene RV, wie v.a. HIV, besser zu charakterisieren. FV eignen sich ferner bei Apathogenität zum Forschungsobjekt im S2- anstatt im S3-Labor (S2-Labor: geringe Wahrscheinlichkeit für Gesundheitsgefährdung des Menschen im Gegensatz zu mäßiger Wahrscheinlichkeit im S3-Labor). Ihre spezifischen Eigenschaften machen ihren Einsatz in der Gentherapie möglich, einem noch im Umbruch befindlichen Gebiet der medizinischen Forschung, welche ganz neue Therapiemöglichkeiten für bisher als unheilbar geltende genetische Erkrankungen offerieren könnte. Wie bereits erwähnt, gibt es schon etablierte Verfahren im Bereich der Immunschwächen und zahlreiche Versuche zu neurodegenerativen Erkrankungen oder im Bereich der onkologischen Forschung. Vorstellbar sind jedoch noch viele weitere Einsatzgebiete – überall dort, wo Genmutationen zum Verlust oder Defekt von Proteinen führen und so Krankheiten auslösen, genannt

seien hier Muskeldystrophien (z.B. Duchenne'sche Muskeldystrophie), welche bereits im Kindesalter zum Tode führen, oder hämatologische Erkrankungen (z.B. Sichelzellenanämie, Thalassämie etc.), welche die Lebensqualität des Patienten stark einschränken. Aber auch Erkrankungen des höheren Lebensalters, welche insbesondere auf Mangel einzelner Genprodukte oder Botenstoffe am Ende einer Signalkette von Genprodukten zurückgehen, wie z.B. der Dopaminmangel beim M. Parkinson (der sogenannten Schüttellähmung mit zunehmender Unbeweglichkeit des Patienten auf Grund eines bisher ungeklärten Untergangs von Zellen eines bestimmten Hirnareals), könnten eines Tages Ziele der Gentherapie darstellen.

Bei allen Möglichkeiten, die sich durch virale Vektoren auf tun, ist aber v.a. die Sicherheit der Systeme relevant. So stellten sich bei den ersten Versuchen der Therapie von X-SCID verheerende Rückschläge ein, als sich zeigte, dass das Vektorsystem (ehemals MLV), durch seine spezifischen Eigenschaften auch krank machen konnte.

### **1.2.1 Prädisponierende Eigenschaften von FV für die Gentherapie**

#### **1.2.1.1 Apathogenität**

*In vivo* sind bei FV bisher keinerlei negativen Effekte auf den Wirtsorganismus bekannt. Für die Gentherapie ist das äußerst erwünscht, da auch ein replikationskompetentes Vektorsystem niemals in der Lage wäre, den Wirt krank zu machen. Der oben erwähnte Vektor auf Basis von MLV (Murines Leukämievirus) kann auf Grund seiner spezifischen Integrationseigenschaften selber zum Ausgang einer Krankheit werden: In X-SCID-Patienten löste es durch Integration in der Nähe von Protoonkogenen T-Zell-Leukämien aus (u.a. Hacein-Bey-Abina et al., 2002a; Hacein-Bey-Abina et al., 2002b; Hacein-Bey-Abina et al., 2003). MLV, welches als Wildtyp-Virus normalerweise nicht humanpathogen ist, löst bekanntermaßen in Mäusen Leukämien aus – ein Effekt, der sich also auch in der humanen somatischen Gentherapie eingestellt hatte. FV zeigen keine Integrationspräferenz in regulatorische Genelemente (Nowrouzi et al., 2006) und sind weder human- noch tierpathogen (Linial 2000; Meiering und Linial, 2001; Falcone et al., 2003). Auch in immunsupprimierten Tieren konnten keine

pathogenen Eigenschaften der Foamyviren gezeigt werden, weder in mit FFV (Felines Foamyvirus) und FIV (Felines Immundefizienz-Virus) koinfizierten Katzen (Zenger et. al, 1993), noch in mit Ciclosporin A, einem Immunsuppressivum, behandelten, und mit FV infizierten Affen (Ergebnisse Neumann-Hafelin). Die Gefahr, dass PFV im Menschen pathogene Effekte auslösen kann, wie etwa HIV, welches ja auch ursprünglich vom Affen stammt (Peeters et al., 2002; Sharp et al., 2001) ist gering. Zwar persistieren Foamyviren in den infizierten Wirten lebenslang, aber die aktive Virusreplikation ist kaum messbar, was folglich auch eine geringe Mutationsrate nahe legt.

Zusammenfassend sollten foamyvirale Vektoren also keine negativen Überraschungen wie MLV-Vektoren bieten. Ihre Effektivität könnte ähnlich der von bereits verwendeten lentiviralen Vektoren im Bereich der hämatopoetischen Stammzelltherapie sein (Trobridge et al., 2009), ihre Sicherheit sollte der von gammaretro- und lentiviralen Vektoren überlegen sein (Rethwilm et al., 2007).

### **1.2.1.2 Größe**

Um so größer Vektoren in der Gentherapie sind, desto größer können die mit ihnen transportierten Gene sein. PFV hat das größte Genom unter den RV, es weist ca. 13.200 bp auf. PFV wären daher z.B. gegenüber dem 7000 bp umfassenden Genom von MLV im Vorteil.

### **1.2.1.3 Zellen**

Der Rezeptor für PFV, an welchen Env adsorbieren muss und so die Endozytose des Viruspartikel vermitteln soll, scheint auf sehr vielen verschiedenen Zellen vorzukommen, da sich verschiedenste Zelltypen mit PFV infizieren lassen. Auch dies wäre ein Vorteil in der Gentherapie, da man fast alle Zellarten problemlos behandeln könnte.

### 1.2.2 Nachteilige Eigenschaften von FV für die Gentherapie

Möchte man andere Zelltypen als jene, für die FV auf Grund ihres Hüllproteins Env einen Zelltropismus aufweisen, infizieren (also mit Gentherapie behandeln), muss man ein anderes Hüllprotein verwenden, das eigentliche Virus „pseudotypisieren“. Bei FV scheint dies aber nicht möglich zu sein, da Env essentiell für das *Budding* von Gag ist (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschman et al., 1999).



## 1.3 Retroviren – Ein Überblick

### 1.3.1 Foamyviren als eigene Subfamilie der Retroviren

Entdeckt wurden Foamyviren in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts.

Ihren Namen erhielten sie auf Grund ihres zytopathogenen Effekts (englisch: CPE = cytopathological effect), den sie in *in vitro* infizierten Zellen auslösen: Sie bedingen eine schaumige (englisch foam = Schaum) Degeneration der Wirtszellen (u.a. Enders und Peebles et al., 1954). Im lebenden Wirt replizieren sie apathogen, wofür die Replikationspräferenz in ohnehin kurzlebigen Zellen (z.B. Mukosa der Mundschleimhaut) verantwortlich gemacht wird (Murray et al., 2006 + 2008). Klassifiziert als Retroviren – auf Grund der entdeckten Aktivität einer RT – wurden sie 1971 (Parks et al., 1971). Die Einteilung der Retroviren erfolgt in Unterfamilien und Genus. Die einzelnen Familien unterscheiden sich hinsichtlich Morphologie und Genetik. In allen Genus bis auf den der Alpharetroviren finden sich auch komplexe Retroviren, welche im Gegensatz zu den einfachen Retroviren zusätzlich zu den retroviralen "Standardproteinen" Gag, Pol, Env (s. später), akzessorische Proteine bilden. Jedes Virus löst eine spezifische Pathologie in seinem Wirtsorganismus aus, welche in Tab. 1 angegeben ist, mit dem Hinweis darauf, ob auch eine Pathogenität für Menschen besteht.

Foamyviren, welche auf Grund ihrer einzigartigen, von allen anderen RV abweichenden Replikationsstrategie mit den Spumaretroviren eine eigene Unterfamilie der Retroviren darstellen, infizieren viele verschiedene Spezies (Affen, Pferde, Katzen, Rinder), auch humane Infektionen sind beschrieben. Diese gehen aber nicht auf ein humanes Foamyvirus (früher als HFV bezeichnet) zurück, sondern sind zoonotisch, meist im Umgang mit infizierten Affen, erworbene Infektionen. "HFV" konnte als ein Schimpansen-Foamyvirus identifiziert werden (Herchenröder et al., 1994). Dieses SFV cpz (englisch: simian Foamyvirus, chimpanzee) wird heute als Prototyp-Foamyvirus (PFV) bezeichnet und dient als Modell für die Forschung an Foamyviren (Rethwilm et al., 2003a).

Tab. 1: Einteilung der Retroviren (nach Rethwilm et al., 2003)

Unterfamilie	Genus	Vertreter	Genom	Pathologie
Orthoretrovirinae	Alpharetroviren	Rous Sarcoma Virus	Einfach	Sarkombildung (Weichteiltumor-bildung in Geflügel)
	Betaretroviren	Mason-Pfizer-Monkey-Virus Mouse Mammary Tumour Virus	Einfach Komplex	Tumorbildung in Affen Tumorbildung in Mäusen
	Gammaretroviren	Murine Leukaemia Virus	Einfach	Leukämie in Mäusen
	Deltaretroviren	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus	Komplex	T-Zell-Leukämie in Primaten (auch Menschen)
	Epsilonretroviren	Walleye Dermal Sarcoma Virus	Komplex	Sarkombildung in Fischen
	Lentiviren	Human Immunodeficiency Virus	Komplex	Immunschwäche/ AIDS in Menschen
Spumaretrovirinae	Foamyviren	Prototype Foamyvirus	komplex	Schaumige Degeneration in Zellkulturen, sonst apathogen

## 1.3.2 Aufbau der Retroviren

Um die Molekularbiologie von FV verstehen zu können, wird zunächst der Aufbau und die Replikationsstrategie von Retroviren im Allgemeinen dargestellt. Später werden dann die Besonderheiten von PFV aufgezeigt, die dafür verantwortlich waren, FV als gesonderte Subfamilie unter den Retroviren zu klassifizieren.

### 1.3.2.1 Das retrovirale Partikel

Retroviren sind Partikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Die Hüllmembran ist von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet. In ihr eingelagert sind viral kodierte Glykoproteine, wobei ein externes Glykoprotein mit einem transmembranen Protein nicht-kovalent verbunden ist. Das Genom, welches in Form von zwei einzelsträngigen RNA vorliegt, ist komplexiert mit bestimmten Proteinen, den Nucleocapsiden (NC). Die viralen Enzyme, welche RT, Integrase (IN) und Protease (PR) umfassen, sind gemeinsam mit dem Erbgut umgeben von einem Capsid (CA), welches je nach Genus eine sphärisch-ikosaedrische oder konische Morphologie aufweist. Die Protease kann sich auch außerhalb des Capsids befinden. Das Matrixprotein (MA) verbindet Capsid und Hüllmembran.

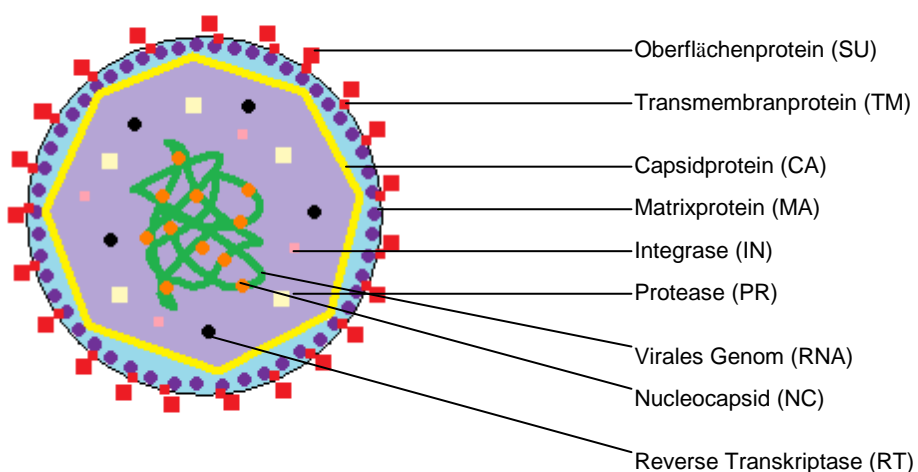


Abb. 1 Aufbau eines Retrovirus

### 1.3.2.2 Genom der Retroviren

Das diploide RNA-Genom weist mit einem 5'-Cap und einer 3'-Polyadenylierung die Charakteristika eukaryotischer mRNAs auf. Im 5'-Bereich beinhalten Retroviren eine Primerbindungsstelle (PB), an die eine zelluläre tRNA gebunden ist. Die tRNA dient als Initiationsort für die reverse Transkription. Flankiert wird das Genom von einer nichtkodierenden Region, welche die Abschnitte R (für redundant), U5 (für unique = einzigartig, am 5'-Ende) und U3 (für unique, am 3'-Ende) enthält. U5 und U3 enthalten für die Integration des Provirus wichtige Sequenzen, U3 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Genexpression. Bei der Entstehung des Provirus während der reversen Transkription wird eine LTR aus U3 – R – U5 gebildet, welche die für die Genexpression wichtigen Abschnitte enthält, d.h. Promotoren und cis-aktive Elemente für zelluläre Proteine.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Genoms ist die Leader-Region zwischen der PB und dem Beginn des gag-Gens. Sie enthält den Spleißdonor (SD), der für das Spleißen aller retroviralen, subgenomischen mRNAs benutzt wird. In der Leaderregion findet man auch die Verpackungs-Sequenz ( $\psi$ ), welche der RNA-Anlagerung über die Nucleocapsid (NC)-Domäne innerhalb des Viruspartikels dient. Es findet sich dort auch die dimer linkage site (DLS), die zur Dimerisierung der beiden genomischen RNAs dient. Schließlich folgen die Gene für die viralen Produkte, welche bei allen Retroviren durch gag (Capsidproteine), pol (Enzyme), env (Membranproteine) und bei den komplexen Retroviren durch weitere Genabschnitte (akzessorische Proteine) definiert sind. Nach den Genen folgt ein Polypurintrakt aus mindestens neun zusammenhängenden Purinen (Guanosine und Adenosine), welcher der Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese während der reversen Transkription dient. Lentiviren sowie FV enthalten zusätzliche PPT (Charneau et al., 1991; Kupiec et al., 1988).

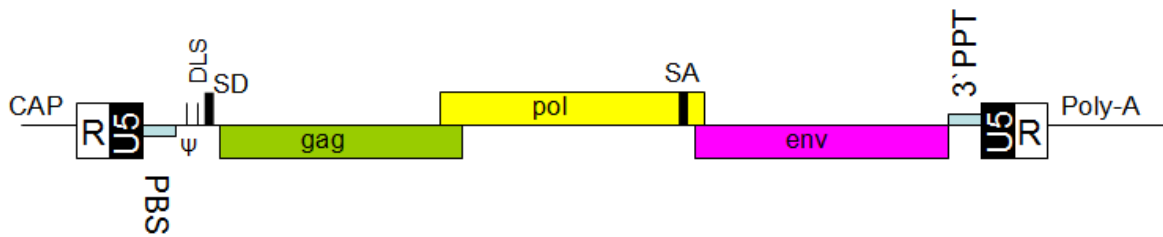


Abb. 2 RNA-Genom eines einfachen Retrovirus

### 1.3.2.3 Virusproteine

Alle Retroviren kodieren für Gag, Pol und Env.

Gag steht für gruppenspezifische Antigene und umfasst das Matrixprotein, das Capsidprotein, das Nucleocapsidprotein und manchmal die Linkproteine. Alle diese Proteine werden aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein gebildet, welches während der Partikelmorphogenese von der viralen Protease (PR) in die einzelnen Bestandteile zerlegt wird. Bei Orthoretroviren wird obligat das Gag-Pol-Fusionsprotein gebildet, welches in 5% der gag-spezifischen Transkriptionen durch eine Leserasterverschiebung oder Stopp-Codon-Unterdrückung an den Ribosomen entsteht. Aus diesem Fusionsprotein entstehen die Pol-Proteine, die PR schneidet sich autokatalytisch heraus und kann danach die anderen Proteinanteile ausschneiden. FV bilden kein Gag-Pol-Fusionsprotein. Gag dient der partikulären Strukturbildung: Transfiziert man Zellen nur mit gag-Expressionsplasmiden von Orthoretroviren, lassen sich Partikel, die sich von der zellulären Plasmamembran abschnüren, nachweisen. Die NC-Domäne, die den Zinkfingermotiven von DNA-bindenden Proteinen ähnelt, interagiert mit  $\psi$  und komplexiert die genomische RNA.

Die Matrixproteine sind mit der Hüllmembran vernetzt und stellen vermutlich im reifen Viruspartikel Kontakt zwischen Viruscapsid und viralen Hüllproteinen her.

Pol kodiert für alle viralen Enzyme. Es folgen nacheinander die Protease (PR), die reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN).

Die PR ist ein Dimer in dessen aktiven Zentrum sich die Aminosäure (AS) Aspartat befindet. Abhängig von der Proteinsequenz und der räumlichen Konfiguration schneidet das Enzym die viralen Proteine auseinander, sowie sich selbst autokatalytisch aus dem Gag-Pol-Fusionsprotein heraus.

Die RT ist eine Polymerase, die entweder RNA oder DNA als Matrize zur Synthese von DNA benutzen kann. Sie weist auch eine RNase H-Aktivität auf, d.h. sie baut den RNA-Anteil von RNA-DNA-Hybriden ab, was bei der reversen Transkription erforderlich ist. Da die RT keine Möglichkeit zur Autokorrektur (englisch: proofreading activity) besitzt, macht sie mit einer Häufigkeit von  $1:10^3 / 10^4$  pro bp und Replikationszyklus Fehler, was einen Motor für die Evolution der Retroviren darstellt.

Die IN bindet nach der reversen Transkription an die entstandene dsDNA und baut sie in das Wirtsgenom ein. Dies ist möglich, da sie auf der einen Seite eine Endonuclease ist, und auf der anderen eine Ligase, die dsDNA miteinander verbinden kann (Wirtsgenom und revers transkribierte virale dsDNA).

Env (von envelope) kodiert für die Membranproteine. Diese sind in die von der Zellmembran bei der Abschnürung der Viruspartikel abgeleiteten Virushülle eingelagert. Es handelt sich um Glykoproteine, welche aus einem nicht-kovalent verbundenen externen Protein (SU) und einem transmembranen Protein (TM) bestehen. Wie die Gag-Proteine werden die Env-Proteine von einem gemeinsamen Vorläuferprotein hergestellt, das allerdings im Fall von Env von einer exakt gespleißten mRNA translatiert wird. SU dient zur Adsorption an die Zellmembranen bei der Infektion von Zellen, TM zur Fusion des Virus mit der Plasmamembran. Je nach Virusgenus kann sich SU nur an bestimmte Rezeptoren anlagern und ist somit für die Zellspezifität, den Zelltropismus, des Virus verantwortlich. Env-Proteine stellen des Weiteren die Epitope zur Bildung von Antikörpern dar. Eine hohe Variabilität, wie sie beispielsweise beim gp120 von HIV vorliegt, behindert eine effektive Immunantwort.

Zusätzliche Proteine, die bei komplexen Retroviren gebildet werden, können verschiedene Funktionen erfüllen. Einige dienen als Transaktivatoren, so z.B. das von Lentiviren gebildete Tat = transactivator of transcription, welches durch Bindung an die LTR des Provirus für eine Erhöhung der Transkription sorgt. Bei PFV hat Tas eine analoge Funktion, es bindet an die TRE = Tas-responsive element in U3. Es existieren auch posttranskriptionell wirksame Transaktivatoren, z.B. bei HIV Rev = regulator of expression of virion proteins, welches durch Bindung an das RRE = rev responsive element in der vom Provirus transkribierten mRNA für einen bevorzugten Kernexport der mRNAs sorgt. Akzessorische Proteine anderer Funktion gibt es noch einige weitere, z.B. Vif, welches das revers transkribierte virale Genom durch Komplexierung mit APOBEC3G schützt, einem zellulären Enzym, das zur Desaminierung von Cytosin zu Uracil in viraler Minusstrang-DNA und damit zu ihrer Degradation führen kann (Bishop et al., 2004; Sheehy et al., 2002; Mariani et al., 2003).

### **1.3.3 Replikation der Retroviren**

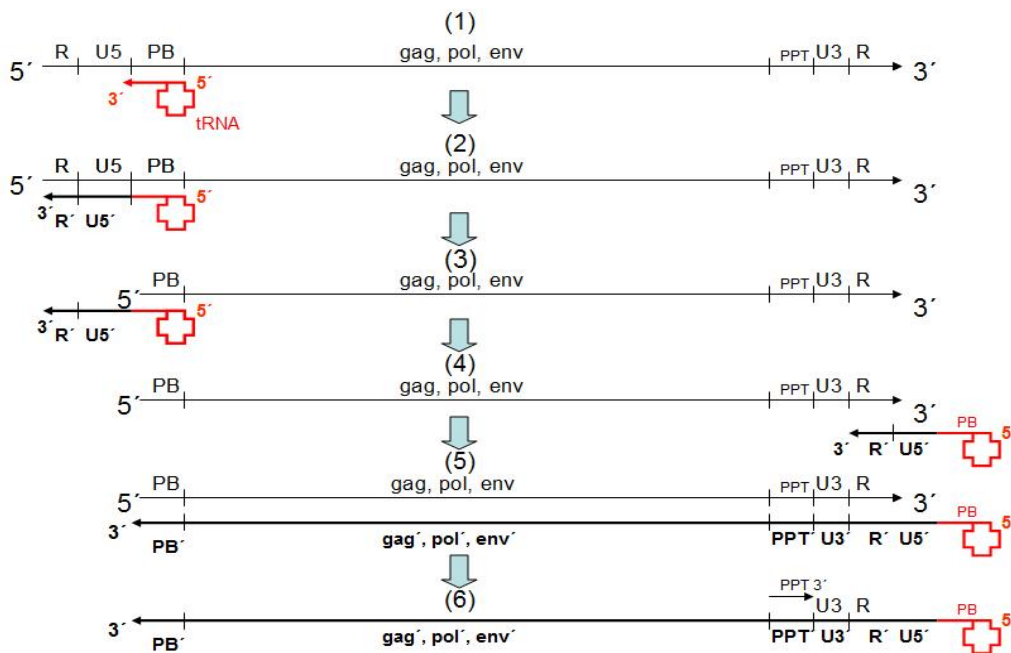
#### **1.3.3.1 Aufnahme des Virus in die Zelle**

Der Replikationszyklus eines Retrovirus beginnt mit dem Anhaften an die Zellmembran der Wirtszelle. Die Adsorption wird über das externe Protein (SU) vermittelt, welches spezifisch mit einem Oberflächenrezeptor interagiert. Die Bindung an den zugehörigen Rezeptor bedingt eine Konformationsänderung im transmembranen Protein, was zum Verschmelzen der Virushülle mit der Zellmembran und zur Aufnahme des Virus in die Wirtszelle führt.

Einige Capsidproteine machen bei der Wanderung durchs Zytoplasma zwar Konformationsänderungen durch, bleiben aber mit der viralen RNA und den Enzymen assoziiert. Noch im Zytoplasma beginnt die reverse Transkription, die den Retroviren ihren Namen gegeben hat.

### 1.3.3.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription beginnt bei den Retroviren nach der Injektion des Erbguts in die Zelle. Bei Foamyviren findet sie jedoch zu einem späteren Zeitpunkt im Replikationszyklus statt. Zum modellhaften Ablauf im Einzelnen siehe Abb.3 und Abb.4.

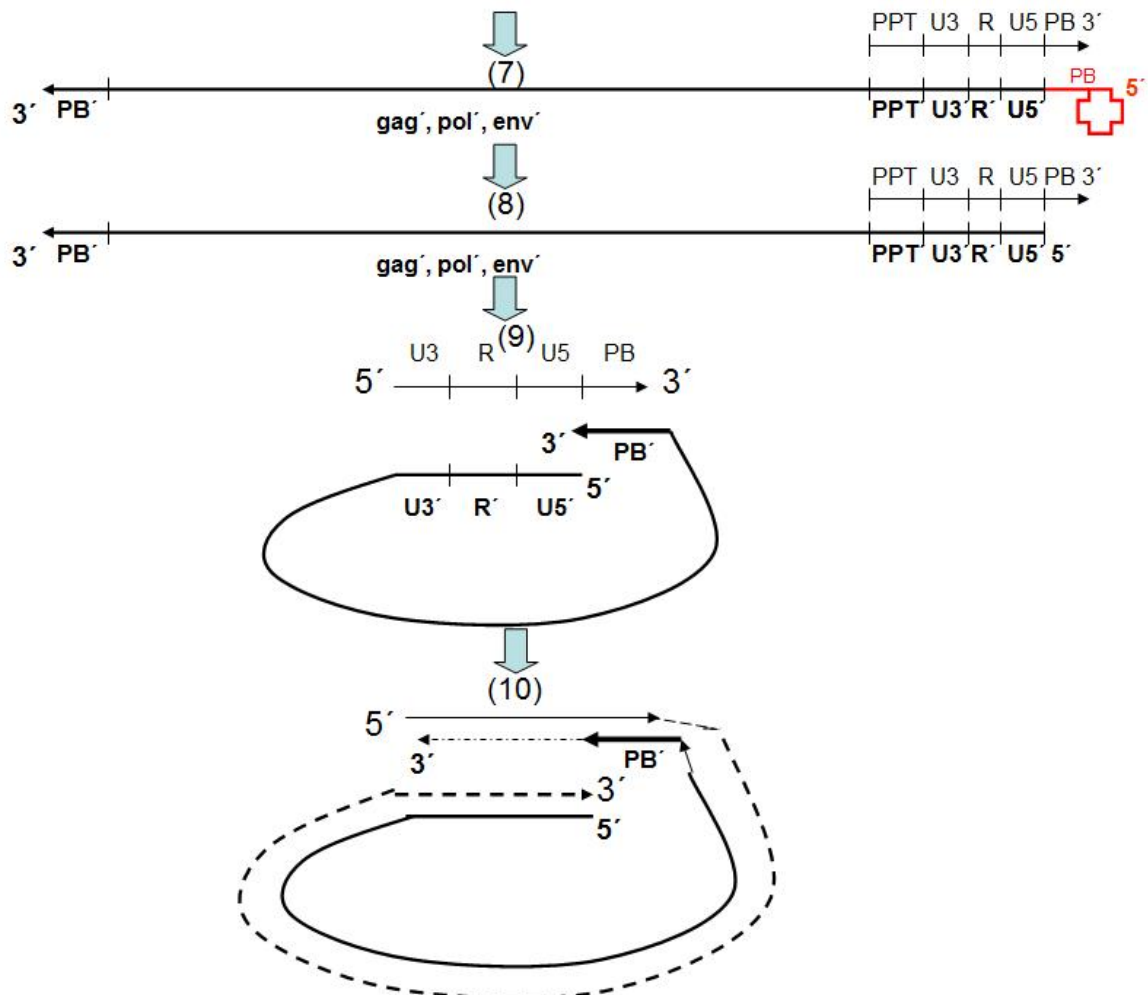


**Abb. 3 Minusstrangsynthese in Retroviren**

Initiiert wird die reverse Transkription am 3'-Ende der PB, ausgehend von der dort gebundenen zellulären tRNA, die als Primer fungiert (1). Die RT synthetisiert von 5' nach 3' ein kurzes Stück Minusstrang-DNA mit den zur RNA komplementären Abschnitten R' und U5' (2). Das RNA-Stück, welches als Matrize gedient hat, wird durch die RNaseH-Funktion der RT abgebaut (3). Das Minusstrang-DNA-Stück wird nun an das 3'-Ende der viralen RNA transferiert, dort kann R' an R hybridisieren (4). Es erfolgt nun die Elongation der Minusstrang-DNA: Das komplette Genom des Virus wird revers transkribiert (5) und die als Matrize dienende RNA abgebaut (6). Lediglich der am 3'-Ende der Virus-RNA befindliche PPT, der 3'-PPT, ist resistent gegen die RNaseH und bleibt erhalten (6). Er dient zur Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese (s. Abb.4), die nun komplementär zur Minusstrang-DNA – ausgehend vom PPT – erfolgt (7). Nach dem Abbau der tRNA



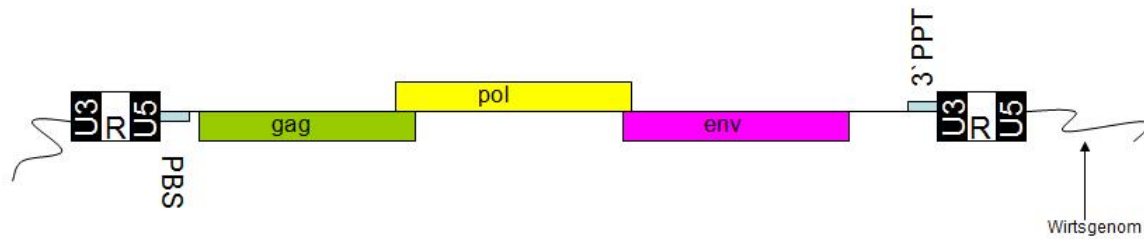
(8) können die PB, die nun auf Plus- und Minusstrang-DNA zu finden sind, miteinander hybridisieren, was zu einer Zirkularisierung der Nukleinsäuren führt (9). Die Komplettierung der Minus- und Plusstrang-Synthese kann nun statt finden (10).



**Abb. 4 Plusstrangsynthese in Retroviren. Die Initiation erfolgt am 3'PPT.**

Es finden zwei Strangtransfere statt, zwei sogenannte „jumps“ der RT: Der erste beim Transfer des Minus-DNA-Strangs an das 3'-Ende der RNA (4), der zweite beim Transfer des kurzen Plus-DNA-Strangs an das 3'-Ende des Minus-DNA-Strangs (9).

Das Ergebnis der reversen Transkription ist ein virales Genom, kodiert in doppelsträngiger DNA (dsDNA), welches an beiden Enden die LTR aus U3 – R – U5 enthält, die erforderlich für die folgende Integration und Transkription ist (Modrow, 2003). Nach der Integration wird das dsDNA-Genom als Provirus bezeichnet.



**Abb. 5 Provirus.**

Zwar transkribieren auch Hepadna-Viren und Caulimoviren revers, jedoch integrieren sie die entstehende dsDNA nicht in das Wirtsgenom.

### 1.3.3.3 Integration

Die Integration erfolgt nach der reversen Transkription. Mit Ausnahme von Lentiviren kann die Integration nur in sich teilenden Zellen erfolgen, da der Präintegrationskomplex (PIC), welcher die noch nicht integrierte virale DNA enthält, nicht die Kernmembran überwinden kann (Lewis and Emerman, 1994; Miller et al., 1990; Roe et al., 1993; Varmus et al., 1977). HIV ist in der Lage, den PIC auch über intakte Kernmembranen von sich nicht teilenden Zellen in den Kern zu transportieren. Welche Strukturen hierfür verantwortlich sind, ist schon länger umstritten (Aida Y., 2009; Bukrinsky et al., 1992; Lewis et al., 1992).

Die Integration des Provirus durch die virale IN erfolgt sobald sich die Zelle in der Metaphase befindet bzw. sobald das lentivirale Genom intranukleär lokalisiert ist. Die IN schneidet hierzu das Wirtsgenom an einer von den Integrationspräferenzen des Virus abhängigen Stelle auseinander und produziert an den Enden des Provirus jeweils ein zwei Basen überhängendes Stück. Diese Basen werden schließlich angeschnitten und durch zur Wirts-DNA komplementäre Basen ersetzt. Das Virus verliert also zwei endständige Basen auf jeder Seite. Im Wirtsgenom hingegen werden 4-6 bp dupliziert.

Dieser Vorgang kann dazu führen, dass bestimmte Wirtsgene zerstört werden oder etwa unter den Einfluss des viralen Promotors geraten – alles dazu geeignet, zum Beispiel Tumorsuppressorgene auszuschalten oder Protoonkogene zu aktivieren, was erklärt, weshalb Retroviren onkogen wirken können.

### 1.3.3.4 Transkription und Translation

Vom Provirus aus kann nun die Transkription erfolgen. Ausgehend vom 5´-LTR-Promotor, aktiviert durch zelluläre Faktoren bei einfachen und durch regulatorische Proteine bei komplexen Retroviren (z.B. Tat bei HIV), werden nun mindestens zwei RNA-Spezies abgelesen. Bei einfachen Retroviren sind dies eine ungespleißte RNA, die einerseits als prägenomische RNA und andererseits als Matrize für Gag- und Gag-Pol-Proteine dienen kann, und eine einfach gespleißte RNA für das Env-Protein. Bei den komplexen Retroviren entstehen auch mehrfach gespleißte RNAs, von denen die regulatorischen und akzessorischen Proteine abgelesen werden. Gespleißte RNAs können problemlos den Kern verlassen. Um auch die einfach und ungespleißten RNAs aus dem Kern exportieren zu können, besitzt z.B. HIV wie oben erwähnt als regulatorisches Protein Rev, welches an das *rev responding element* (RRE) der viralen RNA binden kann und für den Kernexport sorgt.

Nachdem die RNAs ins Zytoplasma exportiert wurden, kann die Translation erfolgen. Env wird am rauen ER translatiert, gag und pol an den freien Ribosomen. Pol entsteht bei allen Retroviren in Form eines Gag-Pol-Fusionsproteins, bei FV gesondert (s. auch 1.4.1.2). Aminoterminal erfolgt die Myristylierung der Gag- bzw. Gag-Pol-Proteine, was einen Transport zur Zellmembran bedingt.

### 1.3.3.5 Morphogenese

Die Morphogenese – die Partikelzusammensetzung zum Capsid und den enthaltenen Strukturen – erfolgt entweder an der Zellmembran (C-Typ-Morphogenese bei Alpha-, Gamma-, Epsilon- und Lentiviren) oder im Zytoplasma (B-/D-Typ-Morphogenese bei Beta- und Deltaretroviren) (Vogt, 1997b).

Die genomische RNA wird mittels der  $\psi$ -Sequenz, welche mit den Zinkfingerartigen NC-Domänen von Gag interagiert, in das Partikel inkorporiert. Die Pol-Inkorporation findet über das Gag-Pol-Fusionsprotein statt (Jones et al., 1990; Park und Morrow, 1992), welches erst im von der Membran ausgestülpten Partikel, in welchem ein saurer pH-Wert herrscht, autokatalytisch von der sich dann dimerisierenden PR in die Enzym- und Capsidanteile zerlegt wird. Da FV kein Gag-Pol-Fusionsprotein bilden, haben sie eine andere Strategie der Partikelmorphogene entwickelt (s. später). Gag kann sich bei Orthoretroviren auch ohne die Anwesenheit von anderen viralen Proteinen von der Zellmembran abschnüren und sogenannte virus like particles (VLP) bilden (Vogt, 1997b).

## 1.4 Besonderheiten bei Foamyviren

Da FV revers transkribieren und ein Provirus etablieren, werden sie als Retroviren klassifiziert. Sie unterscheiden sich allerdings auf Grund der Reihenfolge dieser Schritte von allen anderen Retroviren und nehmen eine Zwischenstellung zwischen den Orthoretroviren und den Hepadnaviren ein.

### 1.4.1 Virusproteine

#### 1.4.1.1 Capsid

Gag, das gruppenspezifische Antigen als Capsid der FV, welches bei den Orthoretroviren von einem gemeinsamen Vorläuferprotein abgelesen und in Matrixprotein, Nucleocapsid und Capsid zerlegt wird, erfährt in FV nur eine Prozessierung (ein *Cleavage*) am C-Terminus. Ein ca. 3 kD-großes Peptid wird durch die virale Protease abgespalten. Es resultieren daraus unprozessiertes Gag von 71 kD und prozessiertes Gag von 68 kD, welches in infektiösen Viruspartikeln gefunden wird (Hahn et al., 1994; Fischer et al., 1998). Im Gegensatz zu den Orthoretroviren, welche nur Gag zum Abschnüren der Partikel am endoplasmatischen Retikulum (ER) oder an der Plasmamembran – dem *Budding* – benötigen (Boulanger und Jones 1996; Wills und Craven 1991), ist das Gag der

FV auf die Anwesenheit von Env angewiesen (Baldwin und Linial, 1998; Fischer et al., 1998; Pietschman et al., 1999).

### 1.4.1.2 Enzyme

Pol (die virale Polymerase) wird bei den FV nicht von einem Gag-Pol-Fusionstranskript abgelesen, sondern von einer gespleißten mRNA – möglich durch ein eigenes ATG-Pol-Startcodon (Bodem et al., 1996; Jordan et al., 1996; Löchelt and Flügel, 1996; Yu et al., 1996a). Dies macht eine von den Orthoretroviren abweichende Pol-Inkorporation in die Viruspartikel nötig, welche Pol über das Gag-Pol-Fusionsprotein inkorporieren. Bei FV ist Pol auf bestimmte Sequenzen in der genomischen RNA angewiesen, um ins Partikel zu gelangen (Heinkelein et al. 2002b; Peters et al., 2005).

Ein weiterer Unterschied zu den Orthoretroviren ist, dass Pol nicht in alle Untereinheiten durch die PR aufgespalten wird, sondern nur in zwei: die IN-Untereinheit von 41 kD und ein Fusionsenzym von PR und RT von 85 kD (Pfrepper et al., 1998).

### 1.4.1.3 Hüllprotein

Aus einem Env-Vorläuferprotein (Env für *envelope*, englisch = Hülle) werden eine transmembrane Einheit (TM), eine Surface Unit (SU) und ein Leader Peptide (LP) hergestellt. Das LP bleibt im Gegensatz zu den Orthoretroviren mit dem Virion über Gag assoziiert (Lindemann et al., 2001) und bildet so eine Matrixprotein-ähnliche Konfiguration im Partikel. Analog zum Hbs-Ag (Hepatitis B-surface Antigen) des Hepatitis B-Virus (HBV), kann foamyvirales Env subvirale Partikel bilden (SVP).

Der Rezeptor für PFV, an den eine Adsorption der Viruspartikel über Env den Beginn der Replikation einleitet, scheint auf sehr vielen verschiedenen Zellen vorzukommen, da sich verschiedenste Zelltypen mit PFV infizieren lassen. Bisher ist dieser Rezeptor noch nicht identifiziert worden.

### 1.4.1.4 Akzessorische Proteine

Akzessorische Proteine bei FV sind Tas und Bet.

Als Transaktivator bei der Transkription wirkt das akzessorische Protein Tas über den internen Promotor (IP) sowie über den Promotor in U3, welcher ohne Tas inaktiv ist (Meiering et al., 2001; Rethwilm et al., 1991). Die Affinität zum IP ist höher, so dass bei geringen Tas-Mengen zunächst dieser aktiviert wird, was zur Produktion von Tas und Bet führt, bis bei ausreichender Tas-Konzentration schließlich auch der U3-Promotor aktiviert wird, was zur Produktion der prägenomischen RNA und der einfach und mehrfach gespleißten mRNAs führt, von welchen schließlich die viralen Proteine translatiert werden.

Bet könnte ähnlich wie vif bei HIV wirken und den zellulären Verteidigungsfaktor APOBEC3G inhibieren, welcher über die Degradation von viralen Nukleinsäuren eine Virusinfektion zu behindern vermag (Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005). Bet hatte in anderen Experimenten jedoch keinen APOBEC3G-protectiven Effekt (Delebecque et al., 2006), so dass seine Rolle weiterhin fraglich bleibt.

### 1.4.2 Das Genom

Foamyviren haben ein sehr großes Genom (PFV: 13.200 bp). Die Sequenz ist so konserviert, dass sich Vorläufer von FV nachweisen lassen, welche ca. 100 Millionen Jahre alt sind (Falcone et al., 1999; Katzourakis et al., 2009). Die RT, welche durch Ungenauigkeiten bei der Replikation als Motor der Evolution bei RV gilt, scheint in FV sehr genau zu arbeiten (Gärtner et al., 2009).

Das Genom ist komplex, d.h. es kodiert für zusätzliche Proteine. Die Gene hierfür befinden sich strangabwärts von env. Den Zugriff auf sie gewährt der interne Promotor (IP). Er ist eine Besonderheit der FV und existiert nicht bei anderen Retroviren. Das Genom enthält außerdem Sequenzen, die wichtig für die Partikelmorphogenese sind.

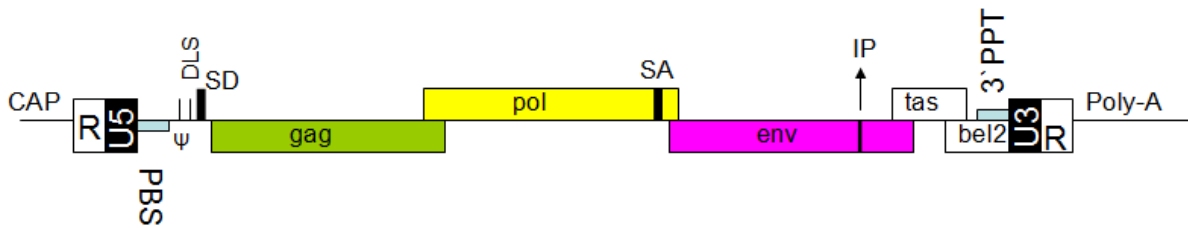


Abb. 6 Foamyvirales RNA-Genom

### 1.4.3 Replikation

FV weisen einige Besonderheiten in ihrer Replikation auf. Sie zeigen hier Gemeinsamkeiten mit den Hepadnaviren und den Orthoretroviren, so dass sie einen funktionalen Link zwischen diesen darstellen.

#### 1.4.3.1 Adsorption

Die Adsorption des Partikels scheint wie bereits erwähnt an einen fast ubiquitär existierenden Rezeptor zu erfolgen, da FV verschiedenste Zellen infizieren können (Hill et al., 1999; Lindemann und Goepfert, 2003; Meiering und Linial, 2001). Die Aufnahme in die Wirtszelle erfolgt mittels eines pH-abhängigen Endozytosewegs (Picard-Maureau et al., 2003). Der so entstandene PIC aus Capsid, viralem Genom und Enzymen wird entlang der Mikrotubuli zum Nukleus transportiert (Petit et al., 2003; Saib et al., 1997), dessen Kernmembran er nicht überwinden kann.

#### 1.4.3.2 Integration

Bei der mitotischen Zellteilung kann die Integration des Provirus erfolgen, nachdem der PIC zur Kernmembran transportiert wurde. Der PIC enthält schon vor Adsorption revers transkribierte DNA (englisch = copied DNA = cDNA). Die reverse Transkription erfolgt bei FV erst nach Partikelmorphogenese, was aber zur Folge hat, dass ein fertiges Virus bereits DNA enthält. Mit einem Verhältnis von DNA:RNA = 1:6 zeichnet sich ein infektiöses PFV-Partikel gegenüber all seinen Verwandten unter den Retroviren aus (Yu et al., 1999; Roy et al., 2003).

Orthoretroviren beispielsweise enthalten cDNA im Verhältnis DNA:RNA = 1 : 4 x 10<sup>5</sup>. Dies legt eine Abweichung in der von Orthoretroviren verwendeten Replikationsstrategie nahe und zeigt, dass das foamyvirale Genom durch DNA – nicht durch RNA – dargestellt wird.

Es gibt ebenfalls Daten dafür, dass bei FV eine Retrotransposition existiert, d.h. dass nach erfolgter später reverser Transkription DNA nochmals genutzt wird, um ins Wirtsgenom zu integrieren (Heinkelein et al., 2000). Die Häufigkeit der Retrotransposition scheint jedoch stark von Zelltyp und Art des FV abzuhängen (Heinkelein et al., 2003; Roy et al., 2003).

### 1.4.3.3 Transkription

Die Transkription des Provirus geht nicht wie bei den Orthoretroviren vom Promotor der 5'-LTR aus, sondern beginnt am IP. Der IP hat eine geringe basale Aktivität und gibt bei Beginn der Transkription Zugriff auf Tas = transactivator for spumaretroviruses, welches benötigt wird, um über den Promotor in U3 die Virustranskription zu starten. Tas muss von einem zellulären Enzym, der Histon-Acetyltransferase, acetyliert werden, da es ansonsten nicht an die Promotoren binden kann (Bodem et al., 2007). Über den IP sorgt es über einen positiven Rückkoppelungsmechanismus auch für mehr Expression von sich selbst. Bei ausreichender Konzentration gewährt Tas Zugriff auf die Strukturproteine, initial wird v.a. Bet transkribiert. Über den Promotor in U3, an welchen Tas mit mehr Avidität als Affinität zu binden scheint, entstehen letztlich die gespleißten RNAs für die Proteine und die prägenomische RNA.

### 1.4.3.4 Translation und Morphogenese

Die Translation von Gag erfolgt ausgehend von der prägenomischen RNA. Pol wird von einer eigenen gespleißten RNA translatiert, folglich entsteht kein wie bei anderen Retroviren übliches Gag-Pol-Fusionsprotein (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Löchelt und Flügel, 1996; Yu et al., 1996a). Die Capsidbildung erfolgt im Zytoplasma gemäß einer Typ B-/D-Morphogenese. Die prägenomische RNA wird über die  $\psi$ -Elemente in der Leader-Region in das Partikel aufgenommen. Bei Hepadna-Viren ist die RNA-Inkorporation Pol-abhängig (Bartenschlager und

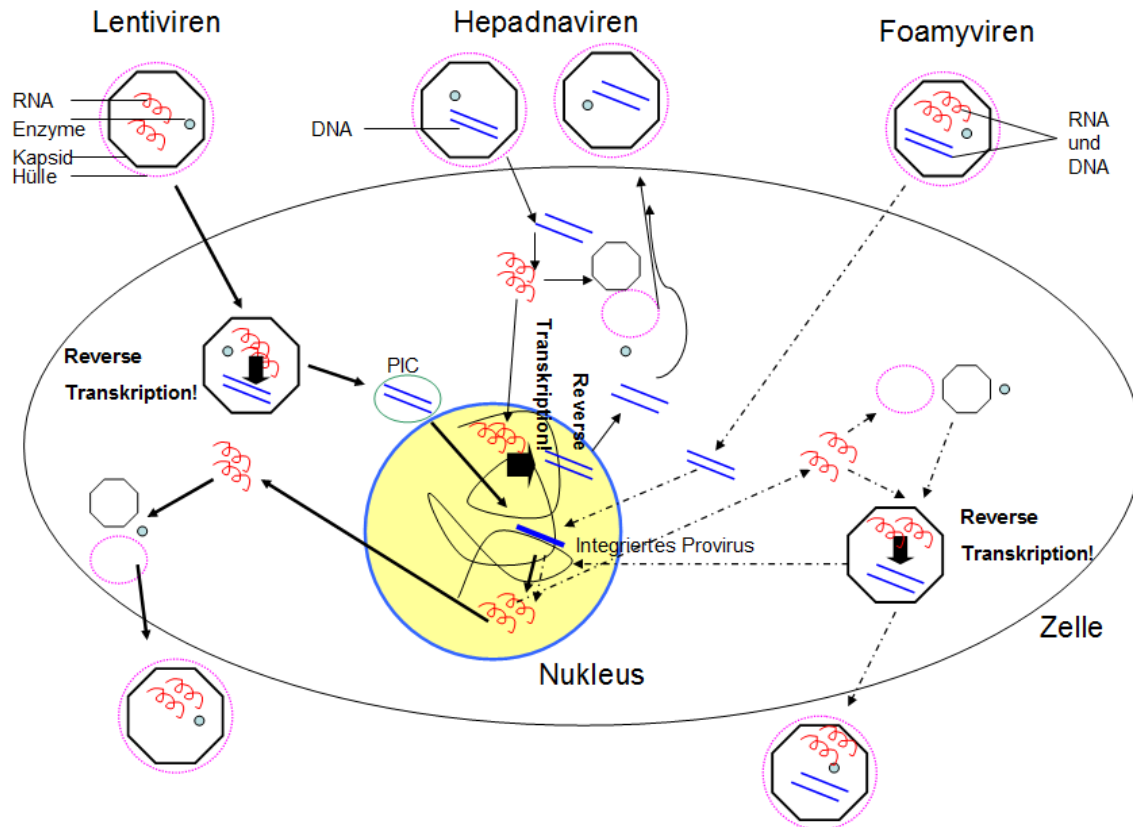


Schaller, 1992). Auch bei FV sind RNA und Pol zur Partikelinkorporation aufeinander angewiesen (Peters et al., 2005). Als alternativer Inkorporationsmechanismus für Pol wird die Interaktion mit GR-Boxen auf Gag diskutiert (Lee et al., 2008).

### 1.4.3.5 Reverse Transkription

Man spricht bei FV von einer späten reversen Transkription.

Wie bereits oben erwähnt, beginnt sie erst bei der Partikelmorphogenese der Viren (Moebes et al., 1997; Yu et al., 1999), und nicht nach Injektion des Erbguts in die Zelle wie bei allen anderen Retroviren. Deshalb enthalten fertige foamyvirale Partikel bereits DNA, welche nach Injektion in die Wirtszelle und Transport des PIC zur Kernmembran in der Metaphase integriert werden kann. Dies gleicht dem Replikationszyklus von Hepadnaviren, deren Genom durch dsDNA dargestellt wird. Das dsDNA-Genom wird ebenfalls bei der Partikelmorphogenese gebildet und kann nach Infektion einer neuen Zelle sogleich als Matrize verwendet werden. Bei den Hepadnaviren erfolgt jedoch keine Integration. Lentiviren hingegen integrieren ihr Genom, die reverse Transkription findet im Gegensatz zu FV und Hepadnaviren unmittelbar vor Bildung des PIC statt. Für einen Vergleich der unterschiedlichen Abläufe bei der Replikation s. Abb.7.



**Abb. 7 Vergleich der reversen Transkription bei Lenti-, Hepadna- und Foamyviren**

Links ist der Replikationszyklus eines Lentivirus dargestellt (dickere Pfeile). Das Genom wird durch RNA repräsentiert. Nach Eintritt des Capsids in die Zelle erfolgt die reverse Transkription (s. Blockpfeil). Der PIC kann den Nukleus auch außerhalb der Metaphase des Zellzyklus überwinden, die virale DNA wird ins Wirtsgenom integriert (s. integriertes Provirus). Von hier aus können virale RNAs gebildet werden, welche als prägenomische RNA sowie als Matrize für die Produktion von Virusproteinen dienen. Ein neues Viruspartikel kann sich bilden.

Mittig ist der Replikationszyklus eines Hepadnavirus abgebildet (dünnere Pfeile). Das Genom wird durch dsDNA dargestellt. Nach Injektion in die Zelle wird hiervon RNA synthetisiert, welche als Vorlage für die Translation der viralen Proteine dient. Die neue Virus-dsDNA wird partiell im Zytoplasma revers transkribiert und im Nukleus vervollständigt (s. Blockpfeil), welches als neu gebildetes Genom zusammen mit den viralen Proteinen neue Partikel bilden kann.

Rechts ist der Replikationszyklus eines Foamyvirus abgebildet (gestrichelte Pfeile). Es enthält bereits RNA und DNA. Die DNA kann direkt nach Injektion ins Wirtsgenom integriert werden (insofern die Zelle sich in der Metaphase befindet). Vom integrierten Provirus kann RNA transkribiert und von dieser können Proteine translatiert werden. Es erfolgt die Partikelbildung, erst während dieser erfolgt die reverse Transkription (s. Blockpfeil). Dies ähnelt also dem Zyklus von Hepadnaviren, auch bei diesen erfolgt zuerst Transkription/Translation, bevor die reverse Transkription statt findet. Der Unterschied ist, dass Hepadnaviren nicht ins Wirtsgenom integrieren – diesen Schritt haben FV aber mit den Lentiviren gemein.

Den Initiationspunkt für die Replikation des gesamten Genoms bildet wie bei allen Retroviren die an der Primerbindungsstelle (PB) gebundene tRNA, die im Falle der FV eine tRNA<sup>Lys</sup> (mit gebundenem Lysin) darstellt (Maurer et al., 1988). Für die Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese dient der Polypurintrakt 5´ von der 3´-LTR, so wie bei allen anderen Retroviren auch. FV weisen zusätzlich interne PPT in pol auf (Kupiec et al., 1988; Tobaly-Tapiero et al., 1991).

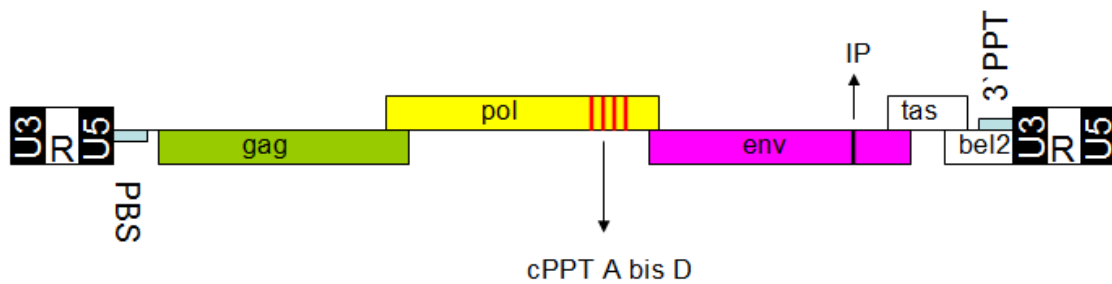
### 1.4.4 Die Polypurintrakte

Als Polypurintrakt wird ein am 3´Ende der viralen RNA befindliches Element aus einer Abfolge von Purinbasen (Adenosin und Guanosin) bezeichnet. Alle Retroviren sind zur Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese auf diesen 3´-PPT angewiesen (Ratray et al., 1989; Smith et al., 1984). Die Sequenz des 3´-PPT ist von Retrovirus zu Retrovirus unterschiedlich. Der 3´-PPT ist essentiell für die reverse Transkription (u.a. Finston et al., 1984; Fuentes et al., 1996; Huber et al., 1990; Luo et al., 1990; Mitra et al., 1982; Omer et al., 1984). So sind Foamyviren mit deletiertem PPT 3´-replikationsinkompetent (Peters et al., 2005).

HIV weist zusätzlich zum 3´PPT einen sequenzidentischen cPPT (central PPT, englisch = zentraler PPT) in pol auf. Dieser inhibiert analog zum 3´PPT die Degradation der RNA während der Minusstrang-DNA-Synthese. Seine Mutation führt zu einem verspäteten Replikationsmaximum, sowie zu niedrigeren Virustitern in transfizierten Zellkulturen, weshalb angenommen wird, dass er einen Zweit-Initiationsort der reversen Transkription darstellt (Charneau und Clavel, 1992).

Zusätzliche PPT wurden auch im Pflanzen-pararetroviralen Blumenkohl-Mosaik-Virus beschrieben, wo deren Mutation zu einer gestörten Plusstrang-Synthese führte, da die PPT als Primer derselben wichtig zu sein scheinen (Noad et al., 1998).

FV enthalten vier weitere purinreiche Sequenzen im IN-kodierenden Abschnitt von pol (Kupiec et al., 1988; Tobaly-Tapiero et al., 1991). Von diesen vier Elementen A, B, C und D ist nur das Element D sequenzidentisch mit dem 3´PPT.

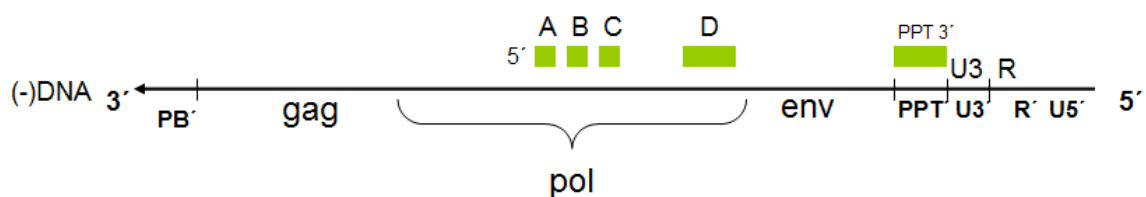


**Abb. 8 Foamyvirales Provirus**

Die vier purinreichen Sequenzen (hier als cPPT A bis D bezeichnet) sind im IN-kodierenden Abschnitt von pol enthalten. Das Element D ist sequenzidentisch mit dem 3'PPT.

Da der cPPT bei HIV die Plusstrang-Synthese an einem zweiten Ort initiiert, könnten dies auch die vier purinreichen Elemente von PFV tun.

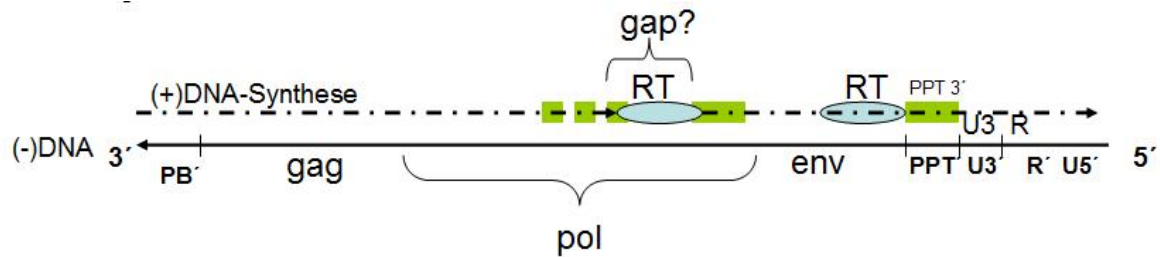
Die reverse Transkription wäre folgendermaßen vorstellbar: Analog zu Abb. 3 würde zunächst die tRNA<sub>Lys</sub> an der PB als Initiationsort der Minusstrang-DNA verwendet werden. Nach Bildung eines zur RNA komplementären DNA-Stranges würde der RNA-Strang durch die RNase H-Aktivität der RT verdaut werden und der 3'PPT sowie die vier Elemente würden als Primer nach RNA-Verdau übrig bleiben (s. Abb. 7).



**Abb. 9 RNA-Reste nach RNase H-Verdau.**

Die Vierecke A-D bezeichnen die nicht durch die RNaseH-Aktivität der RT abgebauten purinreichen Sequenzen bzw. Elemente A-D.

An den vier Elementen könnte sich die RT erneut anlagern und nun komplementär zur Minus-DNA den Plusstrang synthetisieren (s. Abb. 7).



**Abb. 10 Plusstrang-Synthese von den purinreichen Elementen und dem 3' PPT ausgehend**

Das entstandene „gap“ am 5'-Ende des Elements D könnte durch die Anlagerung der RT bedingt sein.

Die unintegrierte cDNA weist angrenzend an das Element D eine Lücke, ein *gap*, auf. Die Existenz dieses *gap*s wurde als Indikator für eine mögliche Benutzung des Elements als Zweit-Initiationsorts für die Plusstrang-DNA-Synthese angesehen (Kupiec et al., 1988; Tobaly-Tapiero et al., 1991), da es der Anlagerungslänge der RT entsprechen könnte (s. Abb. 7). Insbesondere weil FV das größte Genom unter den Retroviren besitzen, wäre eine doppelte Initiation nützlich für eine effektive Replikation.

Eine doppelte Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese könnte sich demnach auf Grund der Beschleunigung des Replikationszykluses als vorteilhaft erweisen, wie auch bereits für HIV diskutiert wurde (Charneau und Clavel et al., 1992; Hungnes et al., 1992). Andererseits weisen Epsilonretroviren, welche ein größeres Genom als Lentiviren besitzen und somit noch eher von einer doppelten Replikation profitieren würden, keinen internen PPT auf (Goff et al., 2007).

In HIV entsteht während der Replikation kein *gap*, sondern ein in der cPPT-Region überlappend synthetisiertes DNA-Stück von ca. 100 bp Länge, wobei der am 5'-Ende beginnende Plusstrang an einer CTS (central termination sequence, englisch = zentraler Stopp-Sequenz) endet. Diesem *DNA-flap* wurde eine Rolle im Kernimport von HIV zugerechnet, da Mutation des CTS zu erniedrigter Konzentration von viraler DNA im Kern führte (Zennou et al., 2000).

In Retrotransposons der Hefe (Element Ty-1), welche als evolutionäre Verbindung zu den Retroviren angesehen werden, existieren ein PPT und eine CTS wie in HIV. Die Plusstrang-Synthese bringt zwei Einzelstränge hervor, da der PPT als

Primer genutzt wird. Wie bei HIV entsteht ein *flap*, welches jedoch nicht essentiell für die Transposition des Elements zu sein scheint (Heyman et al., 2003).

Bisher wurde das foamyvirale *gap* nicht näher charakterisiert – um was für eine Art von Plusstrang-Diskontinuität es sich handelt und ob eine *flap*-Struktur wie bei HIV vorliegt, ist nicht bekannt. Da FV sich nicht-teilende Zellen nicht infizieren können (Bieniasz et al., 1995; Patton et al., 2004; Trobridge et al., 2004), muss ein hypothetisches *gap* / *flap* bei FV für etwas anderes als den Kernimport nützlich sein.

### 1.5 Fragestellung

Das Verständnis der Replikation von PFV ist wichtig, um effektive Vektoren für die Gentherapie zu entwickeln. Elemente zu identifizieren, welche für die Replikation notwendig sind, ist hierbei von besonderem Interesse. Der cPPT in HIV ist ein Element, welches die Replikation zu beschleunigen vermag. Welcher Natur dieser Effekt ist (ob die doppelte Initiation der Plusstrang-Synthese, ein erleichterter Kernimport oder ein weiterer Effekt von Belang sind), ist unklar.

Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob die vier purinreichen Elemente in PFV die virale Replikation analog beschleunigen oder erleichtern können – und ob umgekehrt ihre Mutation die Replikation so einschränken, dass man davon ausgehen kann, ohne sie keine effektiven Vektoren konstruieren zu können. Hierzu wurden verschiedene Mutationen in die vier Elemente eingeführt und die Replikationseffizienz in verschiedenen Vektorsystemen getestet. Insbesondere wurde der Einfluss mutierter Elemente auf die Transduktionseffizienz eines bereits etablierten Vektors (pMD9) untersucht.

Eine weitere Zielsetzung war, die Art der auf der Plusstrang-DNA auftretenden Diskontinuität respektive des *gaps*, sowie Start- und Endpunkt zu identifizieren und Hinweise auf eine eventuell vorhandene *flap*-Struktur zu erhalten. Als Frage stellte sich v.a., wozu das *gap* / *flap* bei PFV dient.

## 2 Material

### 2.1 Enzyme

<i>CIAP</i> (calf intestine alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
<i>Pwo-Polymerase</i>	Peqlab
<i>Restriktionsenzyme</i>	NEB, MBI-Fermentas
<i>T4-DNA-Ligase</i>	MBI-Fermentas

### 2.2 Antibiotika

Ampicillin  
Penicillin  
Streptomycin  
G418 (Geneticin)  
Stockkonzentration je 100 mg/ml

### 2.3 Kompetente Bakterien

<i>E.coli JM109</i>	Invitrogen (Herstellung in Arbeitsgruppe)
<i>E.coli DH5<math>\alpha</math></i>	Stratagene (Herstellung in Arbeitsgruppe)

### 2.4 Zelllinien

<i>BHK LTR lacZ</i>	BHK-Zellen mit lacZ-Gen unter der Kontrolle der PFV-LTR (Schmidt & Rethwilm, 1995)
<i>293T</i>	Humane embryonale Nierenzellen mit SV40 T-Antigen (DuBridge et al., 1987)
<i>HT1080</i>	Humane Fibrosarkomazelllinie ATCC: CCL-121

## 2.5 Größen- und Längenstandards

### DNA

<i>λ-HindIII-Marker</i>	Verdau von λ-DNA mit HindIII
<i>λ-PstI-Marker</i>	Verdau von λ-DNA mit PstI
λ-DNA für Marker	Roche-Boehringer

### Proteine

<i>PageRuler™</i>	Fermentas
-------------------	-----------

## 2.6 Antikörper

### MABs = Monoclonal Antibodys

<i>Maus αPFV Gag: Sgg1</i>	Heinkelein et al., 2002a
<i>Maus αPVF Integrase: 3E11</i>	Imrich et al., 2000
<i>Maus αPFV Reverse Transkriptase 15E10</i>	Imrich et al., 2000
<i>Ziege αMaus Immunoglobuline/HRP</i>	DakoCytomation, DK

## 2.7 Plasmide

### 2.7.1 Retrovirale Vektoren

<i>pMD9</i>	Heinkelein et al., 2002a
-------------	--------------------------

### 2.7.2 Expressionsplasmide

<i>pcHSRV2</i>	Expressionsplasmid für das PFV-Provirus, CMV-getrieben (Moebes et al., 1997)
<i>pCpol2</i>	Heinkelein et al., 1998
<i>pClgag2</i>	Heinkelein et al., 2002a
<i>pCenv1</i>	Expressionsplasmid für env, CMV-getrieben (Fischer et al., 1998)
<i>pgpCTG</i>	pCgp1 (Fischer et al., 1998) mit Mutation des <i>pol</i> ATG zu CTG (Enssle et al., 1996)



*pcHSRV2M54*

Expressionsplasmid für das PFV-Provirus mit mutiertem pol-Startcodon aus pgpCTG  
Invitrogen

*pcDNA3*

## 2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei Invitrogen bestellt und bei -20 °C gelagert, nachdem sie auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt wurden.

In der unten stehenden Tabelle ist die Leserichtung 5´ nach 3´. Alle

Oligonukleotide binden in PFV.

### 2.8.1 Mutationssyntheseprimer

Diese Primer wurden verwendet, um Mutationen in die Polypurintrakte einzuführen. In Großbuchstaben ist die purinreiche Sequenz dargestellt, die fett gedruckten Basen geben die Mutationen an.

**Tab. 2: Mutagenese-Primer**

Primer	Sequenz	Bemerkung
#1973	cctttgctgaatGGGCCAAGGA <b>ACGC</b> Gtatacattgg	Mutagenese Element A-, sense
#1974	ccaaatgtatacc <b>GCG</b> TTCTTGCC <b>C</b> attcagcaaagg	Mutagenese Element A-, antisense
#1985	cctttgctgaatGGGCC <b>CG</b> GA <b>ACGC</b> Gtatacattgg	Mutagenese Element A+, sense
#1986	ccaaatgtatacc <b>GCG</b> TT <b>CG</b> GGCC <b>C</b> attcagcaaagg	Mutagenese Element A+, antisense
#1977	cccaaagtagtggaaggt <b>CGAACG</b> CAAAAAtagtgatataaaacg	Mutagenese Element B-, sense
#1978	gcttttatatcactaTTTTT <b>GCG</b> TT <b>G</b> accttaccactactttgggg	Mutagenese Element B-, antisense
#1983	gtagtggaaggt <b>CGAACG</b> CAA <b>ACAG</b> agtgatataaaacgac	Mutagenese Element B+, sense
#1984	ctcgtttatatcacact <b>CTG</b> TTT <b>GCG</b> TT <b>G</b> accttaccactac	Mutagenese Element B+, antisense
#1969	caagatacactgactgacc <b>GCGA</b> AGAAGAActttctc	Mutagenese Element C-, sense
#1970	gaggaaagTTCTTCTT <b>GCG</b> gggtcaagtcaagtgtatcttg	Mutagenese Element C-, antisense
#1981	cactgactgacc <b>GCGACGACGAC</b> ctttctcttttacag	Mutagenese Element C+, sense

## Material

#1982	ctgtaaagagaaaag <b>GTCGTCGTCGT</b> gggtcaagtcaagtg	Mutagenese Element C+, antisense
#1967	ggtccAGGAG <b>CGCG</b> Tggctaggcctgc	Mutagenese Element D-, sense
#1968	gcaggcctagcca <b>CGCG</b> CTCCTggacc	Mutagenese Element D-, antisense
#1979	gttgccaattggtc <b>AACGAGCGCG</b> Tggctaggcctgc	Mutagenese Element D+, sense
#1980	gcaggcctagccac <b>GCGCTCGTT</b> gaccaattggccaac	Mutagenese Element D+, antisense

## 2.8.2 Sequenzierungsprimer

Diese Primer wurden verwendet, um nach Mutation erhaltene Plasmide zu sequenzieren.

**Tab. 3: Sequenzierungsprimer**

#1957	ctccatcagcaggatag	Sequenzierung/ Amplifikation von pol
#639	aagcaataatgctggcatggaata	Sequenzierung von pol
#453	ttagaataggaccagaggcttg	Sequenzierung von pol
#1844	ccaccttactaccacttgggg	Sequenzierung von pol; reverse primer
#1845	tttttagcgctagcaagtgtatcttgattgcaaag	Sequenzierung von pol; reverse primer
#524	cctcatgcgctttattcatttttcc	Sequenzierung von pol; reverse primer
#677	ctggatatagtcacaaagcgtgaaaccaa	Sequenzierung von pol; reverse primer
#312	aaattagcattattagcaatgttttctg	Sequenzierung/ Amplifikation von pol; reverse primer

## 2.9 Kits

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

ECL Western Blotting Detection Reagents

Geneclean III Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

NucleoBond PC500

PolyFect Transfection Reagent

Qiaquick PCR Purification Kit

TOPO-Klonierungskit

Applied Biosystems

Amersham Biosciences

Q BIOgene

Qiagen

Machery & Nagel

Qiagen

Qiagen

Invitrogen

## 2.10 Sonstige Materialien

Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Hybond-ECL-Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences
Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
QiaShredder	Qiagen
Röntgenfilme X-Ray Retina XBD	Fotochemische Werke GmbH
Sterilfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	Schleicher & Schuell

## 2.11 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Bestandteile in a.d. gelöst.

### 2.11.1 Bakterienkultur

<b>5x LB-Medium</b>	LB Broth Base Lennox L	
	(von Invitrogen #12780-029)	100 g
	NaCl	25 g
	α-D-Glucose	5 g
	Aqua dest (a.d.)	1000 ml
	Überführung in Autoklaven	
<b>LB-Agar</b>	LB Broth Base Lennox L	20 g
	Agar	20 g
	NaCl	5 g
	a.d.	1000 ml
	Überführung in Autoklaven	
	Abkühlung auf unter 60°C	
	Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (hier Ampicillin)	
	Gießen in Petrischalen, erstarren lassen	
Aufbewahrung bei 4°C		

<b>Ampicillin</b>	Ampicillin-Natriumsalz Durch 0,2 µm-Filter steril filtrieren	100 mg/ml
-------------------	---	-----------

### 2.11.2 DNA-Klonierung und –analyse

<b>50 x TAE</b>	Tris	2 M
	Konzentrierte Essigsäure	5,71%
	EDTA pH 8,0	50 mM

<b>6 x BPB (DNA-Probenpuffer)</b>	in 100 ml a.d.:	
	Bromphenolblau	0,125 g
	Sucrose	40 g
	Überführung in den Autoklaven	

<b>3 M-Natriumacetat pH 5,4</b>	Natriumacetat	3 M
	pH 5,4 mit konzentrierter Essigsäure einstellen	
	Überführung in den Autoklaven	

<b>Solution 1 für Minis</b>	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
	Überführung in den Autoklaven	

<b>Solution 2 für Minis</b>	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %

<b>Solution 3 für Minis</b>	Natriumacetat pH 5,2 mit konzentrierter Essigsäure einstellen Überführung in den Autoklaven	3 M
<b>TE/RNase</b>	TE RNaseA	0,1x 100 µg/ml
<b>Tris/MgCl<sub>2</sub></b>	Tris-HCl pH 9,0 MgCl <sub>2</sub> Überführung in den Autoklaven	200 mM 5 mM

### 2.11.3 Zellkultur

#### **MEM (=Minimal Essential Medium)**

MEM (im Haus hergestellt: 9g/l von Invitrogen #41500-083 + 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	
FCS (Biochrom, Berlin)	5-10%
Glutamat	0,03%
Penicillin	100 mg/l
Streptomycin	100 mg/l

#### **DMEM (=Dulbeccos Modified Eagle Medium)**

D-MEM (von Invitrogen #41966-29)	
FCS (Biochrom, Berlin)	10%
Glutamat	0,03%
Penicillin	100 mg/ml
Streptomycin	100 mg/ml

#### **ATV (im Haus hergestellt)**

NaCl	137 mM
KCl	5,4 mM
D-Glucose	5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	70 mM

---

	Trypsin	500 mg/l
<b>G418</b> (=Geneticin)	Stock von PAN-Systems	100 mg/ml

#### 2.11.4 LTR lacZ-Titration

<b>Fixierlösung</b>	Glutaraldehyd in PBS	0,5 %
<b>Färbelösung</b>	Kaliumferrocyanid (400 mM Stock)	4 mM
	Kaliumferricyanid (400 mM Stock)	4 mM
	MgCl <sub>2</sub> (200 mM Stock)	2 mM
	X-Gal (20 mg/ml Stock in Dimethylformamid)	0,4 mg/ml

### 2.11.5 HBS-Transfektion

**CaCl<sub>2</sub>** CaCl<sub>2</sub> 2 M  
Durch 0,2 µm-Filter steril filtrieren

**2xHBS** NaCl 8,18 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g  
Hepes 5,95 g  
pH 7,05 bis 7,10 einstellen  
auffüllen mit a.d. auf 500 ml  
Durch 0,2 µm-Filter steril filtrieren

### 2.11.6 FACS

**FACS-Puffer** BSA 0,1%  
Natriumazid 0,02%  
in PBS

**500 mM Natriumbutyrat** Natriumbuttersäure 500 mM  
In sterilem PBS  
Durch 0,2 µm-Filter steril filtrieren

### 2.11.7 Arbeit mit Proteinen

**RIPA-Puffer** Tris-HCl pH 7,5 20 mM  
NaCl 300 mM  
Natrium-Deoxycholat 1 %  
Triton X-100 1 %  
SDS 1 %  
Lagerung bei 4°C

**2xPPP (Probenpuffer für Proteinproben)**  
Tris-HCl pH 6,8 125 mM



	SDS	4 %
	Glycerin	23,25 %
	β-Mercaptoethanol	10 %
	Bromphenolblau	0,01%
<b>Gelpuffer</b>	Tris base	3 M
	SDS	0,3 %
	pH 8,45 mit HCl einstellen	
<b>5 x Kathodenpuffer</b>	Tris	500 mM
	Tricine	500 mM
	SDS	0,5 %
<b>10 x Anodenpuffer</b>	Tris-HCl pH 8,9	2 M
<b>Blotpuffer</b>	Tris	50 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	0,037 %
	Methanol	20 %
<b>PBS-Tween</b>	Tween 20 in PBS	0,5 %

### 2.11.8 Standardlösungen und Puffer

<b>1 M Tris pH 8,0</b>	Tris	1 M
	pH 8,0 mit HCl einstellen	
	Überführung in den Autoklaven	
<b>10 % SDS</b>	SDS	10 %
	pH 7,2 mit HCl einstellen	
<b>PBS - (Herstellung im Haus)</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM

---

<b>PBS + (Herstellung im Haus)</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
	CaCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM
<b>TE pH 8,0</b>	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
<b>0,5 M EDTA pH 8,0</b>	EDTA	500 mM
	pH 8,0 mit NaOH einstellen	
	Überführung in den Autoklaven	

## **3 Methoden**

### **3.1 Klonierung, Nachweis und Aufreinigung von DNA**

#### **3.1.1 Transformation**

Bei einer Transformation wird freie DNA in Bakterien eingebracht, welche ein natürliches Amplifikationssystem darstellen. Bakterien müssen dazu befähigt werden, DNA aufzunehmen, sie müssen „kompetent“ gemacht werden. Die verwendeten E.coli-Stämme DH5 $\alpha$  und JM109 wurden hierzu in CaCl<sub>2</sub> aufgenommen, was die Zellwand und Zellmembran durchlässiger macht. Die kompetenten Bakterien werden bei -80°C gelagert.

##### **3.1.1.1 Kurze Transformation**

Die kurze Transformation (Pope und Kent, 1996) wurde hier verwendet, um aus bereits vorliegenden DNA-Proben neue Minis und Maxis (s.u.) herzustellen. Es werden relativ hohe Mengen an DNA benötigt, weshalb die Methode ungeeignet für Ligationen ist, bei denen die DNA-Menge gering ist. JM109-Bakterien, die relativ viel Plasmid-DNA produzieren, wurden auf Eis aufgetaut. 100  $\mu$ l Bakterien wurden mit 1  $\mu$ g DNA zusammen gegeben und für ca. 10 min auf Eis gestellt. Nach Ausstreichen auf vorgewärmten Agar-Platten ließ man die Proben über Nacht im Brutschrank bei 37°C stehen. Die gewachsenen Kolonien konnten am nächsten Tag zur Mini- oder Maxi-Präparation weiter verwendet werden.

### 3.1.1.2 Lange Transformation

Die lange Transformation wurde verwendet, um DNA aus Ligationen in Bakterien einzubringen, welche anschließend zur Präparation von kleinen oder großen Mengen DNA (s.u.) verwendet werden konnten.

Hierzu wurden DH5 $\alpha$ -Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu 100  $\mu$ l Bakterien wurden 20  $\mu$ l Ligationsansatz gegeben und die Proben für 20 min auf Eis gestellt. Um die DNA-Aufnahme zu erleichtern, setzte man die Bakterien einem 90-sekündigen Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C aus. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde 1 ml 1xLB in die Eppendorfgefäße hinzu gegeben und die Proben im Schüttler bei 37°C für ca. 60 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde danach bei 5000 rpm für 3 min zentrifugiert und 800  $\mu$ l des Überstands abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und die Suspension auf vorgewärmten Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien konnten am nächsten Tag zur DNA-Präparation weiter verwendet werden.

### 3.1.1.3 Spezielle Transformation nach site directed Mutagenese

s.dort

## 3.1.2 DNA-Präparation

### 3.1.2.1 DNA-Präparation in kleiner Menge (Mini-Präparation)

Die Mini-Präparation dient der Gewinnung kleiner Mengen von DNA aus Bakterienkulturen. Die relativ kleinen Ansätze ermöglichen eine Gewinnung von vielen Proben, die mit Restriktionsenzymverdau auf Vorhandensein der gewünschten DNA analysiert werden können. Die im Verdau positiven Mini-Proben können als Vorlage für reinere DNA-Präparationen in großer Menge (Maxis) verwendet werden.

Zu 2 ml 1xLB-Medium unter Zugabe von 2 µl Ampicillin wurden mittels sterilem Holzstäbchen je eine Kolonie von einer Agar-Platte mit zuvor transformierten Bakterien gegeben. Ampicillin wurde zugesetzt, da die eingeführten Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen zur besseren Selektion gegen die Bakterien enthalten, die nicht das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten. Bei 37°C wurden die so präparierten Reagenzgläser über Nacht (idealerweise 16 Stunden) geschüttelt. Anschließend wurde ca. 1 ml der Bakteriensuspension aus jedem Reagenzglas in ein Eppendorf-Gefäß umgefüllt, um bei 14.000 rpm 1 min lang zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt und das am Boden haftende Pellet in 100 µl Solution 1 mittels Vortexen resuspendiert. Sofort danach wurden 100 µl Solution 2 hinzugegeben. Nach erneutem Vortexen erfolgte hierdurch in etwa 5 min Reaktionszeit die alkalische Zell-Lyse der Bakterien, bei der Zellwände zerstört, Proteine und die chromosomale DNA denaturiert wurden. Die Plasmid-DNA, welche die gewünschte DNA darstellen sollte, wurde nur teilweise denaturiert. Nach Zugabe von 150 µl Solution 3 wurden die Proben invertiert, dann für mindestens 10 min (und maximal 20 min) auf Eis gestellt. Solution 3 neutralisierte den pH-Wert im Reaktionsgefäß und führte zur Aggregation der Proteine und der denaturierten chromosomalen DNA. Anschließend wurde der so entstandene weiße Niederschlag bei 14.000 rpm 15 min lang abzentrifugiert.

In neue Eppendorf-Gefäße wurde je 1 ml 100%-iger Ethanol pipettiert, zu dem der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand aus der Zentrifugation gegeben wurde. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm erhielt man ein Plasmid-DNA-Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm, nach welcher der Überstand mittels Vakuumpumpe abgesaugt wurde. Nach dem Trocknen der Proben bei 37°C für mindestens 20 min und max. 30 min wurden die DNA-Pellets in 50 µl TE-RNase resuspendiert und bei Raumtemperatur etwa eine halbe Stunde stehen gelassen. Vor dem Gebrauch der Minis wurden diese auf- und abpipettiert, um das Pellet vollständig zu lösen.

### 3.1.2.2 DNA-Präparationen in großer Menge (Maxi-Präparation)

Die Maxi-Präparation dient der Gewinnung von hochreiner DNA aus Bakterienkulturen, die im Gegensatz zu DNA aus Mini-Präparationen zu Transfektionen (s.u.) benutzt werden kann.

Unter Verwendung des Kits *Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500* von Macherey-Nagel erhielt man eine Ausbeute von bis zu 500 µg pro Probe.

250 ml 1xLB-Medium wurden für jede Probe mit 250 µl Ampicillin versetzt, bevor mit einem Holzstäbchen eine Bakterienkolonie von einer am vorherigen Tag beimpften Agar-Platte gepickt und hinzugegeben wurde. Die Proben wurden über Nacht bei 180 rpm und 37°C geschüttelt.

Am nächsten Tag wurden die Proben in geeigneten 500 ml-Zentrifugenbechern bei 5000 rpm und 4°C 13 min zentrifugiert (Sorvall GS3-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 12 ml Puffer S1, welcher RNaseA enthält, gelöst. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S2 und mehrmaligem invertieren, wodurch in ca. 5 min die alkalische Lyse erfolgte, wurden die Proben mit 12 ml neutralisierendem Puffer S3 versetzt und für ca. 20 min auf Eis gestellt. Schließlich wurden die Proben durch einen befeuchteten Filter gegossen, der die Zelltrümmer abfing. Das Eluat wurde durch eine zuvor mit 5 ml Puffer N2 equilibrierte Säule gegossen, welche die DNA zurückhielt. Nach Waschen mit ca. 30 ml Puffer N3 wurden die Säulen auf 50 ml-Falcon-Gefäße gesteckt und die DNA mit 10 ml Puffer N5 gelöst. Durch Zugabe von 5 ml Isopropanol erfolgte in 10 min die Präzipitation der DNA, welche dann durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 30 min pelletiert wurde. Nach Verwerfen des Überstandes und waschen mit 5 ml 70%igem Ethanol wurden die Proben erneut bei 4000 rpm und Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt, die Proben bei 37°C für ca. 20 min getrocknet und hernach in ca. 200 µl a.d. resuspendiert. Vor dem Gebrauch der Maxis wurden diese für mindestens 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und ferner auf- und abpipettiert, um das Pellet vollständig zu lösen.

Maxis wurden probeverdaut und photometrisch vermessen, um einheitlich auf 1 µg/µl konzentriert zu werden.

### 3.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Dieses Verfahren beruht auf der konzentrationsabhängigen Extinktion einer DNA-Probe von UV-Licht bestimmter Wellenlänge. Die Berechnung erfolgt aus einer Ableitung des Lambert-Beerschen-Gesetzes:

$$C = \lambda \times V \times F$$

Wobei c: Konzentration der Probe ( $\mu\text{g/ml}$ )

$\lambda$ : optische Dichte bei bestimmter Wellenlänge des UV-Lichts (hier 260 nm)

V: Verdünnungsfaktor

F: Extinktionskoeffizient (Stoffkonstante, für dsDNA: 50  $\mu\text{g/ml}$ )

Die zu vermessende Probe wurde in einer Einmal-Plastikküvette mit einem beliebigen Volumen a.d. verdünnt (zwischen 100  $\mu\text{l}$  und 300  $\mu\text{l}$ ) und im Photometer gegen eine Referenzprobe gleichen Volumens mit reinem a.d. vermessen. Das Photometer errechnete nach Eingabe des Verdünnungsfaktors und des Probeninhalts (dsDNA) automatisch die Konzentration. Mit Hilfe des Quotienten (optische Dichte bei 260 nm dividiert durch optische Dichte bei 280 nm) ließ sich die Reinheit einer Probe errechnen. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte > 2,0 sprechen für eine Verunreinigung mit RNA, Werte < 1,8 für eine mit Proteinen und aromatischen Substanzen. Auch dies wurde vom Photometer automatisch berechnet.

### 3.1.4 DNA-Reinigung (Phenol-Chloroform-Fällung und Ethanol-Präzipitation)

Diese Methode wurde verwendet, um im Photometer als verunreinigt gemessene Maxi-Proben von Proteinen und Salzen zu reinigen.

### 3.1.4.1 Phenol-Chloroform-Fällung

Mit dieser Fällungsmethode können DNA-Proben von Proteinen gereinigt werden. Die verunreinigte DNA wurde mit a.d. auf 500 µl aufgefüllt, danach 500 µl Phenol hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Die obere, wässrige, die DNA-enhaltende Phase, wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt, abermals bei 14.000 rpm für 4 min zentrifugiert und danach in die Ethanol-Präzipitation überführt.

### 3.1.4.2 Alkoholische Präzipitation

Mit dieser Methode können DNA-Proben von Salzen gereinigt oder höher konzentriert werden. Nach Zugabe von 1/10-Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2 bis 5,4) und 6/10-Volumen Isopropanol erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Der durch 15minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm gewonnene, die DNA-enhaltende Bodensatz, wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 1 ml 70%igem Ethanol überschichtet, erneut bei Raumtemperatur 5 min inkubiert und schließlich bei 13.000 rpm in 15 min pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes und Trocknen des Pellets bei 37°C für ca. 15 min konnte die so aufgereinigte DNA in 20 µl a.d. aufgenommen werden.

### 3.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen oder Restriktionsenzyme sind Enzyme, welche die DNA nach charakteristischen Sequenzabfolgen spalten. Bakterien benutzen sie beispielsweise zur Abwehr von Viren, deren DNA so zerstört werden kann, wobei die bakterielle DNA durch bestimmte Mechanismen, u.a. Methylierung, vor Verdau geschützt ist (Hattman et al., 1973; Schlagman et al., 1976).



Möchte man also eine DNA-Probe auf Vorhandensein einer gewünschten, bekannten Basensequenz prüfen oder an einer bekannten Basenfolge schneiden, lässt sich diese mit geeignetem Enzym in charakteristische Fragmente spalten, welche dann mittels Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden können. Die DNA wurde mit Restriktionsendonucleasen im Überschuss verdaut, weil so eine unvollständige Spaltung vermieden wurde. Jedes Enzym wurde bei vom Hersteller angegebenem Temperaturoptimum und im geeigneten Puffer (z.T. unter Supplement-Verwendung) verwendet. Doppelverdau wurden entweder in einem zu beiden Enzymen passenden Puffer oder einzeln durchgeführt. Der Probeverdau diente der Analyse der gewonnenen DNA, der Klonierungsverdau zur Gewinnung einzelner DNA-Fragmente, die später neu miteinander kombiniert werden sollten.

**Tab. 4: Restriktionsverdau**

<i>Probeverdau</i>	<i>Klonierungsverdau</i>
1 µg DNA	5 – 10 µg DNA
2 µl Puffer (1:10)	5 µl Puffer (1:10)
5 U Enzym	20 U Enzym
Endvolumen: 20 µl	Endvolumen: 50 µl

Auf das Endvolumen wurde mit a.d. aufgefüllt. Der Verdau dauerte je nach Herstellerangaben zwischen 1,5 h und 16 h.

### 3.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Mit der Agarosegel-Elektrophorese können Nukleinsäurefragmente verschiedener Größen sichtbar gemacht werden, was hier zur Kontrolle von Mini- und Maxiprobe auf Vorhandensein der gewünschten DNA und zur weiteren Verarbeitung von Klonierungsverdau verwendet wurde.

Unter einer bestimmten Potentialdifferenz, bedingt durch die negative Eigenladung (Nukleinsäuren enthalten Phosphatgruppen), wandern die DNA-Fragmente zum positiven Pol, wobei kleinere Fragmente schneller wandern als große. So erhält man im UV-Licht, welches das an die DNA gebundene Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt, ein charakteristisches Bandenmuster.

Ein 1%iges-Agarosegel wurde durch Lösen von 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer, kurzem Aufkochen, Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid und 30-minütigem Auspolymerisieren in geeignetem Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm hergestellt. Zur Detektion von kleinen Fragmenten wurden höherprozentige Gele (bis 2%ige Agarosegele), von größeren niederprozentige (bis 0,8%ige Agarosegele) verwendet. Das Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt. In jede Tasche wurden nun gleiche Mengen der Proben pipettiert, wobei die erste und letzte Tasche mit einem Marker versetzt wurde (i.d.R. 10 µl λHindIII-DNA und 10 µl λPstI-DNA). Für einen Probeverdau wurden 24 µl aufgetragen, enthaltend 1 µg DNA (µl unterschiedlich, entsprechend der Konzentration der Probe) und 4 µl 6XPB – aufgefüllt mit a.d.. Für einen Klonierungsverdau wurden Ansätze von ca. 30 µg DNA aufgetragen. Die Fragmente wurden nun in mindestens 2 h unter einer Potentialdifferenz von ca 80 V aufgetrennt. Bei einem Klonierungsverdau, bei welchem die DNA-Fragmente weiter verwendet werden sollten, wurde einerseits eine niedrigere Potentialdifferenz und längere Laufzeiten gewählt, was eine sauberere Fragmentauftrennung gewährleistete, und andererseits bei niederfrequentem UV-Licht das gewünschte Fragment detektiert, um Mutationen in der Basensequenz zu verhindern, welche durch UV-Licht induziert werden. Bei einem Probeverdau kann das Bandenmuster mit höher frequentem UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 3.1.7 Gel-Elution

Die Gel-Elution diente dem Eluieren von zuvor auf Agarosegel aufgetrennten Fragmenten.

Es wurden zwei Kits zur Elution verwendet. Das Quiaquick-Kit zeichnete sich durch die Möglichkeit aus, in kürzerer Zeit DNA zu erhalten, wohingegen das Geneclean III-Kit höhere DNA-Ausbeuten bei insgesamt zeitlich anspruchsvollerem Verfahren lieferte. Das Geneclean III-Kit wurde zum Extrahieren von Fragmenten unter 700 bp Länge verwendet, wobei Fragmente unter 400 bp zusätzlich mit Isopropanol behandelt wurden.

### 3.1.7.1 Geneclean III-Kit

Die DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht bei 365nm sichtbar gemacht, mit einem Skalpell herausgelöst und in Eppendorf-Gefäße gegeben. Nach Zugabe von 1 ml NaI-Lösung und 10minütigem Erhitzen im Wasserbad bei 56°C wurde die geschmolzene Agarosegel-Mischung mit 5 µl Glasmilch versetzt. Bei etwa 10minütiger Inkubation auf Eis binden die in ihr enthaltenen Glaskügelchen die in der Mischung befindliche DNA. Nach Waschung mit 500 µl Ice Cold New Wash und Trocknung wurde die DNA in a.d. aufgenommen.

### 3.1.7.2 QIAquick Gel Extraction Kit

Nach Herauslösen der Fragmente aus dem Gel (s.o.) wurden diese gewogen und gewichtsadaptiert Buffer QG hinzugegeben (300 µl Puffer für 100 mg Gel). Nach Inkubation bei 50°C für 10 min erfolgte die Auflösung des Gelstückes. Bei geeignetem pH (Indikatorfarbe gelb) wurde für Fragmente unter 400 bp Isopropanol gewichtsadaptiert hinzugegeben (100 µl Isopropanol für 100 mg Gel). Es erfolgte die Zentrifugation in Qia-Caps bei 13.000 rpm für 1 min. Das aufgefangene Zentrifugat wurde verworfen und nach Überschichten des Filters mit 0,5 ml Buffer QG dieser Schritt wiederholt. Nach einem Waschschritt mit 0,75 ml Buffer PE und erneuten Zentrifugationsschritten wurde die im Filter enthaltene DNA mit a.d. eluiert und die Ausbeute durch weitere Zentrifugation erhöht. Die aufgefangene DNA konnte nun weiter verwendet werden. Es wurden 41 µl a.d. hinzugegeben und die aufgefangene DNA zur Ligation verwendet.

### 3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter der Ligation versteht man die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen, die enzymatisch katalysiert und beim molekularen Klonieren kontrolliert durch Fragmentkonzentration und Verarbeitungsprozesse im Vektorsystem (s. Dephosphorylierung) erfolgt. Unter einem Vektor wird hier ein DNA-Vehikel verstanden, welches in Bakterienzellen amplifiziert werden kann, da es die

entsprechenden nötigen Abschnitte – Bakterien-Origin und Antibiotikaresistenzen zur Selektion – enthält.

Um durch Restriktionsendonuclease-Verdau, Agarosegelelektrophorese und Gen-Elution gewonnene DNA-Fragmente molekular klonieren zu können, wurden sie in einen solchen bakteriellen Vektor eingebaut. Das kleine DNA-Fragment sollte im Überschuss (3-10:1) vorliegen, um eine Selbst-Ligation des Vektors zu vermeiden. Hierzu wurde eine Ausbeutekontrolle von 2 µl der DNA-Fragmente (von 10 µl Gesamtansatz) im Agarose-Gel durchgeführt, die Stärke der Fragmente verglichen und dementsprechend ein Verhältnis zueinander gewählt. Es wurden auch kurze Fragmente im Rahmen einer Mehrfragmentligation zunächst miteinander ligiert, bevor sie in einen Vektor eingeführt wurden. Hier wurde dann die laut Agarosegel-Elektrophorese gleichen Mengen der eluierten DNA-Fragmente gewählt.

Auf 20 µl Gesamtligationsansatz, aufgefüllt mit a.d., kamen also variable Insert- und Vektormengen. Benötigt wurden des Weiteren 1 µl T4-Ligase – ein Bakteriophagen-T4-kodiertes Enzym, welches glatte sowie überlappende DNA-Fragmente unter Bildung von Phosphodiesterbindungen und ATP-Substrat-Verwendung ligieren kann. Die Reaktion wurde durch 2 µl 10x-T4-Ligase-Puffer, welcher die ATP-Substrate bereit stellt, ermöglicht. Die Ligations-Reaktion erfolgte bei 15°C im Wasserbad über Nacht.

### 3.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Damit ein im Restriktionsendonuclease-Verdau geschnittenes Vektor-Fragment nicht religiert, werden die 5'-Enden durch das Enzym CIAP (engl. *calf intestine alkaline phosphatase*) dephosphoryliert, was die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verhindert. Hierzu wurde 1 U CIAP zugegeben, welches in den meisten Puffern aktiv ist. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde CIAP durch Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 5 mM und 10-minütiger Erwärmung im Wasserbad bei 75°C inaktiviert. Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung des Enzyms SAP (engl. *shrimp alkaline phosphatase*) im eigenen Puffer dar, welches im Gegensatz zu CIAP irreversibel durch 15-minütiges Erhitzen auf 75 °C inaktiviert wurde.

### 3.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (Mullis et al., 1986) revolutionierte die Molekularbiologie, da sie die exponentielle Amplifikation eines beliebigen DNA-Abschnittes möglich machte. Der gewählte DNA-Abschnitt wird durch zwei Primer in Sense- und Antisense-Richtung, die eine Länge von meistens 20 bis 40 Nukleotiden aufweisen, flankiert und somit für alle weiteren Schritte markiert. Das Verfahren der PCR beruht auf einer zyklischen Wiederholung folgender Reaktionsschritte:

Bei 94°C wird zunächst die dsDNA denaturiert. Dieser Schritt wird initial einmalig für etwas länger als eine Minute eingesetzt.

Bei einer Temperatur A, welche abhängig von den verwendeten Primern ist, erfolgt das sogenannte Annealing, bei dem sich die Primer an die DNA anlagern.

Bei einer Temperatur von in der Regel 72°C, abhängig vom eingesetzten Enzym, erfolgt durch eine thermostabile Polymerase die Elongation des zur Matrize komplementären DNA-Stranges. Schließlich erfolgt wieder ein Denaturierungsschritt bei 94°C. So erhält man mit je dem Zyklus eine Verdopplung der gewünschten DNA. Die PCR wurde verwendet, um präparative Ansätze zur Weiterverwendung von DNA herzustellen.

Sie wurde in PCR-Reaktionsgefäßen unter Verwendung von Taq-Polymerase mit hoher Lesegeschwindigkeit (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) oder Pwo-Polymerase (Powerscript-Polymerase mit niedriger Lesegeschwindigkeit aber dafür Korrekturlesefähigkeit) angesetzt. In dieser Arbeit wurde nach einigen Vorversuchen nur noch die Pwo verwendet, da die Fehlerfreiheit der amplifizierten DNA für die folgenden Arbeitsschritte notwendig war.

### 3.1.10.1 Präparativer Ansatz

Tab. 5: PCR – präparativer Ansatz

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Matrize	100 ng Plasmid-DNA
Primer sense	30 pmol
Primer antisense	30 pmol
dNTPs (10 mM)	2 µl
Puffer (10x)	10 µl
Polymerase	5 µl Pwo
a.d.	Ad 100 µl Endvolumen

Beim präparativen Ansatz wurde ein Standardprogramm mit 35 Zyklen verwendet:

94°C 30 s

50°C 1 min

72 °C 2 min

### 3.1.10.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung beruht auf einer modifizierten PCR, die nach dem von F. Sanger beschriebenen Kettenabbruchprinzip funktioniert (Sanger et al., 1977). Wie bei einer zur reinen Amplifikation gedachten PCR wird die DNA zunächst denaturiert und mit passenden Primern hybridisiert. Durch eine Polymerase erfolgt die lineare Elongation mit den im Reaktionsgemisch enthaltenen Desoxyribonukleotiden. Zur Sequenzierung werden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide hinzugegeben, welche nach stochastischem Einbau in den entstehenden Strang auf Grund ihrer Konformation zum Kettenabbruch führen. Es entstehen also Stränge in verschiedenen Längen, welche nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Die am Ende angehängten Farbstoffe werden mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt, und so kann die am Ende befindliche

Base ermittelt werden. Mit den Ergebnissen aus der Auftrennung nach Stranglänge erhält man so die Sequenz der eingesetzten DNA.

Wir setzten das Big Dye Cycling Set ein, in dem eine Polymerase, Di- und normale Desoxyribonkleotide und Enzympuffer enthalten sind.

Zum analytischen Ansatz wurden eingesetzt:

**Tab. 6: PCR – analytischer Ansatz**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
Matrize	500 ng
Primer	3,3 pmol
Big Dye Mix	1 µl
Tris/MgCl <sub>2</sub> -Puffer	1 µl
a.d.	2,17 µl

Vor der Sequenzermittlung wurde eine lineare PCR mit folgenden 24 Zyklen durch geführt:

95°C 20 s

50°C 20 s

60°C 4 min

Hiernach wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt, bis sie im Haus sequenziert wurden.

### **3.1.11 Site directed Mutagenese**

#### **3.1.11.1 PCR-Reaktion**

Die in dieser Arbeit verwendete site directed Mutagenese basiert auf einer modifizierten PCR-Reaktion. Unter der Verwendung von Oligonukleotiden in sense- und antisense-Richtung, welche die gewünschten Mutationen enthalten, und ansonsten komplementär zur Ursprungs-DNA sind, findet durch eine DNA-Polymerase das Ablesen des Plasmids statt, in welches nun die Mutationen eingeführt werden und welches auf Grund der speziellen Eigenschaften des

Enzyms nicht methyliert wird. Die nicht-mutierte DNA wird mit Hilfe von Enzymen abgebaut, welche methylierte DNA erkennen.

Als Ursprungsplasmid wurde der TOPO-Vektor verwendet, welcher den gewünschten DNA-Abschnitt, in dieser Arbeit ein Fragment aus pol, enthielt. Die Oligonukleotide, welche die gewünschten Mutationen enthielten, wurden bei der Firma Sigma Genosys bestellt.

Es wurden folgende Reaktionslösungen in einem PCR-Gefäß in einem Endvolumen von 50 µl angesetzt:

**Tab. 7: PCR – Mutationssynthese-Reaktion**

<b>Reagenz</b>	<b>Negativkontrolle Menge</b>	<b>Mutationssynthese-Reaktion Menge</b>
TOPO-Vektor mit DNA-Fragment	-	50 ng
Oligonukleotid sense	125 ng	125 ng
Oligonukleotid antisense	125 ng	125 ng
dNTP	1 µl	1 µl
a.d.	39,5 µl	Aufzufüllen auf 50 µl
Pfu-Turbo-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl	1 µl
Kontrollplasmid (4,5 kb, 5 ng/ul)	2 µl	-
10xReaktionspuffer	5 µl	5 µl

Bei der Negativkontrolle wurden Kontrollprimer aus dem *QuikChange Site-Directed Mutagenesis-Kit* mit einer Konzentration von 100 ng/µl und folglich 1,25 µl eingesetzt.

Es wurden 16 Primer, jeweils zwei für die Mutation einer purinreichen Sequenz (sense und antisense, s. Material), zur Mutationssynthese-Reaktion verwendet.

Die Primer wurden alle so gewählt, dass sie eine ähnliche Schmelztemperatur von ca. 78 °C aufwiesen, was sich mit folgender Formel berechnen ließ:



$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ Mismatch}$$

Wobei  $T_m$ : Schmelztemperatur

%CG: prozentualer Anteil der Basen G und C im Oligonukleotid

N: Länge des Primers (bp)

In der PCR-Maschine wurde nach initialen 30 s bei 95°C folgender Zyklus 18 Mal wiederholt:

95°C 30 s

55°C 60 s

68°C 420 s

Nach der PCR-Reaktion wurde jedes Reaktionsgefäß zum Verdau der methylierten oder hemimethylierten DNA mit 1 µl Dpn I versetzt und bei 37°C für 60 min inkubiert. Dpn I ist nicht in der Lage, nicht methylierte DNA, aus welcher auch das PCR-Produkt und somit das gewünschte DNA-Produkt bestand, zu verdauen. Anschließend erfolgte eine spezielle Transformation.

### 3.1.11.2 Transformation nach site directed Mutagenese

Nach erfolgter site directed Mutagenese mittels PCR wurde der Reaktionsansatz aus dem PCR-Reaktionsgefäß in einer speziellen Transformation in Bakterien amplifiziert, um hernach auf Vorhandensein der Mutationen mittels Restriktionsendonuclease-Verdau und DNA-Sequenzierung analysiert werden zu können.

40 µl XL-Blue-Zellen wurden aufgetaut und mit 1 µl Reaktionsansatz versehen. Nach 30 min Kühlung auf Eis wurden die Zellen für 45 s einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Es erfolgte kurze Kühlung auf Eis und Zugabe von 0,5 ml SOC-Medium. Nach 60 min bei 37°C im Schüttler wurden je 250 µl der Bakteriensuspension auf LB-Ampicillin-Platten, welche zuvor mit 80 µl XGal und 20 µl IPTG bestrichen worden waren, ausplattiert. XGal wird unter Gegenwart von Beta-Galaktosidase zu einem Farbstoff gespalten, welcher Bakterienkolonien blau färbt. Der gewünschte DNA-Abschnitt war in das Gen für die Betagalaktosidase integriert und somit waren farblose Kolonien mit höherer Wahrscheinlichkeit Träger der gewünschten DNA. Es erfolgte die Bebrütung der Platten über Nacht

bei 37°C und die Weiterverarbeitung der entstandenen, farblosen Kolonien in Form von Mini-Präparation (s.o.).

## 3.2 Arbeit mit Zellkulturen

### 3.2.1 Zellen auftauen

Zellen können in flüssigem Stickstoff über Jahre hinweg gelagert werden. Für die Experimente wurden Zellen aufgetaut und Zellkulturen angelegt.

Nach schonendem Auftauen wurden die Zellen in ein 15ml-Falcon mit 10 ml passendem Medium überführt. Durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bei einer Temperatur von 4 °C, um einen toxischen Effekt des Gefriermittels DMSO zu verhindern, wurden die Zellen pelletiert, der Überstand hernach verworfen und schließlich die Zellen in 5 ml passendem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Das Wachstum wurde nun täglich kontrolliert und bei entsprechend dichtem Zellrasen erfolgte die Übersiedlung der Zellen in größere Zellkulturflaschen und anschließend normale Split-Zyklen.

### 3.2.2 Zellen einfrieren

Die Zellen wurden mit ATV abgelöst und in passendes Medium aufgenommen. 15ml-Eppendorfgefäße wurden mit Zellsuspension befüllt und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Pellet je 0,5 ml Medium und 0,5 ml FCS mit 20% DMSO gegeben. Nach Überführung in Kryoröhrchen und Transport in einer Kühlbox, um die Zellen möglichst kurz bei Raumtemperatur dem toxischen DMSO auszusetzen, wurden die Zellen zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff zur langen Aufbewahrung überführt.

### 3.2.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank gehalten. Verschiedene Zell-Linien benötigen verschiedene Zellkulturmedien:

293T – MEM mit 10% FCS

BHK/LTR lacZ – MEM mit 5% FCS, Selektion mit G418

HT1080 – DMEM mit 10% FCS

Bei dichtem Zellrasen wurden die Zellen durch das sogenannte Splitten reduziert. Das alte Medium wurde abgenommen, nach Spülen mit ATV (7 ml in großen, 3 ml in kleinen Flaschen) wurde erneut ATV (3 ml in großen, 1 ml in kleinen Flaschen) zum Ablösen der Zellen hinzugegeben. Nach dem Ablösen unter Schwenken der Zellkulturflaschen wurde die Zellsuspension mit entsprechendem Medium auf 10 ml aufgefüllt und je nach gewünschter Verdünnung ein Teil der Zellsuspension verworfen und ein Rest in der Flasche belassen, welcher dann mit Medium auf das Endvolumen der Flasche (20 ml in großen, 10 ml in kleinen Zellkulturflaschen) aufgefüllt wurde.

### **3.2.4 Zellen aussäen**

Um Experimente an adhärenenten Zellen durchführen zu können, mussten diese zunächst in geeigneten Schalen ausgesät werden.

Anstatt den Überstand beim Splitten der Zellen zu verwerfen, wurde er in einen Erlenmeyerkolben gegeben und 10 µl hiervon in einer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Je nach gewünschter Aussaatmenge wurde ein Volumen aus dem Erlenmeyerkolben in einem Messzylinder mit entsprechendem Medium auf das Endvolumen aufgefüllt und auf Zellkulturschalen oder 12-well-Plates verteilt.

Für Transfektionen wurden 6 cm-Schalen verwendet in denen 5 ml Zellen ausgesät wurden:

**Tab. 8: Transfektionen**

<b><i>Transfektionsart</i></b>	<b><i>Aussaat-Menge</i></b>	<b><i>Verwendung</i></b>
HBS-Transfektion	$2 \times 10^6$ 293 T-Zellen in 5 ml	Überstandtransfer
PEI-Transfektion	$2 \times 10^6$ 293 T-Zellen in 5 ml	Überstandtransfer
Polyfect-Transfektion	$1,5 \times 10^6$ 293 T-Zellen in 5 ml	Überstandtransfer

Nach erfolgter Transfektion wurde der Überstand aus den 6 cm-Schalen weiter verwendet, d.h. auf 12-well-plates gegeben, auf welchen nach unten stehender Tabelle Zellen ausgesät worden waren:

**Tab. 9: Überstandtransfer**

<b><i>Nach Transfektion</i></b>	<b><i>Aussaat-Menge</i></b>	<b><i>Verwendung</i></b>
Überstandtransfer aus HBS- oder Polyfect-Transfektion	$4 \times 10^4$ BHK/LTR lacZ-Zellen pro ml in 12-well-plates	Titration der Virusproduktion mit pcHSRV2- und pcHSRV2M54-Varianten
Überstandtransfer aus Polyfect-Transfektion	$4 \times 10^4$ BHK/LTR lacZ-Zellen pro ml in 12-well-plates	Produktion von pMD9-Varianten zur späteren FACS-Analyse
Überstandtransfer aus PEI-Transfektion	$1 \times 10^4$ HT1080-Zellen pro ml in 12-well-plates	FACS-Analyse (pCpol2-Varianten und pMD9-Varianten)

### **3.2.5 Transfektion**

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellkulturzellen. Transiente Transfektionen bezeichnen das Einbringen von Fremd-DNA in Form von Plasmid-DNA.

In dieser Arbeit wurden drei chemische Transfektionsverfahren verwendet, um die Fremd-DNA in die Zellkulturen einzubringen. Ziel war es dabei jeweils, die Zellen zur Produktion von Viruspartikeln zu bringen.

#### **3.2.5.1 Das Vier-Plasmid-System**

Unter anderem wurde in dieser Arbeit das Vier-Plasmid-System verwendet. Dieses spezifiziert ein foamyvirales Vektorsystem, in welchem drei Plasmide (hier: pCIgag2, pCenv und pCpol2) die zur Produktion von Foamyviren benötigten Proteine exprimieren und ein viertes Plasmid, hier der Vektor pMD9, die zur Partikelbildung nötigen cis-aktiven Sequenzen mittels verpackbarer RNA bereitstellt. pMD9 als RNA-Donator im Vier-Plasmid-System stellt kein komplettes virales Genom zur Verfügung, sondern nur eine eGFP-Expressions-Kassette und die für die RNA-Verpackung und den Viruszusammenbau wichtigen Sequenzen CAS I und II (Peters et al., 2005; Heinkelein et al., 2002b). Nach Transfektion einer Zelle mit pMD9 als Korrelat der viralen RNA und den genannten drei Plasmiden für die viralen Proteine (pCenv für Env, pCIgag2 für Gag, pCpol2 für Pol) produzieren die Zellen infektiöse virale Partikel, welche nur einen kurzen Abschnitt von viraler RNA inklusive eGFP – also kein voll funktions- und somit weiter infektiöses Genom – enthalten. Die viralen Partikel werden im Rahmen eines Überstandtransfers auf Zellen gegeben, die infiziert werden, d.h. eGFP wird nach einem Replikationszyklus ins Genom integriert und seine im FACS gemessene Fluoreszenz kann zur Quantifizierung der erfolgreichen Integrationen verwendet werden. Weiteres Virus kann nicht produziert werden, da keine Informationen mehr zum Aufbau desselben vorliegen. Anwendung fand dieses Plasmid-System in den unter 4.4.1 und 4.6.1 aufgeführten Versuchen.

### 3.2.5.2 Polyfect-Transfektion

Um eine hohe Virusproduktion zu erhalten, wurde das Polyfect-Reaktions-Agens von Qiagen verwendet. Polyfect ist ein sogenanntes aktiviertes Dendrimer mit sphärischem Aufbau und radiären Ausläufern aus positiv geladenen Aminosäureketten. Bei Zugabe von Plasmid-DNA formt sich ein kompaktes, positiv geladenes Gebilde, welchem über negativ geladene eukaryotische Zellrezeptoren der Eintritt in die Zelle ermöglicht wird. Das Reagenz puffert nach der Endozytose den pH-Wert im Lysosom und verhindert so einen Abbau der DNA durch die lysosomalen Nucleasen.

Nach Aussaat von 293T-Zellen in einer 6 cm-Schale in 5 ml 10%-MEM und Anwachsen über Nacht wurde am folgenden Tag das Medium abgesaugt und 4 ml frisches Medium hinzugegeben.

Es wurden verschiedene Experimente mit Hilfe der Polyfect-Transfektion durchgeführt.

Tab. 10: Plasmide in der Polyfect-Transfektion

<i>Experiment</i>	<i>Plasmide</i>	<i>Eingesetzte DNA-Menge</i>	<i>Plasmidnamen</i>
Titration von pcHSRV2 und Varianten	Ein-Plasmid-System	6 µg	pcHSRV2 und Varianten
Titration von pcHSRV2M54 und Varianten	Zwei-Plasmid-System	3 µg	- pcHSRV2M54 und Varianten - pCpol2
Virusproduktion für Bestimmung der Transduktionseffizienz	Vier-Plasmid-System	1,5 µg	- pMD9 und Varianten - pCpol2 - pClgag2 - pCenv

Zur DNA wurden 150 µl MEM und 30 µl Polyfect zugegeben. Nach 10-sekündigem Vortexen und einer Einwirkzeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben nach Zugabe von 1 ml MEM mit 10% FCS nochmals vermischt und schließlich auf die Zellschalen geträufelt. Die Induktion erfolgte 24 h, die Überstandabnahme 48 h nach Transfektion.

### 3.2.5.3 HBS-Transfektion = Calciumphosphat-Transfektion

In der Transfektionslösung befinden sich Natriumphosphat und Calciumchlorid. Auf Grund des geringen Löslichkeitsproduktes fällt Calciumphosphat aus, welches an die DNA bindet und von den Zellen endozytotisch aufgenommen wird. Dies ist für die Zellen schädlich, weshalb ein Mediumwechsel erforderlich ist.

Diese Methode wurde mit der gleichen Zielsetzung wie die Polyfect-Transfektion, welche sich jedoch als wesentlich effizienter herausstellte, in 293T-Zellen zur Transfektion mit dem Ein-Plasmid-System und Zwei-Plasmid-System verwendet. Insgesamt wurden maximal 20 µg DNA eingesetzt.

Tab. 11: Plasmide in der HBS-Transfektion

<i>Experiment</i>	<i>Plasmide</i>	<i>Eingesetzte DNA-Menge</i>	<i>Plasmidnamen</i>
Titration von pcHSRV2 und Varianten	Ein-Plasmid-System	20 µg	pcHSRV2 und Varianten
Titration von pcHSRV2M54 und Varianten	Zwei-Plasmid-System	10 µg	- pcHSRV2M54 und Varianten - pCpol2

Die in ein Eppendorfgefäß pipettierte DNA wurde je mit 430 µl a.d. und 50 µl 2 M-CaCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Unter sterilen Bedingungen wurde langsam 500 µl HBS zugesetzt. Nach Vortexen wurde die Lösung auf die Zellkulturen gegeben. Vor jeder Transfektion wurde ein Mediumwechsel unter Zugabe von 4 ml neuem Medium auf den Zellen durchgeführt. Nach acht Stunden wurde das Medium auf Grund der Toxizität des HBS für die Zellen erneut gewechselt. Induktion erfolgte 24 h, Überstandabnahme 48 h nach Transfektion.

### 3.2.5.4 PEI-Transfektion

Polyethylenimine (= PEI) ist ein kationisches Polymer, welches die DNA auf Grund seiner nukleinsäurebindenden und –kondensierenden Eigenschaften in Zellen transportieren kann. Durch den sogenannten Protonensponge-Effekt des Polykations wird einer intrazellulären Degradierung entgegen gewirkt und die Freisetzung der DNA aus dem Endosom ermöglicht, wodurch eine effiziente Transfektionsrate erreicht werden kann (Boussif O. et al, 1996). Es wurde das als Chemikalie erhältliche verzweigte PEI benutzt.

Die PEI-Transfektion wurde im Vier-Plasmid-System auf 293 T-Zellen verwendet, um die im Überstand gewonnenen Viruspartikel auf HT1080 Zellen mit Hilfe des FACS auf Funktionalität zu prüfen.



Tab. 12: Plasmide in der PEI-Transfektion

Experiment	Plasmide	Eingesetzte DNA-Menge	Plasmidnamen
Virusproduktion für Bestimmung der Transduktionseffizienz	Vier-Plasmid-System	4 µg	- pMD9 und Varianten - pC1gag2 - pCpol2 - pCenv

Die DNA wurde mit 500 µl MEM und 16 µl PEI versetzt und nach vorsichtigem Mischen auf die Zellkulturen aufgebracht. Mediumwechsel erfolgte vor der Transfektion und fünf Stunden danach, da PEI wie HBS zelltoxisch wirkt. Induktion erfolgte 24 h, Überstandabnahme 48 h nach Transfektion.

### 3.2.6 Induktion

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 80 µl Natrium-Butyrat induziert, welches auf Grund seiner Toxizität nach maximal 8 h wieder abgenommen werden und gegen 2-4 ml frisches MEM mit 10% FCS (da Virusproduktion stets in 293T-Zellen stattfand) ausgetauscht werden musste. Natrium-Butyrat stimuliert in erster Linie den CMV-Promotor der Plasmide und somit die Transkription und Translation in den transfizierten Zellen, was somit auch zur erhöhten Virusproduktion beiträgt. Am Folgetag konnte der Überstand abgenommen und weiter verwendet werden.

### 3.2.7 Überstandabnahme

Unter Überstandabnahme versteht man die Abnahme von Viruspartikeln, die zuvor durch Transfektion von Zellen mit DNA (s.o.) produziert wurden.

Hierzu wurde das Medium von den transfizierten 293T-Zellen mittels Monovetten abgesaugt und durch einen 0,45 µm-Filter, an dem Zellbestandteile und andere eventuelle Verunreinigungen, nicht aber die 100 nm-großen viralen Partikel hängen bleiben, steril in ein Eppendorfgefäß filtriert.

Je nach weiterer Verwendung wurden verschiedene weitere Schritte mit dem Filtrat, in dem sich die Viruspartikel befanden, vorgenommen. Es erfolgte immer

ein Überstandstransfer auf eine andere Zellreihe. Nach der HBS-Transfektion wurde zunächst der Überstand bei -80°C gelagert und für den Überstandstransfer wieder aufgetaut.

### 3.2.8 Virus-Titration durch die lacZ-Methode

Die lacZ-Methode ist in der Lage, die Zellen mittels Blaufärbung zu detektieren, in welchen sich replizierende, Tas-produzierende Foamyviren befinden. Hierzu wurden BHK/LTR lacZ-Zellen verwendet, welche das lacZ-Gen geschaltet hinter eine Tas-abhängige PFV-LTR aufweisen. Penetriert ein Virus eine Zelle und wird repliziert, wird auch Tas produziert, das an den Promotor der LTR der BHK/LTR lacZ-Zelle bindet und die Transkription von Beta-Galaktosidase ermöglicht. In einem späteren Färbeschritt kann die Produktion dieses Enzyms als Blaufärbung sichtbar gemacht und die entsprechend gefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden, woraus der Titer der Viren errechnet werden kann.

Es wurde Überstand in Form von verschiedenen Verdünnungsreihen in doppelter Ausfertigung, wobei meist 1:1.000 und 1:10.000 mit 5%-MEM verdünnt wurde, direkt aus einer Polyfect-Transfektion oder indirekt (nach Auftauen) aus einer HBS-Transfektion übertragen. Nach Absaugen des Mediums von den BHK/LTR lacZ-Zellen wurde pro Well 1 ml Virus-Verdünnung hinzugegeben.

48 h später wurde die Virus-Verdünnung abgesaugt und die Wells mit 1 ml PBS gespült. Nach Zugabe von 1 ml Fixierlösung und einer Einwirkzeit von mindestens 20 min bei 4°C wurde die Fixierlösung wieder abgesaugt und nach zweimaligem Spülen mit jeweils 1 ml PBS pro Well 0,5 ml Färbelösung zugegeben. Die in der Färbelösung enthaltenen Cyanoferrat-Komplexe werden durch Katalyse der Beta-Galaktosidase zur Bildung von blauen Komplexen, Berliner Blau, gebracht, welches den Zellen ihre später unter dem Mikroskop charakteristische Blaufärbung verleiht. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 4 h bei 37°C konnten die 12-Well-Plates unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein von blaugefärbten und somit durch Virusinfektion Tas-enthaltende Zellen überprüft werden. Die Virustiter errechneten sich wie folgt:

- 1) Auszählen der blauen Foci pro Well.
- 2) Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor, also meistens  $\times 1.000$  und  $\times 10.000$  für die höhere Verdünnungsstufe.
- 3) Addition der Ergebnisse aus 4 Wells, Division durch 4.

### 3.2.9 FACS

Die Expression des Fluoreszenzgenes eGFP wurde mit einem FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter) vollautomatisiert gemessen.

Zunächst wurde der Überstand (Gewinnung s.o.) aus einer PEI-Transfektion für die Analyse der pCpol2-Varianten oder für die Analyse der pMD9-Varianten auf HT1080-Zellen in 12-well-Plates gegeben, welche 2 h zuvor ausgesät worden waren. Es wurden jeweils drei Versuchsreihen durch Zugabe von 150 µl, 300 µl und 500 µl Überstand angefertigt.

48 h nach Überstandtransfer wurden die zu untersuchenden HT1080-Zellen mit 0,5 ml ATV nach mindestens zwei Spülschritten mit 1 ml PBS pro Well abgelöst und in 3 ml FACS-Puffer enthaltende FACS-Röhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mittels Vortexen resuspendiert.

Schließlich konnten die Zellen im FACS analysiert und die erhaltenen Daten mit dem Softwarepaket Cell Quest Pro ausgewertet werden.

## 3.3 Arbeit mit Proteinen

### 3.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Möchte man Proteine in Zellen nachweisen, muss man die Zellen zunächst lysieren. Hierzu wurde das Medium von den transfizierten Zellen aus den 6 cm-Schalen abgenommen und nach einem Waschschrift mit 3 ml PBS pro Schale jeweils 700 µl RIPA-Puffer zu den dann auf Eis gestellten Zellen zugegeben. RIPA-Puffer enthält Proteaseinhibitoren, welche – wie die Kühlung auf Eis – den Abbau von viralen Proteinen durch zelluläre Proteasen hinauszögert. Der Einfrier-Auftau-Schritt dient außerdem zum Aufschließen der Zellen. Nach ca. 10 und max. 20 min mit mehrmaligem Schwenken wurde das Zell-Lysat in Qiagen-Shredder-Gefäße pipettiert und bei 14.000 rpm 1 min zentrifugiert. Die aufgefangenen Zellbestandteile wurden dann mit 600 µl 2xPPP versetzt, für 5 min aufgekocht und zur Aufbewahrung auf –80°C gestellt.

### 3.3.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die PAGE (modifiziert nach Schägger und Jagow, 1987) dient der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe. Hierzu benötigt man ein Trenngel, in dem die Ladung der Proteine maskiert wird und die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe abhängig ist. Zum Auftragen der Proteine benötigt man ein Sammelgel, das durch Einstecken eines Kammes entsprechende Taschen enthält, in welche die Zell-Lysate oder die Partikelpreparationen (s.u.) gegeben werden.

Es wurde ein 8%iges Trenngel nach folgendem Schema hergestellt:

Gel 40 (Acryl-Bisacrylamid)	5,3 ml
Gelpuffer	6,6 ml
Glycerol	2,2 ml
a.d.	6,0 ml

Nach halbstündigem Auspolymerisieren wurde ein Sammelgel, in das ein Kamm eingelassen wurde, obenauf pipettiert, welches nach folgendem Schema hergestellt wurde:

Gel 40	2,6 ml
Gelpuffer	5,0 ml
a.d.	12,4 ml

Jedes Gel wurde durch Zugabe von 150  $\mu$ l 10%-APS und 40  $\mu$ l TEMED zum Polymerisieren gebracht. Vor Polymerisation des Trenngels wurde dieses mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um einen glatten Abschluss zu erhalten. Vor Auftragen des Sammelgels wurde das Isopropanol abgegossen und mit a.d. kurz ausgespült. Nach Auspolymerisation des Sammelgels wurden zunächst 400 ml 1x Kathodenpuffer in die obere und 800 ml 1x Anodenpuffer in die untere Gelkammer gegeben, bevor der Kamm gezogen wurde.

In die erste Tasche wurden 7  $\mu$ l Protein Ladder-Marker pipettiert, in die folgenden Taschen 50  $\mu$ l der Zell-Lysate bzw. im Falle der Partikelpreparation 30  $\mu$ l für die Gag- und 40  $\mu$ l für die Pol-Analyse. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei einem Stromfluss von 25 mA.

### 3.3.3 Halbtrockenblot-Verfahren (Western Blot)

Nach Auftrennung der Proteine der Größe nach, werden diese vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Methode nach Towbin et al., 1979). Durch den Stromfluss von Gel in Richtung Membran wandern die im Gel enthaltenen Proteine auf die Membran, auf welcher sie nach verschiedenen Waschsritten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und Peroxidase-gekoppelten Antikörpern gegen die Fc-Teile der ersteren detektiert werden können. Sichtbar gemacht wurde diese Reaktion mit Hilfe des ECL-Kits, durch die Peroxidase-vermittelte Emission von Licht aus Luminol, aufgefangen auf einem Röntgenfilm.

Zum Blotten wurde das Gel aus der PAGE auf einer Nitrozellulosemembran, gebettet auf 3 Whatman-Papieren und wiederrum bedeckt von 2 Lagen dieses zuvor mit Blot-Puffer befeuchteten Papierses, in einer Blotkammer bei 150 mA für 90 min aufgebracht. Um ungesättigte Bindungen an den so auf die Nitrozellulosemembran geblotteten Proteinen abzusättigen, wurde die Membran in 4%iger Milchpulverlösung 60 min geschwenkt. Nach dreimaligem Spülen mit 0,5%iger PBS-Tween-Lösung wurde hiernach der spezifische Antikörper gelöst in 4%iger Milchpulverlösung (Endvolumen 15 ml) für 60 min hinzugegeben. Die Konzentration des Antikörpers war abhängig von der verwendeten Charge. Nach erneutem Waschschrift mit 0,5%iger PBS-Tween-Lösung wurde die Membran weitere 60 min mit dem zweiten Antikörper (Anti-Mouse, 15 µl in 15ml 4%iger Milchpulverlösung) inkubiert. Abschließend erfolgten nochmals mehrere Waschungen mit 0,5%iger PBS-Tween-Lösung, bevor die dann getrockneten Membranen auf eine Glasplatte gelegt und der 90-sekündigen Fotoreaktion mit einer 2ml-Lösung aus ECL Lösung 1 und 2 (je 1 ml) ausgesetzt wurden. Nach Abtropfen der ECL-Lösungen und Überziehen mit Klarsichtfolie, wurde die Glasplatte mit der Membran in einer lichtundurchlässigen Fotokassette verpackt. Die Belichtung der Röntgenfilme erfolgte in der hierfür vorgesehenen Dunkelkammer, je nach gewünschter Intensität bzw. Konzentration des geblotteten Proteins und der Stärke des Fotoeffektes in 1 min bis 30 min.

## **3.4 Viruspartikelpräparation**

### **3.4.1 Partikelgewinnung**

Der aus einer PEI-Transfektion gewonnene, steril filtrierte Überstand aus 4 Schalen wurde vereinigt. 2 ml 20%-ige Sucroslösung wurden in Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt. 9 ml Überstand wurden über die Sucroslösung geschichtet, austariert wurde der Füllstand der Röhrchen mit sterilem PBS. Es erfolgte die Zentrifugation bei 25.000 rpm für 3 h. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Sucrose abgenommen und das Röhrchen umgedreht aufbewahrt. Flüssigkeitsreste wurden mit Papier entfernt.

### **3.4.2 Präparation der Proteine im Viruspartikel**

Für diese Arbeit wurden die partikelassoziierten Proteine präpariert.

Es wurden 60 µl einer Lösung aus 30 µl PBS und 30 µl 2xPPP zu den Partikeln gegeben und diese gevortext. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis und erneutem Vortexen wurden die Proben bei 95°C für 45 min gekocht. Die so präparierten Proteine konnten bei -80°C gelagert werden und mit SDS-Page und Western Blot (s.o.) analysiert werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mutation der zentralen purinreichen Sequenzen

Um Einflüsse der zentralen und der drei weiteren purinreichen Sequenzen im Integrase (IN)-kodierenden Abschnitt auf die Replikation von PFV aufzudecken, wurden verschiedene Mutationen in diese eingeführt. Die purinreichen Sequenzen wurden im Wildtyp-Plasmid pcHSRV2 durch das Verfahren der site directed Mutagenese (Vgl. 3.1.11) mutiert. Anschließend wurden sie durch Restriktionsendonucleasen herausgeschnitten und einzeln oder in Kombination in andere Plasmide – je nach Fragestellung – eingebracht. Alle Experimente wurden dann unter Bezug auf das jeweilige Wildtyp-Plasmid, welches alle purinreichen Sequenzen in Originalform enthielt, durchgeführt. Die verwendeten Plasmide waren pcHSRV2, pCpol2 und pMD9. Da das IN-Leseraster, in welchem sich die purinreichen Sequenzen befinden, nur kleine Veränderungen der Basensequenz zuließ, wurden zunächst die Minus-Varianten – in welchen das überlappende IN-Leseraster nicht verändert wurde – hergestellt. Erst aber eine Reduktion der zusammenhängenden Originalpurine auf fünf Basen im Vollängenklon hatte im Falle von HIV-1 einen negativen Effekt auf die Replikationseffizienz gezeigt (Charneau et al., 1992). Deshalb wurden für PFV schließlich die Plus-Varianten hergestellt, in welchen durch Basenaustausch auch ein Aminosäureaustausch innerhalb der IN erfolgt war. Bei PFV war insbesondere im Falle des Elements C eine starke Veränderung der Aminosäuresequenz nötig, da nur so eine Verminderung der Zahl der Originalpurine auf weniger als fünf möglich wurde. Um beim Austausch der Aminosäuren Einflüsse auf Sekundär- und Tertiärstruktur und dadurch auf die Enzymfunktion gering zu halten, wurde eine Aminosäure durch eine verwandte ersetzt. Im Falle des Elements A wurde somit Lysin gegen eine andere basische Aminosäure – Arginin – ausgetauscht, im Element B wurde Asparagin durch Glutamin, im Element C Glutamin- durch Asparaginsäure und im Element D, der zentralen purinreichen Sequenz, Glutamin durch Histidin ersetzt. Es entstanden die in Abb. 11 gezeigten Varianten. Die purinreichen Sequenzen werden als Elemente A bis D bezeichnet.

<b>Element A</b>							
wt (16)	GG	GCA	AAG	GAA	AGA	GG	Ala-Lys-Glu-Arg
Element A- (6)	GG	GCC	AAG	GAA	CGC	GG	Ala-Lys-Glu-Arg
Element A+ (4)	GG	GCC	CGC	GAA	CGC	GG	Ala-Arg-Glu-Arg
<b>Element B</b>							
wt (12)	gtG	GAA	AGG	AAA	AAt		Val-Glu-Arg-Lys-Asn
Element B- (5)	gtC	GAA	CGC	AAA	AAt		Val-Glu-Arg-Lys-Asn
Element B+ (3)	gtC	GAA	CGC	AAA	CAG		Val-Glu-Arg-Lys-Gln
<b>Element C</b>							
wt (12)	AGA	GAA	GAA	GAA			Arg-Glu-Glu-Glu
Element C- (9)	CGC	GAA	GAA	GAA			Arg-Glu-Glu-Glu
Element C+ (2)	CGC	GAC	GAC	GAC			Arg-Asp-Asp-Asp
<b>Element D</b>							
wt (9)	cAG	GAG	AGG	G			Gln-Glu-Arg
Element D- (5)	cAG	GAG	CGC	G			Gln-Glu-Arg
Element D+ (3)	cAC	GAG	CGC	G			His-Glu-Arg

### Abb. 11 Mutationen der purinreichen Sequenzen

In der oberen Zeile ist jeweils die Wildtyp-Sequenz (Wildtyp = wt) zu sehen, in Klammern vermerkt die Zahl der Originalpurine. Dahinter folgt die Aminosäuresequenz des zugehörigen IN-Leserasters. Die folgende Zeile zeigt die Minus-Variante (z.B. A-), in welcher die Aminosäuresequenz nicht verändert wurde, in Klammern vermerkt die Anzahl der noch zusammenhängenden Originalpurine. Es folgt die Plus-Variante, bei welcher die Aminosäuresequenz geändert wurde, wieder in Klammern hinter der Bezeichnung der Mutante die Zahl der noch zusammenhängenden Originalpurine. Gezeigt werden der Basenaustausch und der Aminosäureaustausch durch graue Hinterlegung. In Element B ist klein geschrieben in der Basenabfolge die erste nicht mehr zur purinreichen Sequenz gehörende Base gezeigt, welche in Element B+ mutiert wurde, um die zur Wildtyp-Sequenz verwandte Aminosäure zu kodieren (Glutamin anstatt Asparagin).

Zur Mutation wurden die in Material 2.8.1. aufgelisteten Primer verwendet.

Um Kombinationseffekte der purinreichen Sequenzen auf die Replikation von PFV aufzudecken, wurden des Weiteren Kombinationsmutanten hergestellt:



So erhielt man inklusive Wildtyp-Plasmid 15 Mutanten:

- das Original- bzw. Wildtyp-Plasmid mit allen ursprünglich belassenen Elementen A bis D
- die Einzelmutanten als Minus-Varianten (Elemente A- bis D-)
- die Einzelmutanten als Plus-Varianten mit Aminosäureaustausch (Element A+, Element B+, Element C+, Element D+)
- die Kombinationsmutanten aus den Minus-Varianten (Elemente AuB- bis CuD-)
- die Kombinationsmutanten aus den Plus-Varianten (Elemente AuB+ bis CuD+)
- die Kombinationsmutanten aus allen Minus-Varianten Elemente A-D- und aus allen Plus-Varianten Elemente A-D+

## 4.2 Übersicht

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob die vier purinreichen Sequenzen, die Elemente A, B, C und D, eine Rolle für die reverse Transkription spielen und gegebenenfalls einen Zweitinitiationsort für die Plusstrang-Synthese der DNA darstellen.

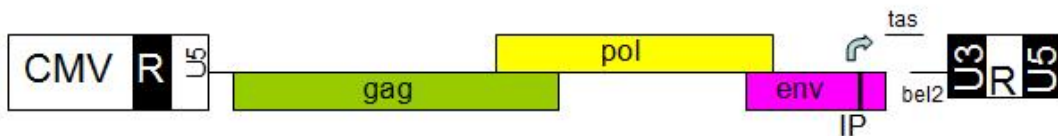
Die Grundlage bildeten bei der Bearbeitung die in 4.1. gezeigten Varianten der purinreichen Sequenzen, die Elemente A-, A+, B-, ... A-D+. Diese – in verschiedenen Plasmiden verwendet – zeigten in mehreren Experimenten vielfältige Einflüsse auf die Replikation von PFV, welche nicht alle die reverse Transkription betrafen.

Als Grundlagenexperiment galt für diese Arbeit die Untersuchung der Replikationseffizienz von PFV im proviralen Kontext von pCHSRV2, einem Plasmid, welches ein replikationsfähiges Virus darstellt (4.3.1). Hier waren alle Einflüsse, die eine Mutation auf die Replikation hatte, zusammenfassend messbar. Um einen reinen Einfluss der Mutationen auf die reverse Transkription zeigen zu können, mussten umgekehrt andere Einflüsse der Mutationen ausgeschlossen werden. Der Einfluss der Mutationen auf die Pol-Funktion, hier als „Pol-Effekt“ bezeichnet, wurde im pCpol2-Vektor-Hintergrund untersucht (4.4 ff.). Um den „Pol-Effekt“ aus dem Grundlagenexperiment zu eliminieren, wurde ein modifiziertes

Grundlagenexperiment mit proviralem Hintergrund bei modifiziertem Wildtyp-Plasmid pcHSRV2 M54 durchgeführt (4.5.1).

Das Vektorsystem pMD9 fand Anwendung, um den Einfluss der Mutationen unabhängig von Effekten auf die Proteinfunktion zu untersuchen. Im viralen Vektorkontext findet es sich mit Fragestellung nach Transduktionseffizienz, Proteinproduktion und Zusammensetzung von viralen Partikel wieder in 4.6.1, 4.6.2 und 4.6.3.

### 4.3 Das Grundlagenexperiment: Replikationseffizienz im proviralen Kontext



**Abb. 12 Wildtyp-Plasmid pcHSRV2**

Hinter einem CMV-Promotor, welcher unabhängig von Tas funktioniert, finden sich die für die Integration wichtigen Sequenzen, sowie das volle foamyvirale Genom.

Der infektiöse PFV-Vollängenklon pcHSRV2 erlaubte die Untersuchung der Virusreplikation im proviralen Kontext. pcHSRV2 (s. Abb. 12) ist ein Plasmid, von welchem nach dessen Aufnahme in die Zelle virale Proteine produziert und Kopien des viralen Erbguts exprimiert werden. Aus den transfizierten Zellen werden Viruspartikel freigesetzt, die man als Überstand abnehmen und weiterverwenden kann. In diesem Versuch wurden 293T-Zellen mit der Polyfect-Methode transfiziert, der Überstand wurde nach 48 h abgenommen und auf BHK/LTR lacZ-Zellen transferiert. BHK/LTR lacZ-Zellen eignen sich als Indikatorzellen für foamyvirale Replikation, da an einen Promotor ein für einen Farbstoff kodierendes Gen, das lacZ-Gen, gekoppelt ist. Tas wird von sich replizierenden FV produziert und aktiviert den Promotor einer infizierten BHK/LTR lacZ-Zelle, was nach bestimmten Färbeschritten zu einer Blaufärbung der Zelle führt (s. Methoden 3.2.8). Nach 48 h wurde die Anzahl der verfärbten Zellen ausgezählt, die also

einen Replikationszyklus von PFV markierten. Als Referenz dienten die mit dem Wildtyp-Plasmid pcHSRV2 infizierten Zellen. Als Negativkontrolle mit pcDNA transfizierte Zellen, welche keinen Farbumschlag anzeigen sollten bzw. als Marker für die falsch positiven Färbungen dienten.

Alle bereits oben erwähnten Varianten wurden für diesen Versuch in pcHSRV2 kloniert. Das Wildtyp-Plasmid pcHSRV2 blieb unverändert. Einen Überblick über die 15 Plasmide zeigt Tab. 13.

**Tab. 13: pcHSRV2-Varianten**

<b>Wildtyp</b>	<b>Minusvarianten</b>	<b>Plusvarianten</b>
pcHSRV2	pcHSRV2 A- pcHSRV2 B- pcHSRV2 C- pcHSRV2 D-	pcHSRV2 A+ pcHSRV2 B+ pcHSRV2 C+ pcHSRV2 D+
<b>Kombinationsmutanten</b>	pcHSRV2 AuB- pcHSRV2 CuD- pcHSRV2 A-D-	pcHSRV2 AuB+ pcHSRV2 CuD+ pcHSRV2 A-D+

Die Replikationseffizienz wurde anhand der Anzahl der blau verfärbten BHK/LTR lacZ-Zellen bestimmt. Die Bestimmung der Titer der von den 293T-Zellen gewonnenen Überständen erfolgte in Verdünnungen von 1:1.000 und 1:10.000. Die Berechnung der Virustiter erfolgte aus insgesamt fünf Experimenten.

### 4.3.1 Replikationseffizienz

Die Bestimmung der Titer zeigte eine deutliche Reduktion der Replikationseffizienz fast aller Mutanten im proviralen Kontext. Lediglich die Titer der Mutanten C-, D- und CuD- bewegten sich im Bereich des Wildtyp-Plasmids. Bei Reduktion der Originalpurin-Zahl in den Varianten C+, D+ und CuD+ fielen jedoch die Titer ab – bis um das zehnfache bei D+ und auf nicht mehr detektierbare Werte bei C+. Die Kombinationsmutanten verhielten sich jeweils analog zu den Einzelmutanten, der Titer richtete sich dabei nach dem bei der

Einzelmutation gemessenen schwächeren Titer. Die Varianten B-, C+, AuB-, AuB+, A-D- und A-D+ waren replikationsinkompetent.

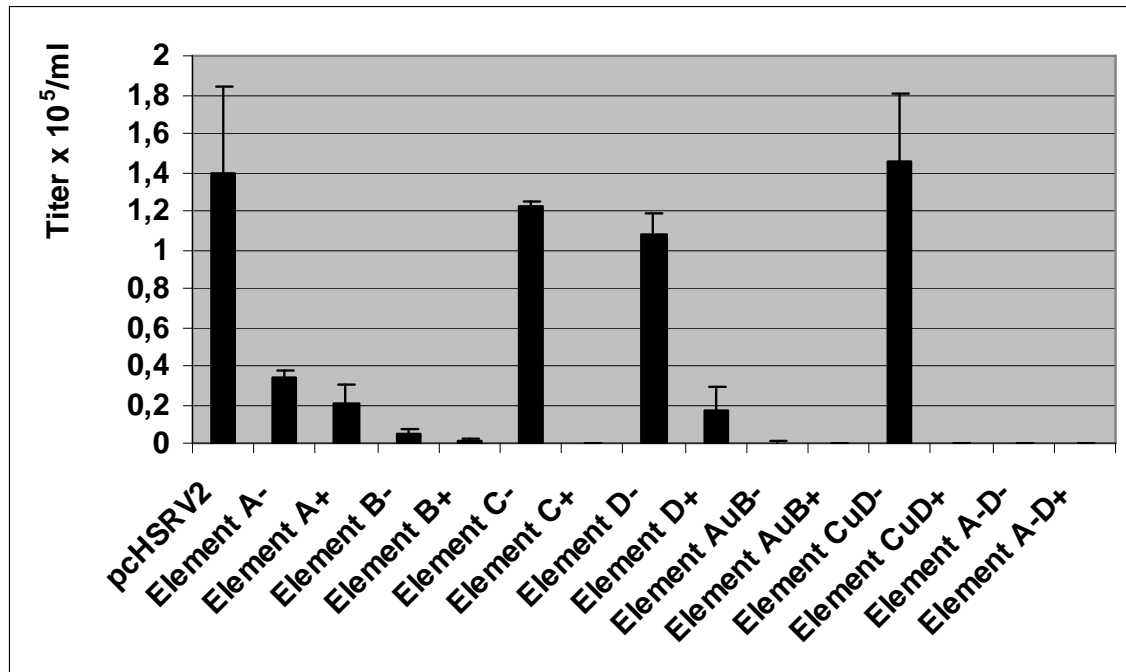


Abb. 13 Titration der pcHSRV2-Varianten

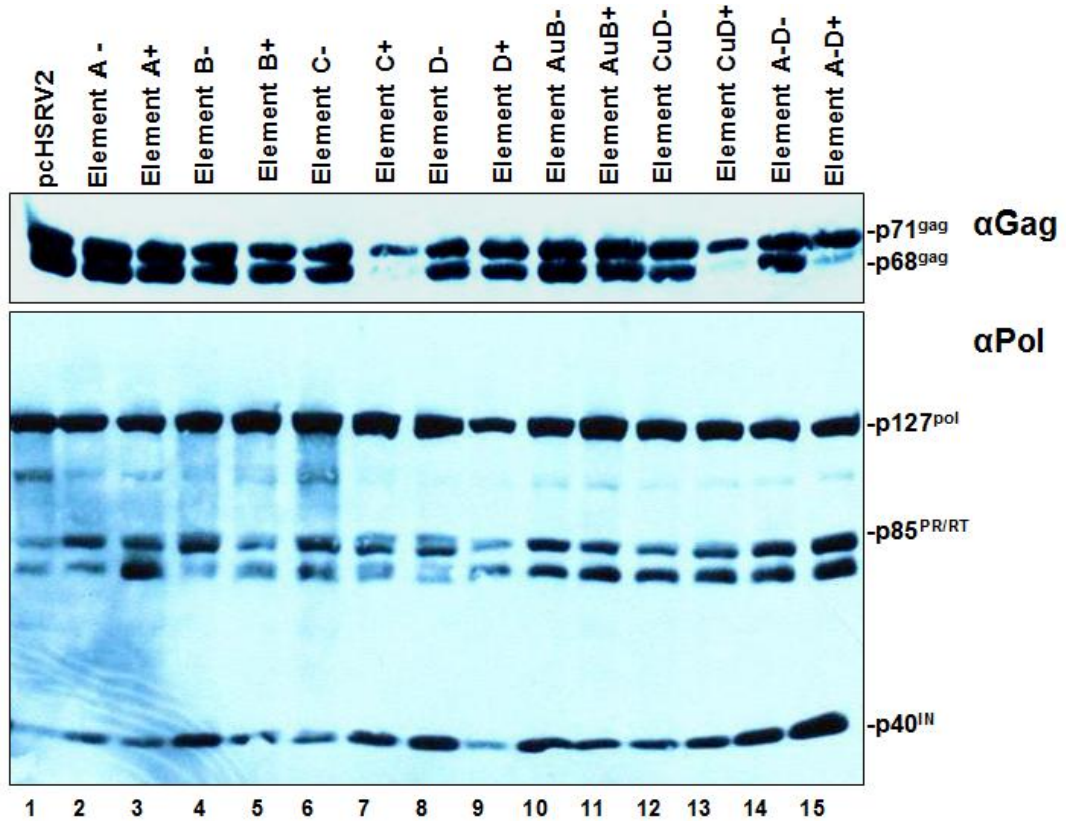
Titer x 10<sup>5</sup>/ml. pcHSRV2 als Wildtyp-Plasmid erreicht einen Titer von ca. 1,4 x 10<sup>5</sup> Viruskopien/ml. Lediglich die Elemente C-, D- und CuD- erreichen annähernd gleiche Titer. Die Fehlerbalken bezeichnen den Standardfehler aus fünf Titrationen.

### 4.3.2 Untersuchung der Proteinproduktion

Zu allen Titrationen wurde die Proteinproduktion mittels SDS-Page und Western Blot (s. Methoden 3.3.2 und 3.3.3) untersucht, um einen möglichen Effekt der Mutationen auf die Produktion der für die Partikelzusammensetzung essentiellen Proteine zu zeigen. Ein solcher Effekt würde ebenfalls zu einer Reduktion der Titer führen, die aber nicht in Zusammenhang mit der möglichen Rolle der jeweiligen purinreichen Sequenz als Zweitinitiationsort der Plus-Strang-Synthese stünde.

Aus den mit den Plasmiden transfizierten 293T-Zellen wurden Zell-Lysate hergestellt und diese bei – 80°C bis zu ihrer Analyse eingefroren. Schließlich wurden sie auf das Vorhandensein von viralen Proteinen mittels SDS-Page und Western Blot untersucht.

Der Proteinnachweis erfolgte mit dem Antikörper Sgg-1 für Gag und den Antikörpern 3E11 und 15E10 für Pol (s. Material 2.6).



**Abb. 14** Western Blot-Analyse von 293T-Zell-Lysaten nach Polyfect-Transfektion mit pcHSRV2 (Spur 1) und Varianten (Spur 2 bis 15).

Oben Gag (Precursor bei 71 kD und prozessiertes Gag bei 68 kD), unten Pol (Precursor mit 127 kD, unspezifische Bande zwischen 127 und 85 kD, PR/RT-Untereinheit mit 85 kD, unspezifische Bande zwischen 85 und 40 kD, IN-Untereinheit bei 40 kD).

Während die Pol-Produktion in allen Mutanten gleichmäßig war (unterer Blot), zeigte sich in allen Varianten mit C+ eine verminderte Gag-Produktion (oberer Block). Auch die Prozessierung von Gag fiel geringer aus, trotz durch den Pol-Blot belegter immer gleichmäßig vorhandener viraler Enzymmenge. Es fielen des Weiteren unspezifische Banden zwischen 40 kD und 85 kD und zwischen 85 und 127 kD auf.

Für die LTR lacZ-Titration konnten für die Varianten mit C+ nach diesen Ergebnissen niedrigere Titer erwartet werden, begründet durch eine verminderte Gag-Produktion.

### 4.3.3 Zusammenfassung des Grundlagenexperiments

Die Untersuchung im proviralen Kontext eignete sich hervorragend, um direkt jeglichen Einfluss der Mutationen der purinreichen Sequenzen auf die Replikation aufzudecken. Es musste jedoch berücksichtigt werden, dass die Mutationen auch andere negative Einflüsse haben könnten, wie etwa auf die Proteinproduktion. Im Western Blot hatte sich eine deutlich reduzierte Gag-Produktion und eine nur schwache Gag-Prozessierung in allen Varianten mit C+ gezeigt. Im von den 293T-Zellen entnommenen Überstand hatten sich also in Ermangelung des für den Aufbau des Viruspartikels essentiellen Gags aus diesem Grunde weniger infektiöse Viren befunden. Dies schlug sich als nicht mehr detektierbarer Titer in der LTR lacZ-Titration nieder. Doch ist dieser vermutlich nicht als Ausdruck eines Einflusses des Elements C auf die reverse Transkription, sondern als Zeichen einer verminderten Gag-Produktion zu werten.

Des Weiteren musste auch ein anderer Einfluss der Mutationen berücksichtigt werden: In Mutante C- hingen noch neun Originalpurine, in Mutante C+ nur noch zwei zusammen. Hierdurch konnte zwar die Zahl der Originalpurine auf deutlich unter fünf (analog zu Charneau et al., 1992) reduziert werden, aber so mussten in Variante C+ auch drei Aminosäuren ausgetauscht werden. Hierbei stellte sich natürlich die Frage nach der Pol-Funktionalität, insbesondere der IN-Funktion, welche durch Veränderungen der Aminosäuresequenz beeinträchtigt sein könnte. Die räumliche Struktur eines Enzyms ist verantwortlich für seine Funktion und eine Veränderung derselben in der IN würde den Replikationszyklus behindern. Das Provirus kann im Falle einer minderfunktionalen IN nicht ausreichend ins 293T-Genom integrieren. Um diesen eventuellen Nebeneffekt auf die Titrationsergebnisse zu untersuchen, wurden alle Mutationen in pCpol2, einem Expressionsplasmid für Pol, eingeführt und dieses im Vier-Plasmid-System weiter untersucht.

## 4.4 Pol-Funktionalität

### 4.4.1 Überprüfung der Pol-Funktionalität

Da sich die eingeführten Mutationen im für die IN kodierenden Abschnitt von pol befinden, bestand die Möglichkeit eines negativen Effektes der Mutationen auf die Pol-Funktionalität. Deshalb wurde zur Untersuchung der Pol-Funktionalität das Vier-Plasmid-System mit den Plasmiden pCpol2, pCenv, pCgag2 und pMD9 verwendet, wobei die 15 Mutationen in pCpol2 kloniert wurden – resultierend in den in Tab. 14 aufgeführten Plasmiden.

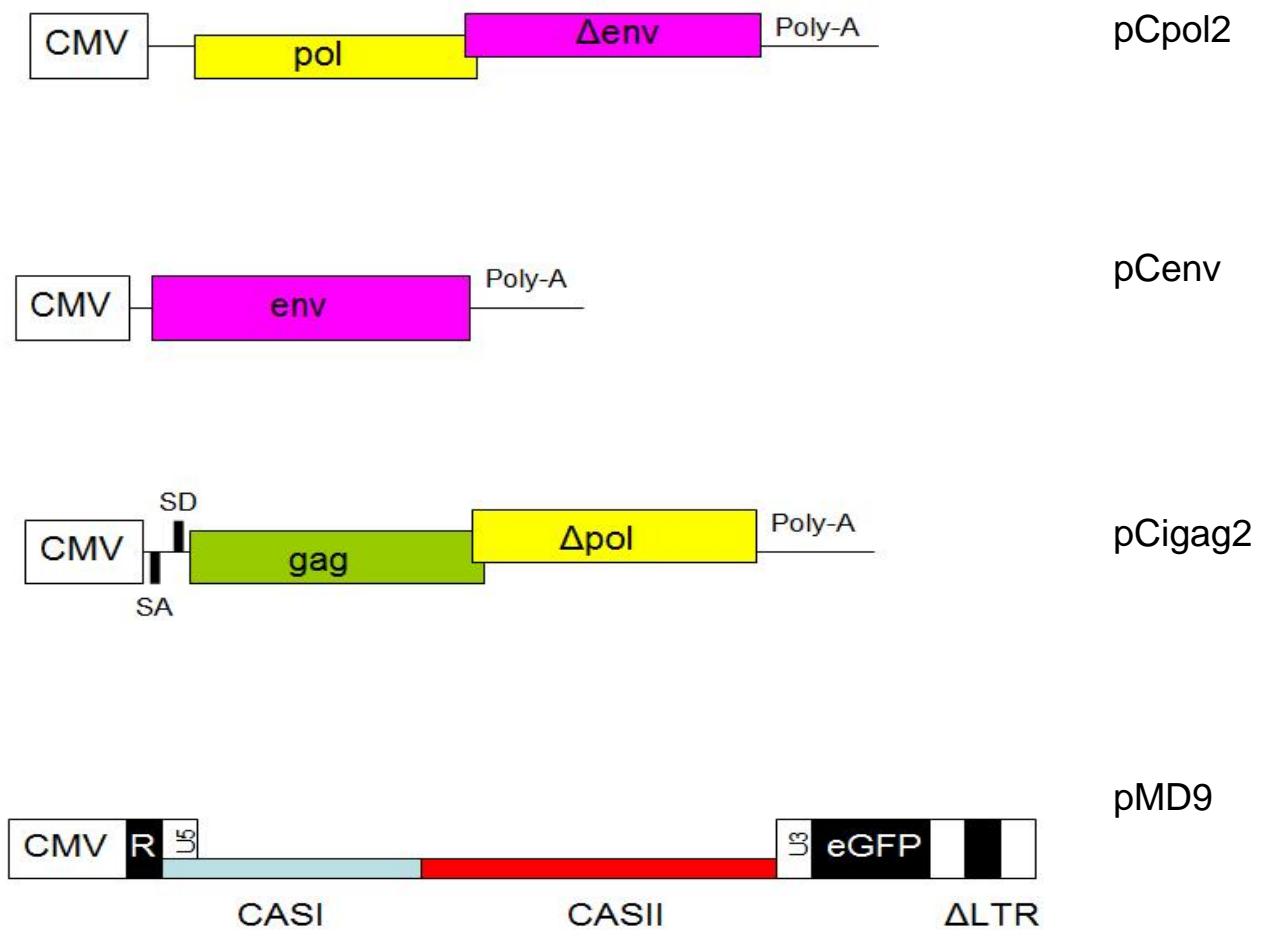
Tab. 14: pCpol2-Varianten

<b>Wildtyp</b>	<b>Minusvarianten</b>	<b>Plusvarianten</b>
pCpol2	pCpol2 A- pCpol2 B- pCpol2 C- pCpol2 D-	pCpol2 A+ pCpol2 B+ pCpol2 C+ pCpol2 D+
<b>Kombinationsmutanten</b>	pCpol2 AuB- pCpol2 CuD- pCpol2 A-D-	pCpol2 AuB+ pCpol2 CuD+ pCpol2 A-D+

293T-Zellen wurden mit der jeweiligen pCpol2-Variante, Expressionsplasmiden für gag (pCgag2) und env (pCenv), sowie dem Plasmid pMD9, einem PFV-Vektor, transfiziert. pMD9 enthält die für die Pol-Inkorporation ins foamyvirale Partikel notwendigen Sequenzen CASI und CASII (Heinkelein et al., 2002a; Peters et al., 2005), sowie ein für eGFP (ein grün fluoreszierendes Protein, welches im FACS nachweisbar ist) kodierendes Gen.

Die von den 293T-Zellen produzierten Viruspartikel wurden als Überstand nach 48 h abgenommen. Es erfolgte ein Überstand-Transfer auf HT1080-Zellen. Im FACS wurde nach Aufbereitung der Zellen die Transduktionseffizienz bestimmt, gemessen an der Anzahl der fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl. Eine Besonderheit des Vier-Plasmid-Systems besteht darin, dass

nach Virus-Zusammensetzung, dem „Assembly“, nur noch ein einziger Replikationszyklus statt finden kann, da kein vollständiges virales Genom vorhanden ist (Einzelheiten s. Methoden 3.2.5.1). Dieser Zyklus fand auf den HT1080-Zellen statt, die durch Integration des im pMD9-Vektor enthaltenen eGFP-Gens einen im FACS detektierbaren Farbstoff produzierten.



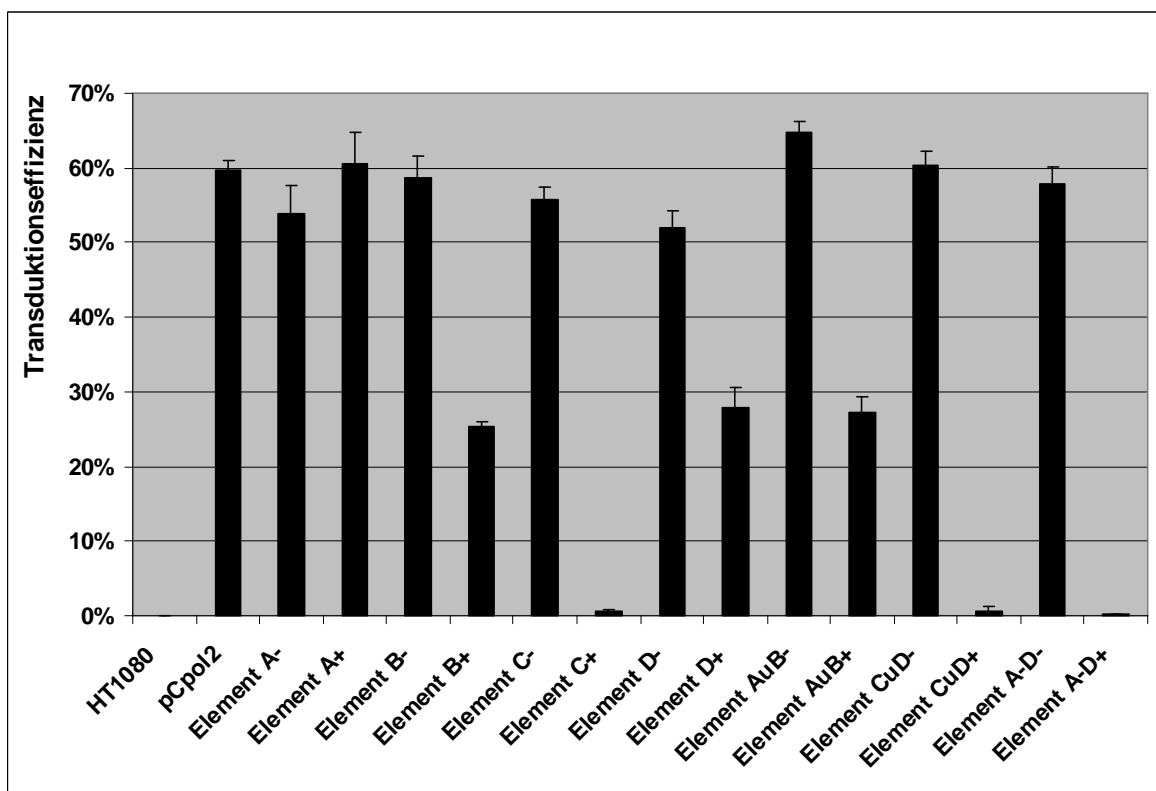
**Abb. 15 Plasmide, die im Vier-Plasmid-System verwendet wurden**

pCpol 2 (durch CMV-Promotor getrieben, wie alle anderen Plasmide) kodiert für die viralen Enzyme und einen Teil von Env, es enthält einen teilweise deletierten env-Leserahmen ( $\Delta env$ ). pCenv kodiert alleine für die Hüllproteine. pCigag2 kodiert für das Capsid und einen Teil von Pol, es enthält einen teilweise deletierten pol-Leserahmen ( $\Delta pol$ ). pMD9 enthält die für die Integration wichtigen Sequenzen CASI und CASII, d.h. die verpackbare RNA in diesem Experiment.



Als Referenz dienten hierbei immer die HT1080-Zellen, welche mit Überstand aus den mit Wildtyp-pCpol2-Plasmid transfizierten 293T-Zellen transduziert worden waren. Als Negativkontrolle wurden nicht transduzierte HT1080-Zellen verwendet, welche keine Produktion des Fluoreszenzmarkers zeigen sollten.

Die Ergebnisse rekrutierten sich aus vier Messungen. Die Transduktionseffizienz der Minus-Varianten lag hierbei im Bereich des Wildtyp-pCpol2. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Pol-Funktionalität bei Varianten mit B+ und D+, Varianten mit C+ waren transduktionsdefizient, was wahrscheinlich auf den dreifachen Aminosäureaustausch zurückzuführen war.



**Abb. 16 Transduktionseffizienz der Mutanten in pCpol2**

Die FACS-Ergebnisse beziehen sich alle auf das Wildtyp-Plasmid pCpol2, welches eine gemessene eGFP-Fluoreszenz von ca. 60% zeigt (2. Balken). Als Negativwert wurden nicht-transduzierte HT1080-Zellen vermessen (1. Balken, der bei 0% liegt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus vier Messungen an.

Die nicht transduzierten HT1080-Zellen zeigten wie zu erwarten keine Fluoreszenz.

Die Varianten mit den Mutationen A-, A+, B-, D-, AuB-, A-D- zeigten die gleiche Pol-Funktionalität wie das Wildtyp-pCpol2.

#### 4.4.2 Pol-Funktionalität und Bedeutung für das Grundlagenexperiment

Eine Minderung der Pol-Funktionalität konnte für alle Varianten, welche die Mutationen B+, C+ und D+ enthielten, bei welchen also Aminosäuren in der viralen Integrase ausgetauscht worden waren, gezeigt werden. Insbesondere die Varianten mit C+ hatten drei Aminosäure-Veränderungen erfahren; bei Variante A+ hatte dies die Pol-Funktionalität nicht verändert.

Somit ließen in Hinsicht auf die Pol-Funktionalität nur die Titrations der Varianten A-, A+, B-, C-, D-, AuB-, CuD- und A-D- eine Aussage über die Replikationseffizienz durch die lacZ-Titration im Grundlagenexperiment zu.

Zur Rekapitulation: Eine Titerreduktion im Grundlagenexperiment zeigte sich in den Varianten A-, B- und D-, sowie analog in AuB- (entsprechend der schwächeren Mutante B-) und CuD- (unter Berücksichtigung des Standardfehlers vermutlich auch entsprechend der schwächeren Variante D-), sowie in der alle Mutationen vereinigenden Variante A-D-.

Die eingeführten Mutationen hatten sich im Falle der Varianten B+, C+ und D+ als nicht geeignet zur Untersuchung im proviralen Kontext erwiesen, weil - wie in 4.4.1 gezeigt - andere Einflüsse messbar geworden waren.

Um den Effekt der Pol-Funktionalitätsminderung – der im Folgenden als "Pol-Effekt" bezeichnet wird – auszuschließen und doch die Varianten mit Element B+, C+ und D+ in einer Titration vergleichen zu können, wurden nicht-Pol-produzierende pHSRV2-Varianten kloniert und mit funktionalen Pol-Plasmiden kotransfiziert.

## 4.5 Das modifizierte Grundlagenexperiment

### 4.5.1 Replikationseffizienz im proviralen Kontext unter Ausschaltung des „Pol-Effektes“



**Abb. 17 Modifiziertes pcHSRV2-Plasmid: pcHSRV2 M54**

Durch Austausch des Startcodons ATG durch CTG wird Pol nicht translatiert, so dass verpackbare RNA, die Gag- und Env-Proteine entstehen, aber kein Pol gebildet werden kann.

Die Einführung von Mutationen in Pol hatte in einigen Fällen zur Reduktion der Enzym-Funktionalität geführt (Vgl. 4.4). Deshalb wurde ein Plasmid-System benötigt, in welchem nicht der Effekt des minderfunktionalen Pols gemessen werden konnte. Hierzu wurden die Mutationen in pcHSRV2 M54 eingeführt, einem Plasmid, in dem das pol-Startcodon ATG durch CTG ersetzt wurde (s. Abb. 17). Dadurch wird pol-mRNA zwar gebildet, eine Translation findet jedoch nicht statt. Pol wurde hier vom zugesetzten Wildtyp-pCpol2 exprimiert.

Es wurden die 15 pcHSRV2 M54-Varianten je mit pCpol2 mittels Polyfect-Transfektion in 293T-Zellen eingebracht. Nach 48 h erfolgte der Überstandtransfer auf BHK LTR lacZ-Zellen analog zum Grundlagenexperiment (Vgl. 4.3.1).

Die 293T-Zellen wurden wie bei den Versuchen mit den pcHSRV2-Varianten zu Zell-Lysaten verarbeitet und mittels Western Blot analog zu 4.3.2 auf virale Proteine untersucht.

## 4.5.2 Replikationseffizienz

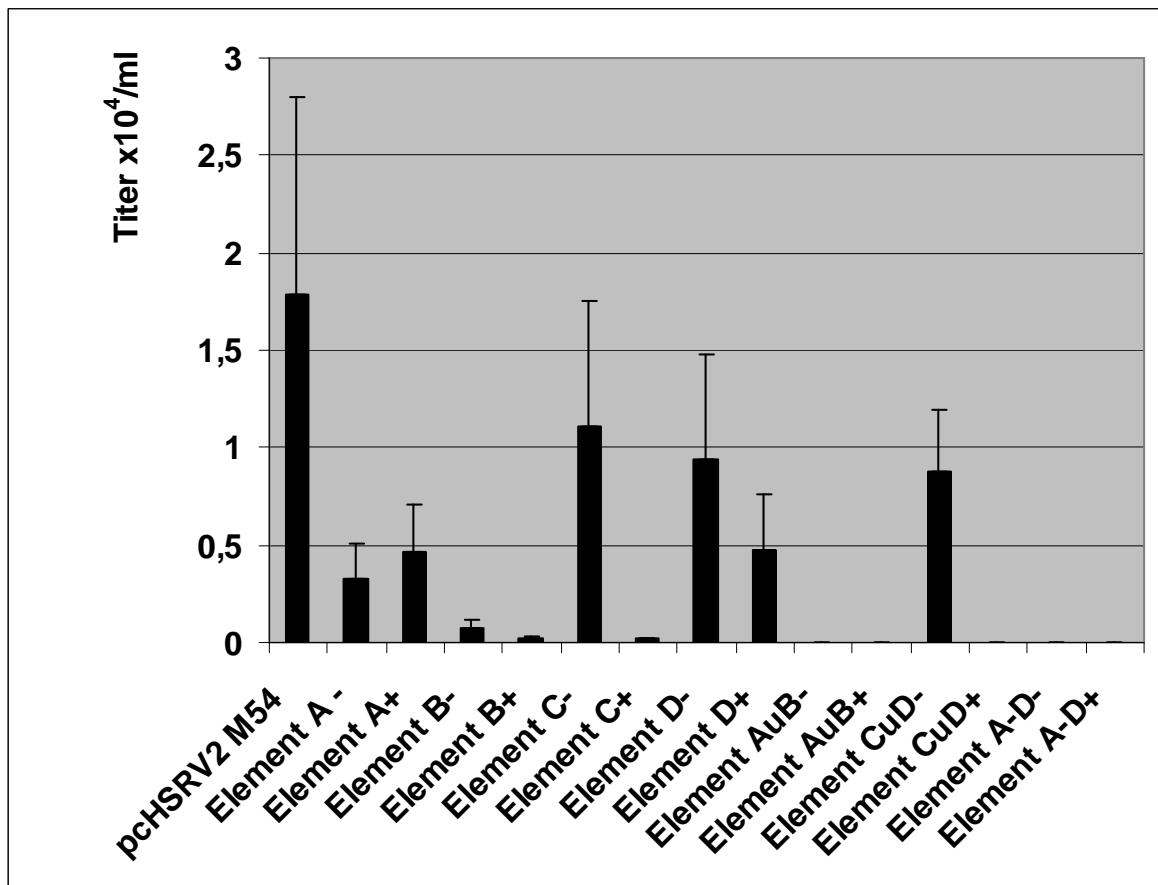


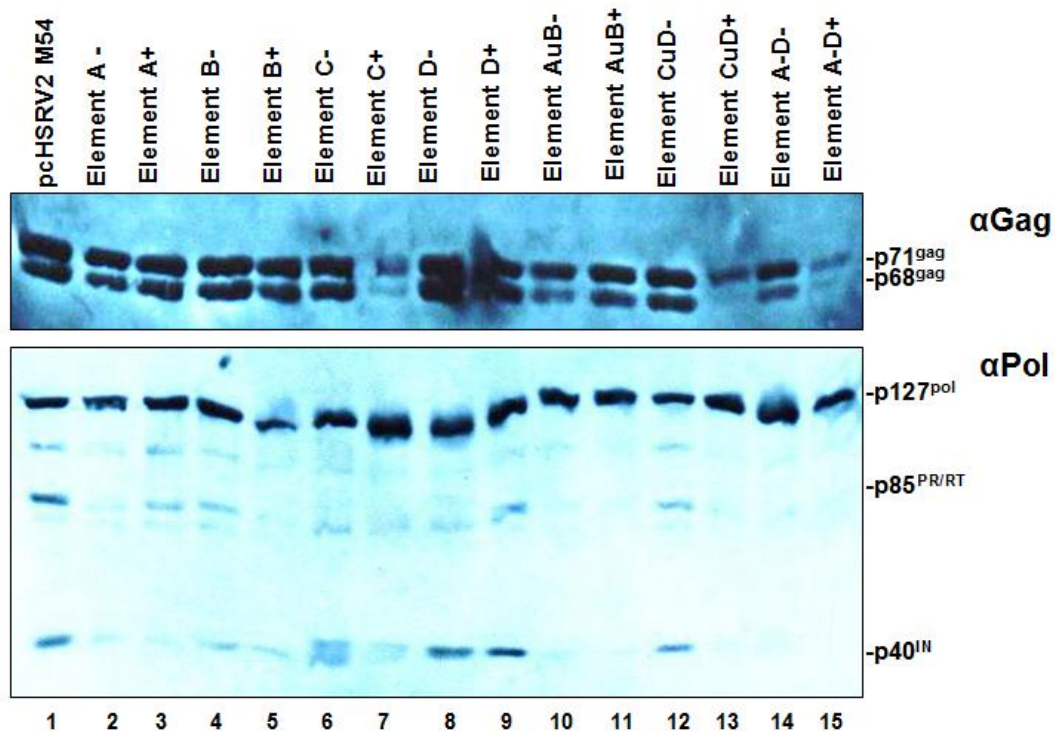
Abb. 18 Titration der pcHSRV2M54-Varianten x 10<sup>4</sup> /ml

Als Referenzwert diente das Wildtyp-Plasmid pcHSRV2 M54 mit ca.  $1,6 \times 10^4$  Viruskopien/ml (1. Balken). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus drei Titrationen an.

Im Verhältnis zum Wildtyp-Plasmid pcHSRV2 M54 zeigten alle Varianten eine Titerreduktion, auch die Varianten mit C- und CuD-, welche in der pcHSRV2-Titration keine Titerreduktion gezeigt hatten. Erklärbar ist dies eventuell dadurch, dass sich die Ergebnisse aus beiden Titrationen innerhalb ihrer Standardfehler bewegen. Die im FACS durch den Pol-Effekt aufgefallenen Varianten B+ und D+ zeigten auch unter der beabsichtigten Ausschaltung dieses Effektes eine deutliche Titerreduktion.

### 4.5.3 Untersuchung der Proteinproduktion

Die Untersuchung der pcHSRV2 M54-Zell-Lysate, die mit drei unabhängigen Transfektionen durchgeführt wurde, bestätigte das Ergebnis der pcHSRV2-Versuche. Alle Varianten zeigten eine gleichmäßige Pol-Expression, begründet durch die Kotransfektion der Zellen mit pCpol2.



**Abb. 19 Western Blot der 293 T-Zell-Lysate nach Polyfect-Transfektion mit pcHSRV2 M54**

und pCpol2 (Spur 1) und (Spur 2 bis 15) pcHSRV2 M54-Varianten je mit pCpol2. Im Pol-Blot sind unspezifische Banden zwischen 127 kD und 85 kD und zwischen 40 und 85 kD zu sehen.

Auch hier fiel in allen Varianten mit C+ auf, dass die Gag-Produktion und das prozessierte Gag trotz regelmäßig vorhandener Enzymmenge vermindert waren. Wie im Western Blot des Grundlagenexperiments waren unspezifische Banden zwischen 40 kD und 85 kD und zwischen 85 kD und 127 kD sichtbar.

#### 4.5.4 Zusammenfassung

Die Titerreduktionen in Varianten mit Element C+ gingen vermutlich auf eine verminderte Gag-Produktion zurück, wie in den Untersuchungen zur Proteinproduktion der pcHSRV2- und pcHSRV2 M54-Varianten gezeigt wurde (Vgl. 4.3.2, 4.5.3). Im Vergleich zum Wildtyp führten Varianten mit Element C- nur zu geringfügig niedrigeren Titern im Grundlagen- und modifizierten Grundlagenexperiment (Vgl. 4.3.1 und 4.5.1). Deswegen konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht belegt werden, dass das Element C einen Einfluss auf die reverse Transkription hat. Es wurde jedoch ein Einfluss des Elementes C auf die Gag-Produktion gezeigt.

Die restlichen Varianten bedingten keine Minderung der Proteinproduktion, wohl aber einen Abfall der Titer unter Ausschluss des Pol-Effekts in der pcHSRV2 M54-Titration, was einen Hinweis darauf gab, dass die Elemente A, B und D einen Einfluss auf die reverse Transkription haben könnten.

Wie bereits erwähnt, zeigte sich eine Diskontinuität auf der Plusstrang-DNA am 5'-Ende des Elements D, was die Vermutung nahelegte, das Element D einen zweiten Initiationsort für die reverse Transkription darstellt (Tobaly-Tapiero et al., 1991). In Diskrepanz hierzu waren die Titerreduktionen der Varianten des A- und B-Elements deutlicher als jene des Elements D-. Ohne Berücksichtigung weiterer Nebeneffekte bestand die Möglichkeit, dass die Elemente A, B und D einen möglichen zweiten Initiationsort der reversen Transkription darstellten.

Um den Einfluss der Mutationen auf die Pol-Funktionalität und die Proteinproduktion auszuschließen, wurde ein weiteres Plasmid-System verwendet und die vier Elemente und deren Mutationen im Kontext des viralen Vektors pMD9 miteinander verglichen.

## 4.6 Untersuchung der Transduktionseffizienz im viralen Vektor-Kontext mit pMD9

Die 15 Varianten wurden in den Vektor pMD9 kloniert. Unter Ausschluss eines Effektes der Mutationen auf die virale Proteinproduktion und die Pol-Funktionalität konnte so die Transduktionseffizienz des viralen Vektors pMD9 und hiermit die „reinen“ Effekte der mutierten purinreichen Sequenzen auf Nukleinsäureebene untersucht werden. Die verwendeten Plasmide zeigt Tab. 15.

Tab. 15: pMD9-Varianten

<b>Wildtyp</b>	<b>Minusvarianten</b>	<b>Plusvarianten</b>
pMD9	pMD9 A- pMD9 B- pMD9 C- pMD9 D-	pMD9 A+ pMD9 B+ pMD9 C+ pMD9 D+
<b>Kombinationsmutanten</b>	pMD9 AuB- pMD9 CuD- pMD9 A-D-	pMD9 AuB+ pMD9 CuD+ pMD9 A-D+

pMD9 enthält die für den Vektortransfer benötigten Sequenzen CASI und CASII, generiert selber aber keine viralen Proteine (Heinkelein et al., 2002a). Die Expression des Plasmids ist an einen CMV-Promotor gekoppelt anstatt an einen Tas-Promotor wie im Wildtypvirus, so dass eine Tas-Produktion nicht für die Plasmidexpression benötigt wird. Das für Tas kodierende Gen ist nicht in pMD9 enthalten, ebenso wenig env, gag oder vollständiges pol. Die Elemente A bis D sind Bestandteile der CAS-Sequenzen. Die viralen Proteine für die Transduktion stammen von kotransfizierten, funktionalen Plasmiden. Ein Abfall der Transduktionseffizienz war somit zurückführbar auf Vorgänge auf dem Level der reversen Transkription oder der Verpackung der entstehenden Virusbestandteile. Ebenfalls interessant war dieses Experiment in Hinblick darauf, dass bisher als effizientester Vektor für eine foamyvirale Gentherapie pMD9 gilt und in diesem

Versuchsaufbau getestet werden konnte, ob und wie die Elemente A bis D zum Erfolg einer Vektortransduktion beitragen.

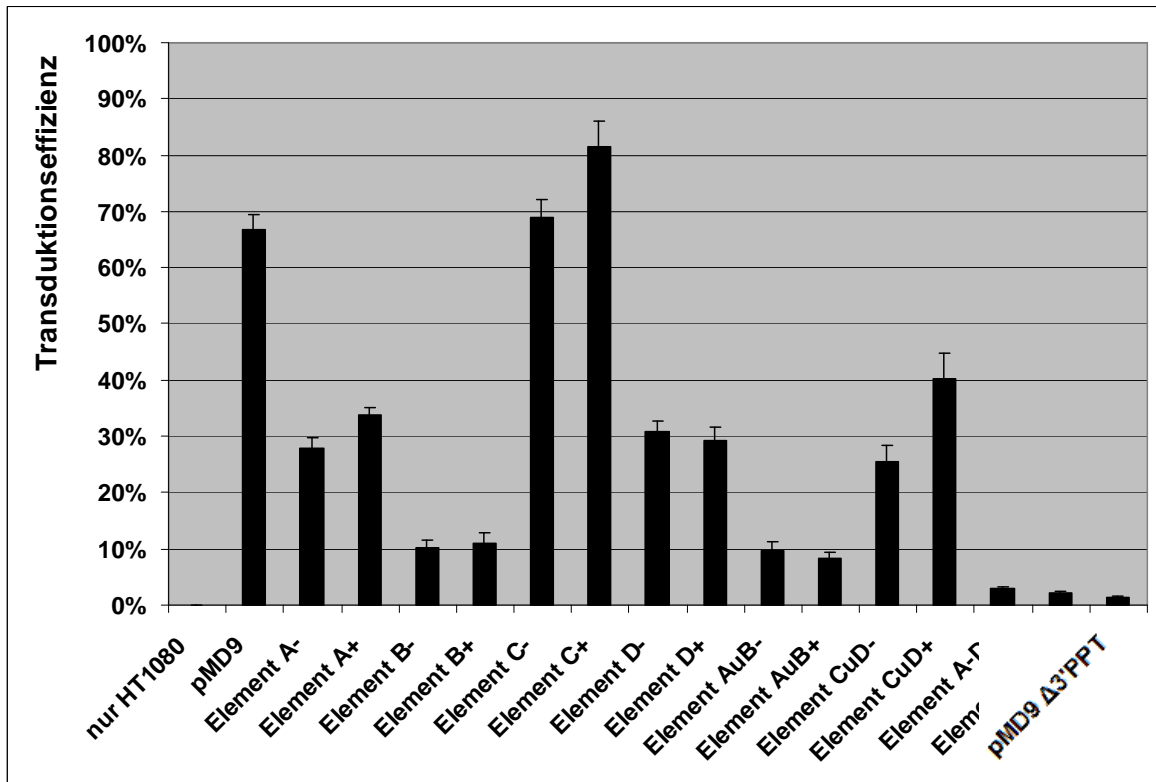
Es erfolgte eine Transfektion im Vier-Plasmid-System mit der jeweiligen pMD9-Variante und einem Expressionsplasmid für Env (pCenv), Gag (pClgag2) und Pol (pCpol2).

Zunächst wurde in Zell-Lysaten die gleichmäßige Produktion der viralen Proteine mittels SDS-Page und Western Blot-Analyse gezeigt. Schließlich erfolgte eine Präparation der Viruspartikel und eine Analyse derselben auf Vorhandensein von Gag und Pol, welche für ein funktionierendes Viruspartikel nötig sind (s. Methoden 3.4). Die Transduktionseffizienz selber wurde mittels FACS überprüft (s. Methoden 3.2.9).

### 4.6.1 Transduktionseffizienz

Im FACS zeigte sich, dass nur die Varianten mit C- und C+ eine ähnliche Transduktionseffizienz wie das Wildtyp-pMD9 aufwiesen. Die anderen Varianten erreichten nur etwa die Hälfte (A-/ A+/ D-/ D+/ CuD-/ CuD+) oder noch weniger der ursprünglichen Transduktionseffizienz (B-/ B+/ AuB-/ AuB+/ A-D-/ A-D+). Die Transduktionsrate der Vierfachmutanten entsprach der als Referenz verwendeten  $\Delta 3'PPT$ -Variante, bei welcher der 3'PPT deletiert worden war. Die  $\Delta 3'PPT$ -Variante selber stellt keinen Initiationsort zur Plusstrangsynthese bei der reversen Transkription zur Verfügung, so dass bei einer Transfektion zwar zunächst verpackbare RNA synthetisiert wird, aber die entstehenden Partikel nicht infektiös sind.

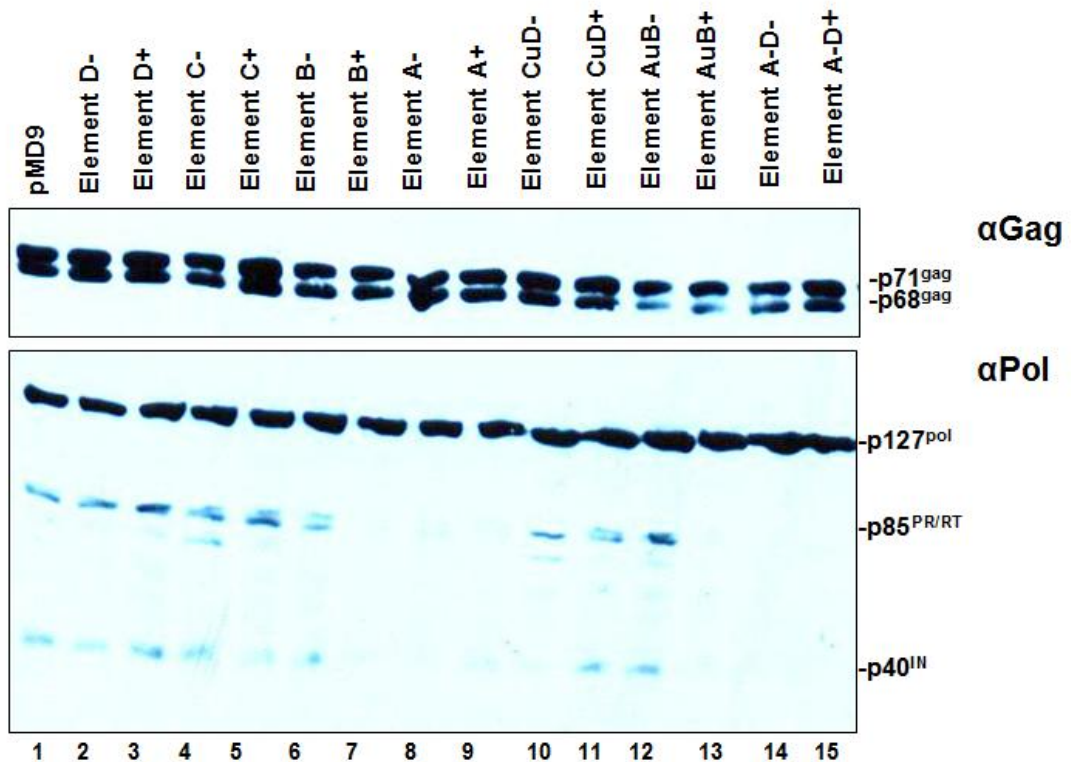




**Abb. 20** Transduktionseffizienz der Element-Mutanten in pMD9

Als Referenzwert diente das Wildtyp-Plasmid pMD9, bei welchem im FACS eine eGFP-Fluoreszenz von ca. 65% gemessen wurde (2. Balken). Als Negativwert diente das FACS-Ergebnis von nicht-transduzierten HT1080-Zellen (1. Balken, der bei 0% liegt). Die  $\Delta$ 3'PPT-Variante entspricht der Variante pMD9 ohne 3'PPT. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus vier Messungen an.

#### 4.6.2 Proteinproduktion der transfizierten Zellen



**Abb. 21 Western Blot-Analyse der 293T-Zell-Lysate nach PEI-Transfektion mit pMD9, pCenv, pCgag2 und pCpol2**

(Spur 1) und pMD9-Varianten je mit pCenv, pCgag2 und pCpol2. Als Negativkontrolle dienten 293T-Zellen, welche mit pcDNA transduziert worden waren (nicht gezeigt).

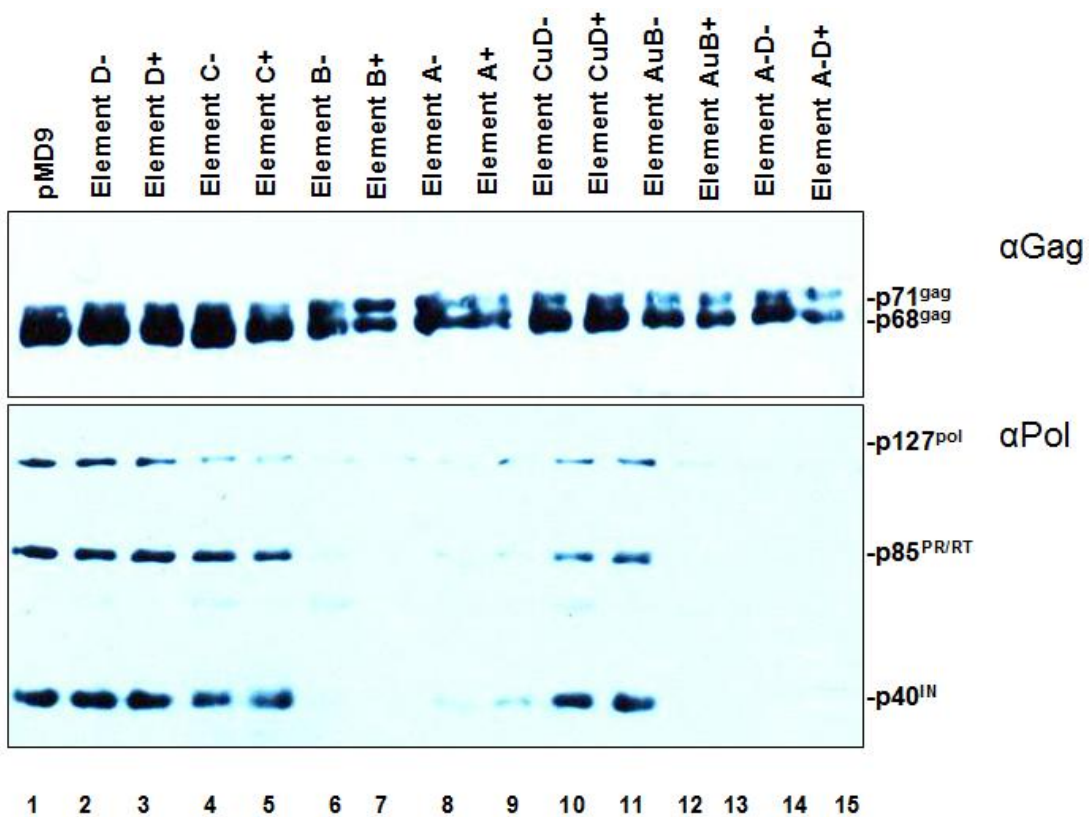
In den Zell-Lysaten der mit den pMD9-Varianten und den drei Expressionsplasmiden für die viralen Proteine transfizierten Zellen konnte eine gleichmäßige Produktion des Pol-Vorläuferproteins bei 127 kD und Gag bei 71 kD für alle Varianten gezeigt werden, wie es bei funktionalen Wildtyp-Expressionsplasmiden für die viralen Proteine zu erwarten war. Die Banden für die PR/RT (85 kD) und IN (40 kD) erschienen bei einigen Varianten schwächer. Die Gag-Prozessierung als Ausdruck der PR-Funktion war aber bei allen Varianten gleichmäßig zu erkennen.

### 4.6.3 Untersuchung der Partikel auf virale Proteine

In den nach Transduktion gewonnenen Viruspartikeln wurde das Vorhandensein der viralen Proteine untersucht, um eventuelle Einflüsse der Mutationen auf die Inkorporation von Gag und Pol in die Viruspartikel aufzudecken.

Es zeigte sich ein regelmäßiges Signal von Gag in allen Varianten.

Allerdings war die Pol-Inkorporation in allen Varianten, welche die Mutationen A-, A+, B- und B+ enthielten, stark vermindert. Die Gag-Prozessierung war trotz geringerer Pol-Menge nicht beeinträchtigt.



**Abb. 22 Western Blot-Analyse der Partikelpräparation**

aus den mit pMD9, pCenv, pClgag2 und pCpol2 (Spur 1) PEI-transfizierten 293T-Zellen und den pMD9-Varianten jeweils mit pCenv, pClgag2, pCpol2 (Spur 2 bis 15). Als Negativkontrolle dienten Partikelpräparationen aus 293T-Zellen, welche mit pcDNA transfiziert worden waren (nicht gezeigt).

#### 4.6.4 Zusammenfassung

Für die A- und B-Mutationen konnte ein negativer Einfluss auf die Pol-Inkorporation gezeigt werden, ersichtlich an der verminderten Pol-Menge im Viruspartikel. Dies war wohl auch der Grund für die niedrigeren Transduktionsraten (gemessen im FACS siehe 4.6.1) dieser Varianten. C-Varianten wiesen ähnliche Transduktionsraten wie das Wildtyp-Plasmid pMD9 auf, so dass für das Element C im Rahmen dieses Experimentes kein Einfluss auf die reverse Transkription gezeigt werden konnte.

Lediglich Element D zeigte eine normale Gag- und Pol-Produktion, sowie eine normale Proteininkorporation in das Partikel. Die Transduktionseffizienz war erniedrigt, so dass ein Einfluss des Elements D auf die reverse Transkription wahrscheinlich ist.

#### 4.7 Zusammenfassung aller Experimente

In der Reihenfolge der purinreichen Elemente konnten folgende Effekte gezeigt werden:

##### *Element A und B*

Die in Element A und B eingebrachten Mutationen führten, wie in der Partikelpräparation unter 4.6.3 gezeigt, zu einer verminderten Pol-Inkorporation in die entstehenden Viruspartikel. Es zeigten sich passend auch niedrigere Transduktionsraten im Kontext der viralen Vektoren (4.6.1).

Die im Grundlagenexperiment gemessenen niedrigeren Titer waren wahrscheinlich ebenfalls auf diesen Effekt zurückführbar. Für die Elemente A und B konnte also durch diesen Versuchsaufbau weder ein Effekt auf die reverse Transkription gezeigt, noch definitiv ausgeschlossen werden.

##### *Element C*

Die im Grundlagenexperiment und modifizierten Grundlagenexperiment gemessenen Titer für die Variante C- waren kaum erniedrigt im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid, was eventuell auch auf die hohe Zahl von noch neun zusammenhängenden Originalpurinen zurückführbar war. Auch die viralen Vektoren erreichten eine dem Original-Plasmid vergleichbare

Transduktionseffizienz (4.6.1). Die Varianten mit C+ enthielten nur noch zwei zusammenhängende Originalpurine, jedoch wirkten sich die Mutationen negativ auf die Pol-Funktionalität (4.4 ff.), sowie die Gag-Produktion (4.3.2) aus, was die niedrigen Titer im Grundlagenexperiment erklärte. Auch unter Ausschaltung des Pol-Effektes im modifizierten Grundlagenexperiment (4.5.1) verblieb noch der Einfluss auf die Gag-Produktion (4.5.2). Die Transduktionseffizienz der Varianten mit C+ hingegen hatte sich als vergleichbar mit der des Original-Plasmids herausgestellt (4.6.1). Für das Element C konnte also durch diesen Versuchsaufbau kein Effekt auf die reverse Transkription gezeigt werden.

### *Element D*

Bei D-Varianten waren weder Gag-Produktion noch Pol-Inkorporation durch die Mutationen beeinflusst worden. Im proviralen Kontext waren jedoch die Titer im Vergleich zum Wildtyp reduziert (4.3.1). Ebenso war die Transduktionseffizienz geringer als die des Wildtyp-Plasmids (4.6.1). Dies legte nahe, dass Element D einen Einfluss auf die reverse Transkription bei PFV hat.

### *Alle purinreichen Sequenzen*

Element D-Mutationen beeinflussen die reverse Transkription negativ. Element D könnte also einen zweiten Initiationsort für die Plusstrang-Synthese darstellen. Elemente A und B scheinen an der Inkorporation von Pol ins virale Partikel mitzuwirken.

Element C scheint eine Rolle für die Produktion von Gag zu spielen.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Aussage der Experimente

Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der vier zentralen purinreichen Elemente für die reverse Transkription zu bestimmen. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ist es das Element D, welches diese Funktion erfüllen könnte. Insbesondere zur effektiven Vektortransduktion scheint es benötigt zu werden. Unklar ist, weshalb sich in den RACE-Experimenten, welche die Plusstrang-Synthese während der reversen Transkription untersuchen sollten, kein eindeutiger Start- und Endpunkt derselben zeigen konnte.

Für die Elemente A, B und C konnten andere Effekte auf die Replikation gezeigt werden.

### 5.2 Aussagekraft des Grundlagenexperiments

Im Grundlagenexperiment wurde jeglicher Einfluss der Mutationen auf die Replikation untersucht. Charneau et al., 1992 hatten mit einem analogen Versuchsaufbau zeigen können, dass die Mutation des cPPT in HIV-1 die Replikation der Viren verlangsamte. Andere Effekte der Mutationen, wie etwa auf die Funktion von Pol, waren ausgeschlossen worden.

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid pcHSRV2 führte durch Transfektion von 293T-Zellen zur Produktion von vollreplikationsfähigen Foamyviren, deren Titer auf BHK LTR-lacZ-Zellen ausgezählt wurden. Titerreduktionen ergaben sich für alle Mutanten. Es stellte sich aber heraus, dass diese Titer im Gegensatz zu den Ergebnissen von Charneau et al., 1992 auch Ausdruck von anderen Effekten auf PFV waren.

Ausdruck einer verminderten Pol-Funktionalität waren die Titer für alle Mutanten, welche eine die Aminosäuresequenz ändernde Mutation trugen. Dies konnte durch Transduktion von mutierten pcPol2-Plasmiden gezeigt werden. Diesen Pol-Effekt auszuschalten, war Ziel des modifizierten Grundlagenexperiments und der pMD9-Transduktion.

Zusätzlich Ausdruck einer Reduktion der Gag-Expression waren die Titer für die Varianten mit Mutation C+. Dies konnte in den Western Blots der Zell-Lysate

gezeigt werden, welche aus den im Grundlagenexperiment transfizierten 293T-Zellen hergestellt worden waren.

Zusammenfassend zeigte das Grundlagenexperiment also alle Effekte der purinreichen Sequenzen. Welcher Art diese waren, musste mit weiteren Experimenten abgeklärt werden.

### **5.3 Aussagekraft des modifizierten Grundlagenexperiments**

Um den Pol-Effekt auszuschließen, wurden die pcHSRV2M54-Mutanten hergestellt: Durch Deaktivierung des Pol-Startcodons im modifizierten Wildtyp-Plasmid pcHSRV2M54 sollte verhindert werden, dass Pol abgelesen wurde (Entwicklung des Plasmids s. Enssle et al., 1996). Das funktionale Pol wurde in Form von pcPol2-Plasmid kotransfiziert. Die Ergebnisse waren aber letztlich die gleichen wie beim Grundlagenexperiment mit den pcHSRV2-Varianten. Es war also nicht gelungen, den Pol-Effekt auszuschalten, so dass die Vermutung nahe lag, dass trotz Ausschalten des Pol-Startcodons in den pcHSRV2M54-Varianten die defekten pols abgelesen worden waren und letztlich wieder zu minderfunktionalen Plasmiden geführt hatten. Zu diskutieren ist hier ein alternatives Pol-Startcodon: Bei den zugehörigen Western Blots der transfizierten 293T-Zellen hatten sich passend Proteinbanden zwischen 127 kD (Pol-Precursor) und 85 kD (RT-PR), sowie zwischen 85 kD und 40 kD (IN) gezeigt. Diese hatten sich auch bei den Zell-Lysaten der mit pcHSRV2-Mutanten transfizierten Zellen gezeigt. Es wurde schon früher debattiert, ob Pol möglicherweise ein zweites Startcodon gebraucht (Peters et al., 2005). Wir waren dieser Vermutung nicht weiter nachgegangen; es bedeutete lediglich, dass auch die pcHSRV2M54-Varianten nicht geeignet waren, die Effekte der purinreichen Sequenzen auf die Replikation aufzudecken. Deshalb wurden die pMD9-Varianten hergestellt. Erst die pMD9-Transduktion erlaubte eine sichere Aussage über die Transduktionseffizienz der mutierten Vektoren unter Ausschaltung jeglichen Effekts der Mutationen auf die Pol-Funktionalität.

## 5.4 Aussagekraft der pMD9-Transduktion

Der Pol-Effekt, der mögliche zweite Initiationsort für Pol respektive multiple weitere Initiationsorte für Pol, sowie auch der Einfluss der Mutationen in den Varianten mit C+ auf die Gag-Expression hatte die Verwendung der pMD9-Varianten nötig gemacht. Durch Einführung der Mutationen in pMD9 und Kotransfektion mit funktionellen Plasmiden für alle benötigten viralen Bestandteile (Pol, Gag, Env), konnten diese Effekte eliminiert werden.

pMD9 exprimiert lediglich verpackbare virale RNA und keine Proteine, und stellt somit eine Modifikation des pMD4-Vektors da, welcher im Gegensatz zu pMD9 noch gag-RNA exprimieren kann (Heinkelein et al., 2002a). Die gemessene Transduktionseffizienz sollte also nur auf Effekten auf dem Nukleinsäurelevel beruhen. Vermindert war sie im Falle der Elemente A-, B- und D. Die Expression von viralen Proteinen war bei allen Mutanten gleichmäßig vorhanden. Bei den Element A- und B-Mutanten hingegen fiel eine verminderte Pol-Inkorporation ins Viruspartikel auf. Dies erklärt die erniedrigten Titer dieser Mutanten im Grundlagenexperiment und die geminderte Transduktionseffizienz im Rahmen der pMD9-Transduktion. Beide scheinen auf eine mangelnde Pol-Inkorporation ins Viruspartikel und nicht auf einen Einfluss der Elemente A und B auf die reverse Transkription zurückzugehen. Eine Zusammenfassung der Einflüsse der Elemente auf PFV zeigt die folgende Tabelle:

**Tab. 16: Einflüsse der Elemente auf PFV**

<b>Element</b>	<b>Auffälliges Experiment</b>	<b>Schlussfolgerung</b>
Element A	pMD9-Transduktionseffizienz (4.6.1), Partikelpräparation (4.6.3)	Beteiligt an Pol-Inkorporation
Element B	pMD9-Transduktionseffizienz (4.6.1), Partikelpräparation (4.6.3)	Beteiligt an Pol-Inkorporation
Element C	Proteinanalyse des (modifizierten) Grundlagenexperiments (4.3.2; 4.5.3)	Beteiligt an Gag-Expression
Element D	Grundlagenexperiment (4.3.1), Bestätigung durch pMD9-Transduktionseffizienz (4.6.1)	Beschleuniger der reversen Transkription



## 5.5 Die Rolle der purinreichen Sequenzen für PFV im Einzelnen

Die purinreichen Sequenzen haben verschiedene Rollen für PFV. Element A und B beeinflussten die Pol-Inkorporation, Element C die Gag-Expression und lediglich Element D als Kopie des 3'PPT scheint eine direkte Rolle für die Initiation der reversen Transkription zu spielen.

Zuletzt wird diskutiert, inwiefern die Elemente A bis C doch ähnlich wie Element D fungieren könnten, was im Rahmen unseres Versuchsaufbaus nicht gezeigt werden konnte.

### 5.5.1 Die Elemente A und B

#### 5.5.1.1 Effekt auf die Pol-Inkorporation

Die Mutationen in Element A und B bedingen im pMD9-Vektor-Kontext eine verminderte Pol-Inkorporation in die entstehenden viralen Partikel. Pol wird bei PFV im Gegensatz zu Orthoretroviren nicht als ein Gag-Pol-Fusionsprotein translatiert. Das Fusionsprotein bei Orthoretroviren entsteht – je nach Genus – nur, wenn das gag-Stoppocodon zwischen gag und pol überlesen wird (Philipson et al., 1978; Yoshinaka et al., 1985), oder das Leseraster, welches normalerweise gag und pol überlappt, um -1 verschoben wird (Jacks und Varmus, 1985). Da die Suppression bzw. der Leserasterwechsel selten geschieht, wird mehr Gag als Pol exprimiert (Hayman, 1978; Jamjoom et al., 1977; Oppermann et al., 1977), was ökonomischer für das Virus ist, welches mehr Strukturproteine als Enzyme benötigt. Durch das Fusionsprotein, welches im Partikel durch die Protease-Aktivität gespalten wird, besitzen Orthoretroviren also eine Möglichkeit, Pol ins Viruspartikel zu inkorporieren, welches an das Capsidprotein gekoppelt ist. Bei PFV hingegen werden Pol und Gag von separaten RNAs zu auch separaten Proteinen abgelesen. Pol gelangt über Interaktion mit der genomischen RNA (und NICHT über eine Pol-Gag-Interaktion) ins Partikel. Der hierfür benötigte RNA-Bereich befindet sich im pol-Abschnitt, und zwar in der CAS II-Region (Peters et al., 2005). Die CAS II-Region selber ist eine cis-aktive Sequenz, von welcher schon länger bekannt ist, dass sie für einen effizienten Vektortransfer nötig ist und

zusammen mit CAS I die Verpackung der genomischen RNA ins Viruspartikel ermöglicht (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998). Nach CAS II-Deletion im pMD9-Plasmid und Transfektion im Vier-Plasmid-System war (von Peters et al., 2005 gezeigt) keine Produktion von infektiösen Viruspartikeln – und v.a. keine RNA und kein Pol im gebildeten Viruspartikel – mehr nachweisbar. Die Elemente A und B befinden sich innerhalb der CAS II-Sequenz, und zwar genau in dem Bereich, dem sich Peters et al. im Rahmen von Deletionsanalysen auf der Suche nach dem entscheidenden Verpackungssignal angenähert hatten: Zwischen den Nukleotiden 4884 und 5628 der genomischen RNA in pMD9. Die eingeführten Mutationen schienen die CAS II so verändert zu haben, dass dies faktisch einer Deletion entsprochen hatte.

Auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist, scheinen also die Elemente A und B als Bestandteil von CAS II direkt oder indirekt über eine RNA-Pol-Interaktion an einer Pol-Inkorporation ins Viruspartikel mitzuwirken.

Die Transduktionseffizienz war in unseren Experimenten aber nicht bei 0% gewesen, so dass zu diskutieren bleibt, ob Element A und B trotz Mutation noch genügend Restaktivität hatten oder ob es andere Mechanismen zur Pol-Inkorporation gibt (s. Lee et al., 2008). Die in der Partikelpräparation gezeigten Blots hatten jedoch passend zu Peters et al., 2005 keine Banden mehr für Pol gezeigt, was wiederum offen lässt, weshalb trotzdem eine Rest-Transduktionseffizienz vorhanden war. Hier handelte es sich möglicherweise um ein Sensitivitätsproblem.

### 5.5.1.2 Effekt auf die reverse Transkription

In den beiden Grundlagenexperimenten ließ sich keine Titerreduktion der Minusvarianten von Element A und B nachweisen. Die Titerreduktionen der Plusvarianten gehen zum einen auf den Pol-Effekt und zum anderen – gezeigt in der pMD9-Transduktion – auf eine verminderte Pol-Inkorporation ins Viruspartikel zurück. Ein möglicher Einfluss von Element A und B auf die Initiation der reversen Transkription lässt sich anhand unseres Versuchsaufbaus also nicht zeigen.

## 5.5.2 Das Element C

### 5.5.2.1 Effekt auf die Gag-Expression

Im Grundlagenexperiment, sowie im modifizierten Grundlagenexperiment, hatte die Mutation C+ im proviralen Kontext zu einer verminderten Gag-Expression geführt.

Mutation C+ könnte einen post-transkriptionellen Regulationsmechanismus gestört haben, welcher den Export der gag-RNA-Spezies beeinflusste. Bisher sind bei PFV keine Beispiele für post-transkriptionelle Regulatoren bekannt (Linial, 2007; Rethwilm, 2005). Bei HIV und anderen RV hingegen sind solche Regulatoren bekannt: Nach Transkription eines retroviralen Provirus entsteht virale RNA, die Introns enthält. Diese soll exportiert werden, ohne dem normalen zellulären Proceedere zu unterliegen, bei welchem die Introns aus der RNA herausgespleißt und die RNA mit einem 5'-Cap und einer Polyadenylierung am 3'-Ende versehen wird. Ungespleißte RNA kann also auch nicht wie gespleißte aus dem Zellkern heraus transportiert und an den Ribosomen translatiert werden. HIV-1 hat zur Umgehung des Spleiß-Prozesses folgenden Mechanismus entwickelt: Nach Transkription des Provirus entsteht eine genomische, ungespleißte RNA, die nach einem unspezifischen, von zellulären Enzymen durchgeführten Spleißprozess, viele subgenomische RNAs freisetzt, eine hiervon kodiert für das virale Protein Rev, welches von seiner regulär aus dem Zellkern exportierten RNA translatiert wird. Rev kann wieder in den Zellkern eindringen und ungespleißte RNAs über das Rev-responsing Element (RRE) binden, welches sich auf allen RNAs befindet, die ansonsten im Nukleus verbleiben würden. Der entstandene Rev-RRE-Komplex wird über den nukleären Transporter Crm-1 ausgeschleust, so dass nun sämtliche ungespleißten viralen RNAs – inklusive der für die Virusreplikation obligat ungespleißt bleibenden genomischen RNA – ins Zytoplasma transportiert werden können. Bei einfachen Retroviren gibt es andere Mechanismen, um aus dem Nukleus transportiert zu werden. Beispielsweise sind im Mason-Pfizer-Monkey Virus und dem Rous Sarcoma Virus cis-aktive RNA Elemente bekannt, sogenannte CTE = constitutive transport elements, welche über direkte RNA-Protein-Interaktion einen Komplex bilden, der ungespleißte, virale RNAs über einen anderen zellulären Transporter, das TAP-Protein, aus dem Kern exportieren

kann. Diese CTE sind in der Lage, funktionell das Rev-RRE-Element in HIV-Vektoren zu ersetzen (Bray et al., 1994; Zolotukhin et al., 1994). Spezifisch die HIV-Gag-Expression konnte durch diese CTE gesteigert werden (Wodrich et al., 2000). Auch bei Hepadnaviren, welche auf Grund ihrer Replikationsstrategie mit PFV verwandt sind, kennt man derartige Transportelemente, die PRE = posttranscriptional regulatory RNA-elements (Donello et al., 1998; Huang, J. et al., 1993; Huang, Y. et al., 1999). Ein weiteres cis-aktives Element ist in bestimmten endogenen Retroviren, den IAP = intracisternal Type A-particles, bekannt, welches die Gag-Expression in HIV-1-Vektoren erhöhen kann und funktionell auch ersetzbar durch ein CTE ist. Die Experimente von Wodrich et al., 2000 liefern auch eine Erklärungsmöglichkeit für das Verhalten unserer Mutation C+: In der Arbeit wurde nach strukturellen Ursachen für die analoge Funktion solcher verschiedener Elemente gesucht. Dabei fielen kurze Strukturhomologien in bestimmten RNA-Abschnitten im IAP-Element und CTE auf, „single-stranded loops“, welche ein Bindemotiv für einen zellulären Exportfaktor darstellen könnten. Die gleiche räumliche Konfiguration weist auch die pol-RNA bei PFV auf, am 3'-Ende des pol-Gens – wo sich die purinreichen Sequenzen befinden. Auch das IAP-Element und das PRE bei Hepadnaviren sind in der 3' pol-Region lokalisiert. Das PFV-Element führte zu einer erleichterten Gag-Expression in HIV-1, sowie zu erhöhter Gen-Expression in MLV-Vektoren. Die Vermutung liegt nahe, dass es diese Funktion auch in PFV selber ausübt.

Es könnten die von uns eingeführten Mutationen in den Varianten mit C+ zu einer Veränderung der räumlichen Konfiguration geführt haben, welche die räumliche Struktur der oben erwähnten „single-stranded-loops“ gestört und deren Funktion als nukleären Exportfaktor für foamyvirales Gag abgeschafft haben. Ausgehend davon lässt sich auch erklären, weshalb die Variante C+ in den pMD9-Experimenten den Vektortransfer nicht stört: Denn im Vier-Plasmid-System wird gag von seinem eigenen Plasmid exprimiert und die nicht-mutierten purinreichen Sequenzen stehen auf dem pcPol2 zur Verfügung. Das alles spräche für die Rolle des Elements C als Bestandteil eines posttranskriptionellen Regulators, wobei wie erwähnt bisher keine solchen Regulatoren bekannt sind (Linial et al., 2007; Rethwilm et al., 2005). Neuere Daten zeigen, dass auch der Export von foamyviralen RNAs z.T. über Crm-1 (wie der Rev-RRE-Weg bei HIV) und auch über ein zelluläres RNA-Bindeprotein (HuR und die zellulären Adaptermoleküle

pp32 und April) funktioniert; für letzteren Exportweg wurde ein noch hypothetisches RNA-Element als Exportelement proklamiert (unpublished data; J. Bodem 2010) – diese könnte in dem pol-Abschnitt liegen, welches Element C enthält.

Wir sind in dieser Arbeit der Rolle des Elementes C nicht weiter nachgegangen. In zukünftigen Experimenten wäre die quantitative Analyse von genomischer foamy-viraler DNA im Vergleich zu gag-spezifischer RNA intra- und extranukleär in pCHSRV2-Varianten mit C+ interessant. Hier könnte sich zeigen, ob das Element C tatsächlich am Kernexport von gag beteiligt ist.

Mutation C+ könnte aber auch dafür gesorgt haben, dass die Transkription der gag-RNA gestört oder aber deren Stabilität über einen bisher unbekanntem Mechanismus beeinträchtigt wurde. Im Falle der IAP-Elemente wurde von Wodrich et al., 2000 gezeigt, dass ihr Einbau in lentivirale Vektoren zu einer erhöhten nukleären und Gesamt-RNA-Menge führte, was auch auf eine Bedeutung des IAPE (und vielleicht auch des PFV-Elements) zeitlich vor dem nukleären Export ungespleißter RNA hinweisen könnte. Eventuell haben das IAPE und das PFV-Element also bereits einen Einfluss auf die Transkription. So ist bei Hepadnaviren bekannt, dass PRE in der Lage sind, ungespleißten RNAs mehr Stabilität zu verleihen, ebenso ist dies für das RSV-DR-Element, einem posttranskriptionellen Regulationsfaktor des Rous Sarcoma Virus (RSV), beschrieben (Ogert und Beemon, 1998; Ogert et al., 1996).

Zusammenfassend besteht die Vermutung, dass das Element C mit seiner Sequenz ein entscheidendes Element innerhalb des 3'-pol-Bereichs ist, der für die Transkription, die Stabilisierung oder den nukleären Export von ungespleißter gag-RNA verantwortlich ist.

Völlig abgeschafft wurde die mögliche Funktion des Element C+ bei der Gag-Expression jedoch nicht, da immer noch Spuren von Gag nachweisbar waren. Somit scheint Element C zwar beteiligt an Regulation von entweder Transkription und/ oder posttranskriptioneller RNA-Prozessierung zu sein, jedoch scheinen auch andere, bisher nicht bekannte Elemente benötigt zu werden, die eine basale Funktion aufrecht erhalten.

### 5.5.2.2 Effekt auf die reverse Transkription

Da im verwendeten Vier-Plasmidsystem im pMD9-Vektor-Kontext funktionelle Plasmide für Pol, Gag und Env kotransfiziert wurden, sind die gemessenen Werte frei von Mutations-Effekten auf die Enzymfunktion oder die oben diskutierte Gag-Expression. Erniedrigte Titer wären zu erwarten gewesen, hätten die eingeführten Mutationen auf dem Level der Transkription oder reversen Transkription die virale Replikation behindert, was nicht der Fall war. Somit konnte für Element C in den durchgeführten Experimenten kein Einfluss auf die Initiation der reversen Transkription nachgewiesen werden.

### 5.5.3 Das Element D

Ein Einfluss der Elemente A bis C auf die reverse Transkription konnte nicht nachgewiesen werden. Element D stellt jedoch eine Kopie des 3'PPT dar (Kupiec et al., 1988) und ist daher möglicherweise mit dem cPPT in HIV zu vergleichen, welchem einen Einfluss auf die reverse Transkription nachgewiesen werden konnte (Charneau et al., 1992). Untermauernd für diese These wurde von Tobaly-Tapiero 1991 das *gap* auf der Plusstrang-DNA gesehen, welches an Element D angrenzt und als Korrelat für die Anlagerung der RT gesehen wurde. Eine Kopie des 3'PPT findet sich zudem in allen Foamyviren-Spezies, was wiederum für eine zentrale Rolle des Elementes D in der Replikation sprechen könnte.

Im proviralen Kontext des Grundlagenexperiments hatten sich keine signifikanten Titerabfälle bei den D-Mutanten gezeigt; beim modifizierten Grundlagenexperiment zwar ein deutlicherer, der jedoch durch den Standardfehler erklärbar ist. Dass sich kein Effekt mit den Einzelrunden-Experimenten nachweisen ließ, kann an der Messgröße gelegen haben: Die Titer wurden anhand der Tas-Produktion der Partikel im Überstand auf BHK LTR lacZ-Zellen bestimmt. Die Tas-Produktion selber ist vermutlich unabhängig von der Integration von PFV *in vitro* und somit der IN-Funktion. Die IN-Funktion war in den Varianten mit D+ verringert (siehe 4.4.1).

Relevant ist eine funktionale IN und die funktionierende provirale Integration *in vivo* (Enssle et al., 1999; Meiering et al., 2000). Interessant wären hier sicherlich Langzeitkulturen mit den D-Mutanten, um zu sehen, wie stark die Replikation

hinter der des Wildtyps zurück bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich leider keine Langzeitkulturen mit 293T-Zellen etablieren (Daten nicht gezeigt), was auf eine minderfunktionale IN in den meisten Mutationen zurückzuführen war.

Der Effekt des Elementes D hatte sich zuletzt im Vektorkontext mit pMD9 gezeigt: Die Transduktion war bei den Mutanten weniger effizient gewesen (bei im Vorfeld gezeigter gleichmäßiger Proteinexpression und regelrechter Partikelzusammensetzung als Ausschluss von Nebeneffekten).

Bisher lässt sich nur sagen, dass Element D zu einer effizienten foamyviralen Vektortransduktion beiträgt, was sich anhand der pMD9-Transduktion im Rahmen dieser Arbeit abzeichnete und in einer Weiterentwicklung von foamyviralen Vektoren beweisen ließ (Wictorowicz et al., 2009). Dies unterstützt die Bedeutung des Elements D für die Replikation von PFV.

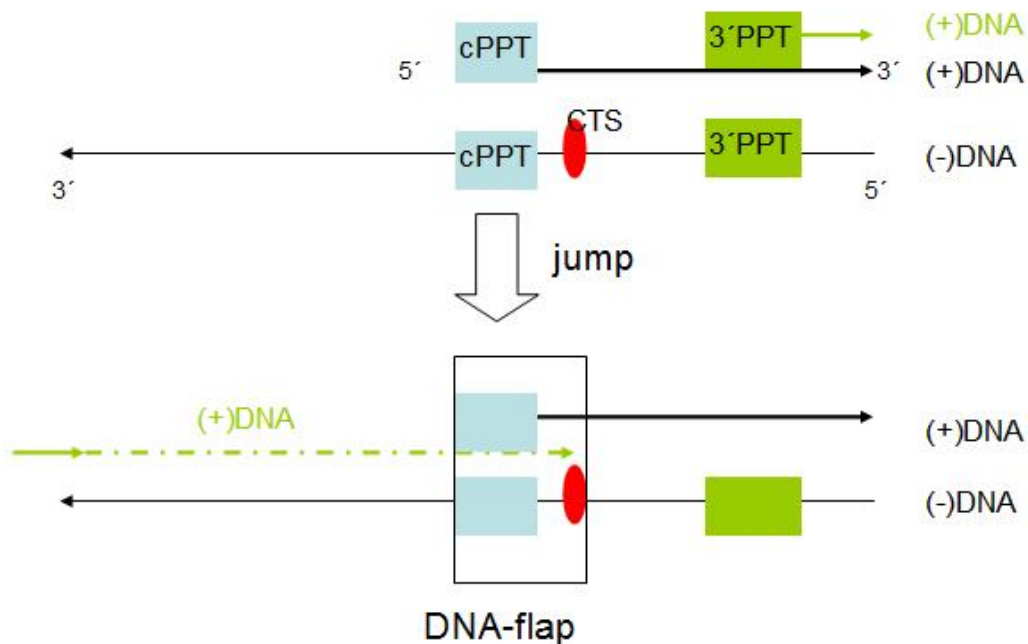
### 5.5.4 Die Plusstrang-Diskontinuität bei PFV ist ein *gap*

Um weiteren Aufschluss über die Funktion des Elements D zu erhalten, wurde die Plusstrang-Diskontinuität, das sogenannte *gap*, welches an Element D angrenzt, ebenfalls untersucht.

Erstmals beschrieben wurde das Auftreten eines diskontinuierlichen Plus-DNA-Strangs bei PFV während der reversen Transkription von Tobaly-Tapiero et al., 1991 und Kupiec et al., 1988. Es handelt sich laut damaligen Ergebnissen um ein ca. 130 bp umfassendes *gap*, welches an das 5'-Ende des Elements D angrenzt und als Zeichen der Anlagerung der RT gewertet wurde. Für Element D wurde wie erwähnt seitdem vermutet, dass es ein Zweitinitiationsort für die RT darstellt. Bisher wurde das foamyvirale *gap* noch nicht näher analysiert. Jedoch widmeten sich viele Experimente HIV-1, welches ebenfalls eine diskontinuierliche Plusstrang-Synthese im Bereich seines cPPT aufweist.

Bei HIV entsteht allerdings ein zentrales DNA-*flap*, ein überlappend abgelesener DNA-Abschnitt im Bereich des cPPT (Charneau et al., 1994), welcher für den Kernimport des reversen Transkripts verantwortlich gemacht worden ist (Arhel et al., 2006 und 2007; Zennou et al., 2000). Das *flap* entsteht während der reversen Transkription, bei welcher der 3'PPT und der cPPT von HIV als Initiationsort der Plusstrang-Synthese genutzt werden. Das am 3'PPT entstehende DNA-Fragment wird an das 5'-Ende der Minus-Strang-DNA transferiert, von wo aus der Rest des

Plusstranges synthetisiert wird. Seine Synthese stoppt nicht am cPPT, sondern an einer CTS = central termination sequence, die sich ca. 90 bp strangabwärts des cPPT befindet. So entsteht ein 90 bp überlappender Plusstrang, ein dreisträngiger DNA-Abschnitt.



**Abb. 23 Die Entstehung des DNA-flaps bei HIV.**

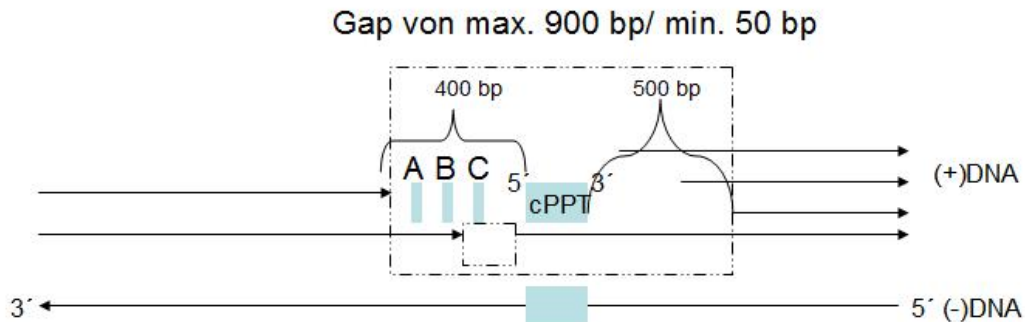
Die Initiation der Plusstrangsynthese beginnt am cPPT und am 3'PPT. Das am 3'PPT synthetisierte Stück wird beim „jump“ der RT (s. Blockpfeil) ans 3'-Ende der (-)DNA transferiert, der Plusstrang wird zu Ende synthetisiert – die Synthese endet an der CTS. Hierdurch entsteht das markierte DNA-flap, ein 90bp-überlappend abgelesenes dreisträngiges DNA-Stück.

Durch cPPT-Mutation konnte die *flap*-Bildung unterbunden werden, was zu einer verminderten Replikationseffizienz von HIV-1 führte – vermuteter Auslöser war eine Störung des nukleären Imports von HIV-DNA (Zennou et al., 2000). Dieser nukleäre Import seines Genoms ist pathognomonisch für HIV, welches im Gegensatz zu anderen Retroviren inklusive PFV in der Lage ist, sich nicht teilende Zellen wie etwa Gewebsmakrophagen zu infizieren (Gartner et al., 1986). Andere Importsignale, die NLS (nukleäre Lokalisations-Signale), wurden bereits im Bereich der Matrix- und Vpr-Proteine (Bukrinsky et al., 1992) und der Integrase von HIV (Gallay et al., 1995) beschrieben. Auch wenn die Experimente von Zennou et al., 2000 für die Bedeutung des *flaps* als Importsignal sprachen, warfen andere Experimente die Frage auf, ob das *flap* nicht nur Bedeutung in bestimmten Vektortypen oder Zelllinien hat (Dvorin et al., 2002; Limón et al., 2002). Neuere



Ergebnisse zeigen aber erneut die Bedeutung des *flaps* für den Kernimport (Arhel et al., 2006 + 2007), unabhängig von der Zelllinie. Des Weiteren konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Präsenz des *flaps* die Transduktionseffizienz von lentiviralen Vektoren steigern konnte (u.a. Barry et al., 2000; Giannini et al., 2003; Sirven et al., 2000; Zennou et al., 2001).

Um einen Hinweis darauf zu erlangen, ob sich in der Nähe des Elements D bei PFV tatsächlich ein Zweitinitiationsort für die Plusstrang-Synthese befindet und ob es sich bei dem *gap* eventuell doch um ein DNA-*flap* handelt, wurde im Rahmen von RACE-Experimenten der einzelsträngige Bereich weiter eingegrenzt (Peters et al., 2008). Dabei konnte weder ein fester Startpunkt für den einzelsträngigen Bereich, noch ein fester Endpunkt gezeigt werden. Die Startpunkte, d.h. 5'-Starts des Plusstranges befanden sich in einer ca. 500 bp umfassenden Region 3' des Elements D mit einer Häufung 100, 150 und 300 bp 3'. Nur in einem einzigen Klon befand sich das Ende des *gaps* 5' von Element D. Die Endpunkte, d.h. 3'-Enden des Plusstranges, waren ebenfalls auf eine ca. 400 bp umfassende Region verteilt, wobei sie sich zwischen 5' von Element A und 5' von Element C befanden; eine Häufung der Endpunkte fand sich an einer Position 5' des Elements C. Einen Anhalt für einen festen Startpunkt der RT oder einen festen Transkriptions-Stop gab es nicht. So konnte auch keine feste CTS, wie etwa beim DNA-*flap* von HIV, gezeigt werden.



**Abb. 24 gap bei PFV.**

Der 5'-Start des Plusstrangs (Ende des gaps) befindet sich in einer ca. 500 bp umfassenden Region 3' des Elements D, welches analog zum HIV-Aufbau hier als cPPT bezeichnet wird. Das 3'-Ende des Plusstrangs (Start des *gaps*) befindet sich in einer ca. 400 bp umfassenden Region 5' des cPPT. Zusammenfassend kommt man so auf eine maximale Länge des gaps von ca. 900 bp (großer Kasten) und eine minimale von ca. 50 bp (kleiner Kasten) – eingerechnet des einzigen Klons, bei welchem das *gap* 5' des cPPT endete.

Der einzelsträngige Abschnitt ist also als *gap* zu bezeichnen, umfasst aber eine variable Länge von ca. 50 bis 900 bp, sowie variable Start- und Endpunkte.

### 5.5.5 Mögliche Funktion und Entstehung des *gaps*

Wie zum Verständnis der Replikation von FV passend, weisen diese kein *flap* auf. Die Funktion eines solchen *flaps* wäre bei PFV ohnehin fragwürdig gewesen: Der Kernimport von HIV durch das DNA-*flap* (Zennou et al., 2000; Arhel et al., 2006 + 2007) findet bei PFV ja nicht statt, welches nicht in der Lage ist, sich nicht teilende Zellen zu infizieren.

Wozu besitzen FV aber ein *gap*? Foamyvirale Vektoren können sich kaum teilende Zellen, nämlich hämatopoetische Stammzellen, transduzieren. Befähigt das HIV-*flap* das Virus zum Kernimport, ist Element D, welches ebenfalls eine Kopie des 3'-PPT darstellt und auch an eine Plusstrang-Diskontinuität anknüpft, als sogenannter foamyviraler cPPT vielleicht dafür verantwortlich. Möglicherweise entsteht es im Rahmen einer frühen reversen Transkription in Foamyviren. Es gibt Hinweise darauf, dass wie bei anderen Retroviren auch bei FV kurz nach Eintritt des Virus in die Zelle die klassische, frühe reverse Transkription von RNA zu cDNA statt findet. (Früher nahm man an, dass FV nur eine späte reverse

Transkription aufweisen.) Im Zytoplasma der Wirtszellen kann kurz nach Infektion der Zelle eine Akkumulation von linearen DNAs, welche das *gap* tragen, nachgewiesen werden (Delelis et al., 2003). Diese könnten durch verschiedene Initiationsorte der reversen Transkription entstehen. Bei anderen Retroviren beobachtet man hingegen die Entstehung 2´LTR-zirkularisierter DNA-Stücke im Rahmen der frühen reversen Transkription, diese sind im Verlauf v.a. im Nukleus detektierbar. Sie entstehen auch bei FV, wenn auch in wesentlich geringerer Menge (Saib et al., 1997). Verstanden ist die Funktion dieser zirkulären DNAs bisher nicht – betrachtete man sie eine Zeit lang als Marker des nukleären Imports (Barbosa et al., 1994), nimmt man mittlerweile eher an, dass sie sich zufällig formieren und auf Grund ihrer Stabilität gegenüber zellulärer Degradation akkumulieren (u.a. Butler et al., 2002). Ob sie im Zytoplasma entstehen und in den Nukleus importiert werden, oder ob sie sich im Nukleus formieren und dann exportiert werden, ist bisher unbekannt.

Was auch immer letztlich die Funktion der zirkulären DNAs oder der *gap*-DNA ist, vielleicht sind sie einfach Marker einer frühen reversen Transkription in FV, welche zur Maximierung der Replikation beiträgt.

### 5.5.6 Mögliche Ursache der variablen *gap*-Länge

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche *gap*-Länge findet sich eventuell im Vergleich mit HIV: Auch bei HIV treten unterschiedlich lange *flaps* auf. Hier gibt es Zweitinitiationsorte für die Plusstrang-DNA-Synthese, sogenannte minor initiation sites, welche 5´ des 3´-PPTs liegen (Klarmann et al., 1997). Klarmann et al. führte die Existenz der Ersatzstartpunkte bei HIV-1 auf die Versuchsbedingungen in einem zellfreien System zurück. Die in Zellen produzierten Viruspartikel wiesen keine Präferenz von minor initiation sites auf. Eventuell wurden bei den von Peters durchgeführten RACE-Experimente alternative Startpunkte aus ungeklärten Gründen häufiger genutzt, als dies normalerweise der Fall ist. Sollten jedenfalls bei PFV auch minor initiation sites benutzt werden, könnte hiermit eine Erklärung für die unterschiedlich langen *gaps* gefunden und deren Nachweis auf die Versuchsbedingungen zurückführbar sein.

Nur theoretisch vorstellbar ist, dass an den Elementen A bis D initiierte Plusstränge ans Minus-DNA-Ende transferiert werden und bei Komplettierung des

Plusstrangs nun wiederum variabel Element A bis D zur Initiation der Synthese genutzt werden. Hiermit hätte man eine Erklärung für die variable *gap*-Länge. Allerdings wird während der reversen Transkription nur der am 3'PPT-initiierte Plusstrang an das 5'-Ende der Minus-DNA transferiert. Die an alternativen Elementen initiierten Plusstränge würden durch Strang-Transfer nämlich die Replikation behindern, da nur an den 3'PPT eine *attachement site* (*att*) angrenzt. Diese wird zur Integration des reversen Transkripts benötigt (Colicelli et al., 1988; Panganiban et al., 1983). *In vitro* (Bowman et al., 1996) konnte durch Einbau der *att*-site angrenzend an interne PPT gezeigt werden, dass zwar auch diese Stränge transferiert werden (gemessen an der Zahl der Integrate), aber dennoch bevorzugt der am 3'PPT initiierte Strang zum Transfer verwendet wird – ursächlich könnte sein, dass der Transfer von einem längeren DNA-Stück, wie es ja durch Initiation an einem internen PPT entsteht, ungenauer und fehlerbehafteter ist. Konsistent hierzu ist, dass Konstrukte mit weiter vom 3'PPT entfernten 5'PPT seltener ihre 5'-initiierten Stränge transferierten als solche, bei welchen der 5'PPT näher am 3'PPT liegt. Doch ist prinzipiell ein 5'PPT in der Lage, einen vollständig deletierten 3'PPT zu ersetzen – so zumindest, wenn an ihn eine *att*-site angrenzt, also *in vitro*. In Bezug auf das *gap* bieten diese Ergebnisse von Bowman et al. keine Erklärungsmöglichkeiten.

### 5.5.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend fanden sich variable End- und Startpunkte des *gaps*. Zu erwarten wäre gewesen, dass das Plusstrang-Transkript immer direkt am Element D oder nur wenige Basenpaare entfernt beginnt. Möglicherweise waren die Ergebnisse auf Grund der Untersuchungsbedingungen wie oben im Rahmen der minor initiation sites erläutert aber auch nicht auf die Vorgänge *in vivo* übertragbar. Die mittlere Länge des *gaps* wurde nicht bestimmt, da immer nur End- und Startpunktanalysen durchgeführt wurden – die minimale Distanz von Start- und Endpunkt lag bei 50 bp, die maximale bei 920 bp. Ein in der Literatur vorbeschriebenes 120-130 bp umfassendes *gap* könnte also existieren, und da End- und Startpunkte 3' und 5' des Elements D zu finden waren, wäre möglich, dass in aller Regel Element D als Zweitinitiationsort für die RT genutzt wird. Auf der anderen Seite kann man, wenn wirklich variable *gap*-Längen *in vivo* bestünden, ihr Entstehen im Rahmen der RT-Anlagerung anzweifeln, es sei denn,

die Initiation der Plusstrang-Synthese würde nicht exakt am cPPT initiiert und nur in seiner Nähe. Interessant wären im Rahmen von weiteren RACE-Experimenten sicherlich der Vergleich der *gaps*, die im Wildtyp auftreten, mit den *gaps* bei den D-Mutanten. Sollte das *gap* wirklich Ausdruck einer RT-Anlagerung sein, wäre zu erwarten, dass kein oder ein anders geartetes *gap* in Element D-Mutanten aufträte.

Auch Einbau des Elements D an einer anderen Stelle des Genoms wäre interessant mit der Frage, ob sich dann auch das *gap* an einer anderen Stelle befindet und in Zusammenhang mit der alternativen Initiation der Plusstrang-Synthese an Element D steht.

## 5.6 Welchen Einfluss haben die Elemente A, B und C auf die Replikation?

Um einen Einfluss der Elemente A bis D auf die reverse Transkription nachzuweisen, bedienten wir uns umgekehrt des Nachweises von negativen Einflüssen von Mutationen der Elemente. Wären die Mutationen „falsch“ gewählt, d.h. veränderten sie nicht die entscheidenden Abschnitte der jeweiligen purinreichen Sequenz bzw. nur solche Abschnitte, die andere Funktionen erfüllen, so lässt sich kein Effekt der Elemente auf die reverse Transkription nachweisen – obwohl dieser durchaus vorhanden sein könnte.

Für die Elemente A und B ließ sich im Rahmen dieser Experimente kein Einfluss belegen, da in jedem Experiment die Begründung des Titerabfalls in einer verminderten Pol-Inkorporation gesehen werden musste. Dennoch könnten Element A und B einen Startpunkt für die Plusstrang-Synthese darstellen (sähe man das *gap* als Ausdruck dafür, wären die End- und Startpunkte passend, s. 5.6). Um dies zu untersuchen, müssten Mutationen eingeführt werden, welche die Pol-Inkorporation nicht beeinträchtigen, falls dies möglich ist.

Insbesondere für Element C stellt sich die Frage, ob die Mutationen falsch gewählt waren. Die von uns verwendeten Mutationen bedingten keine verminderte Transduktionseffizienz im pMD9-Kontext.

In der Literatur gibt es Beispiele dafür, dass bestimmte Abschnitte einer purinreichen Sequenz verantwortlich für ihre Funktion sind:

Beispielsweise ist exaktes Cleavage durch die RNase H-Funktion der RT nach dem PPT von HIV essentiell für die reverse Transkription. Wird der PPT nicht aus der RNA heraus getrennt und kann somit als Anlagerungspunkt für die RT dienen, findet keine Plusstrang-DNA-Synthese und folglich auch keine Virusreplikation statt. Das Cleavage erfolgt bei HIV-1 exakt zwischen G und A am 3' Terminus (Huber und Richardson, 1990). Bei MLV führt die Mutation des 3'A zur Verschiebung des Cleavageortes (Rattray und Champoux, 1989), Unterbrechung des Poly-A-Motivs sogar zu einer deutlich abnehmenden Replikationseffizienz (Robson und Telesnitsky, 1999). Auch bei HIV ist es ein Poly-A-Trakt, dessen Mutation zu einem Poly-C-Trakt die Replikationseffizienz mindert. Das Poly-A-Motiv scheint nach RT-Anlagerung das Cleavage zu vermitteln (McWilliams et al., 2003). Auch das Poly-G-Motiv ist essentiell für die Virusreplikation (Powell und

Levin, 1996). So beeinflusst die Mutation des 3'-Endes des 3'-PPT bei HIV die Replikation stärker als die des 5'-Endes (Miles et al., 2005).

Übertragen auf unsere Mutanten der purinreichen Sequenzen heißt dies, dass unsere Mutationen eventuell genau die Basenabfolge intakt ließen, welche das Cleavage des jeweiligen Elements oder die Anlagerung der RT vermitteln. Dagegen spricht im Vergleich zu den oben genannten Beispielen wiederum, dass keines der foamyviralen Elemente A bis D ein Poly-A- oder Poly-G-Motiv aufweist, das dem im HIV-PPT vergleichbar wäre. Es sind bei PFV wenn dann andere Motive verantwortlich. Doch verbleibt trotz allem als Gegenargument, dass zumindest die Mutante mit Element C+ stark mutiert wurde und jede 3. Originalbase ersetzt wurde. Es ist unwahrscheinlich, dass eine eventuell vorhandene essentielle Basenabfolge hierbei intakt blieb.

Der 3'PPT selber scheint bei HIV auch verschiedene wichtige Abschnitte zu haben, so beeinflusst die Mutation des 3'-Endes die Replikation stärker als die des 5'-Endes (Miles et al., 2005). Interessanterweise konnte Wildtyp-Virus mit einem vollständig ausgeschalteten 3'PPT (analog zu unserer  $\Delta$ 3'PPT-Mutante verwendet in 4.6.1) in Langzeitkulturen auch replizieren, wobei es einige Tage dauerte, bis die Virusmenge dem des vollfunktionsfähigen Virus entsprach. Die Autoren um Miles führten dies nicht auf den cPPT von HIV zurück, welcher die ausgefallene Funktion des 3'PPT hätte übernehmen können. Beobachtet wurde eine erhöhte Zahl an 2'LTR-zirkularisierten Stücken, welche nicht-integrierte, mit sich selber ligierte, revers transkribierte virale DNA darstellen – als Ausdruck einer erfolgten reversen Transkription aber erfolglosen Integration bei mangelhafter Bereitstellung der passenden Integrationsenden, welche nur bei Vorhandensein eines funktionalen 3'PPT auftreten sollten (siehe auch 5.6.2). Diese 2'LTR-zirkularisierten Stücke wurden weiter analysiert und hatten ihren Ursprung nicht in der Nähe des cPPT. Die Autoren gaben zu bedenken, dass auch nicht-integriertes Virus Tat produziert (als Promotor-aktivierendes Protein dem foamyviralen Tas gleich bedeutend) und somit den Indikatorfarbstoff aktiviert, welcher zum Auszählen der Virustiter verwendet wird. Doch die 3'PPT-deletierte Virusmutante produzierte dennoch mehr Farbumschläge als die IN-deletierte Variante, so dass sich hier die Zahl der nicht-integrierten Viren herausrechnen sollte. Zurückzuführen könnte die Beobachtung dann doch auf die Verwendung

des cPPT sein – die integrierten Viren wurden hier nicht weiter analysiert. Untersucht wurden die integrierten Viren nach Titeranstieg nach einigen Tagen: Nach einigen Replikationsrunden wurde wieder der Original-3'PPT nachgewiesen, in den flankierenden Sequenzen bestand keine Ähnlichkeit zu den Sequenzen um den cPPT, so dass eine Rekombination des viralen Genoms mit sich selber ausgeschlossen wurde. Die Autoren stellten zur Diskussion, ob sich das mutierte Virus mit dem Wirtsgenom rekombiniert – immerhin besteht menschliches Genom zu sieben bis acht Prozent aus dem Genom von Retroviren, den sogenannten humanen endogenen Retroviren.

Beobachtungen unserer Virusmutationen in einer Langzeitkultur wären auch vor diesem Hintergrund interessant, so fände hier möglicherweise auch eine Rück-Mutation zum Original-Virus statt. Eine Rekombination unserer Mutanten im Einzelrundenexperiment ist höchst unwahrscheinlich. Die bei uns verwendete  $\Delta 3'PPT$ -Mutante zeigte auch keine basale Restaktivität im Einzelrundenexperiment *in vitro* (siehe 4.6.1). Wie sich die Mutante in Langzeitkulturen verhält, ist bisher nicht untersucht worden.

Eine weitere Erklärung für den nicht nachweisbaren Einfluss unserer Mutationen könnte in der Natur der purinreichen Sequenzen als Plusstrang-Primer liegen. Kompletter Verdau von HIV-RNA durch RNase H führt zu durchschnittlich 10 bp-langen Fragmenten (DeStefano et al., 1994), die prinzipiell alle als Primer für die RT dienen könnten. Diese Theorie wurde auch von Miles et al., 2005 bemüht als Erklärungsversuch für die dort beobachtete Restaktivität der 3'PPT-deletierten Virusmutante von HIV. Die Computeranalyse von RNA-Fragmenten bei MLV ergab, dass solche aufgrund ihrer Schmelztemperatur wesentlich stabiler sind, wenn sie den MLV-PPT enthalten (Kelleher & Champoux, 1998 + 2000; Schultz et al., 1999 + 2000). Ein hoher CG-Gehalt bedingt nämlich eine stärkere Bindung zweier komplementärer RNA- oder DNA-Fragmente aneinander, da sich zwischen C und G drei Wasserstoffbrücken befinden (im Gegensatz zu zwei Brücken bei A/T-Paaren). Die purinreichen Sequenzen weisen viele G/C-Paare auf und dementsprechend auch eine höhere Schmelztemperatur. Wenn der Grund für die Resistenz der purinreichen Sequenzen gegen die RNase H-Aktivität der RT in ihrer Schmelztemperatur liegt, könnte die Stabilität der Polypurin-Primer der Grund für ihre Funktion als Primer der Plusstrang-Synthese sein. Unsere Mutationen



hatten die Schmelztemperatur der Polypurin-Primer eventuell zu wenig verändert - um wie viele Grad eine Schmelztemperatur sich ändern müsste, ist unklar - so dass sie nach wie vor stabil genug waren, um als Zweitinitiationsort zu dienen.

Andere Mutationen wären im pMD9-Kontext eventuell noch interessant, um einen Einfluss auf die reverse Transkription zu zeigen.

## 5.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit erfolgte Grundlagenforschung an einem mit zahlreichen human- und tierpathogenen (Retro-)Viren verwandten selbst apathogenem Virus mag nicht nur dazu beitragen, die pathogenen Verwandten besser zu verstehen. Auch die Apathogenität von FV ist von Bedeutung, da sie sich deshalb besonders gut für die Gentherapie eignen. PFV-Vektoren sind nicht nur in der Lage, fast alle Stammzellen zu transduzieren (Gharwan et al., 2007; Leurs et al., 2003), sie können des Weiteren große DNA-Mengen transportieren und sind auf Grund ihrer gleichmäßigen Integration im humanen Erbgut ohne Bevorzugung von Protoonkogenen (Nowrouzi et al., 2006) im Gegensatz zu anderen retroviralen Vektoren vermutlich nicht onkogen. Um geeignete Vektoren zur Gentherapie zu entwickeln, ist es essentiell, die Vorgänge im Replikationszyklus von PFV aufzuschlüsseln. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation des Elements D im pMD9-Vektor zu einer reduzierten Transduktionseffizienz führte. pMD9 (Heinkelein et al., 2002a) und der Deltaphi-Vektor (Trobridge et al., 2002) gelten bislang als die effizientesten foamyviralen Vektoren. Beide enthalten die gesamte CAS I und CAS II. Innerhalb von CAS I, 30 bp strangaufwärts der PBS, liegt die Pol encapsidation sequence I (PES I), am 3'-Ende von CAS II liegt die PES II – beide PES sind von Nöten, um Pol ins Partikel zu inkorporieren. Ohne die CAS I und II findet des Weiteren keine RNA-Verpackung ins Partikel statt (Peters et al., 2005). Dies erklärt also, weshalb CAS I und CAS II pMD9 und Deltaphi zu effizienten Vektoren machen. Im Übrigen enthalten beide auch alle vier Elemente A bis D. Zukünftige Vektoren könnten eventuell weiter in den CAS beschnitten werden, würde man alle Sequenzen identifizieren, die zum Vektortransfer benötigt werden. Die CAS II ist mit 2 kb sehr lang, eine Kürzung wäre wünschenswert. Eine essentielle Funktion zugeschrieben wurde einem ca. 800 bp-umfassendem Stück am 5'-Ende, ohne dieses erfolgt keine RNA-Verpackung ins Partikel (Heinkelein et

al., 1998; Peters et al., 2005). Nach einem irrelevanten RNA-Abschnitt strangabwärts von dieser Sequenz folgt die ca. 350 bp umfassende PES II am 3'-Ende des pol-Genes, welches für die Pol-Inkorporation benötigt wird (Peters et al., 2005). Verwendet man diesen Abschnitt der CAS II – also das 800 bp-lange 5'Ende von CAS II und die PES II am 3'-Ende von CAS II – zusammen mit CAS I, so ist die Vektortransduktion etwas weniger effizient als die pMD9-Transduktion, Pol und RNA werden jedoch effizient ins Partikel verpackt. Verwendet man lediglich die PES I anstatt der gesamten CAS I findet keine effiziente Transduktion mehr statt, Pol- und RNA-Verpackung ins Partikel sind nicht mehr detektierbar. pMD9 beinhaltet alle Elemente A bis D, wobei das mutierte Element D in dieser Arbeit das war, welches die Vektortransduktion von pMD9 herab setzte. Das Anhängen einer kurzen, den Element D enthaltenden Sequenz an CAS II führte zu einer ebenso effizienten Transduktion wie beim pMD9-Vektor. Mutationen in diesem Vektorkontext in Element D, waren auch hier in der Lage, die Vektortransduktion zu mindern (Wictorowicz et al., 2009). Dies zeigt, dass es das Element D ist, welches zusammen mit CAS I und bestimmten Elementen von CAS II (s. Peters et al., 2005) einen effizienten Vektor für die Gentherapie ausmacht. Zukünftige Vektoren können also weiter verkürzt werden und dennoch effizient transduzieren. Zusammenfassend werden die Elemente A und B als Bestandteile von CAS II benötigt, die zu einer noch nicht näher untersuchten RNA-Pol-Interaktion beizutragen scheint, die letztendlich Pol und RNA ins Viruspartikel inkorporiert. Element C scheint zwar im proviralen Kontext benötigt zu werden, ist aber entbehrlich im Rahmen von viralen Vektoren.

Das Element D ist das essentielle Element, welches die Replikation und so auch die Expression von DNA in Vektoren beschleunigt. In dieser Arbeit und bei Wictorowicz et al., 2009 konnte gezeigt werden, dass Vektoren ohne ein intaktes Element D weniger effizient sind als jene mit. Zukünftige Vektoren für die Gentherapie müssen also das Element D enthalten, sollen sie eine ausreichende Expression von in ihnen transportierten Genen erreichen.

Die Identifikation der foamyviralen Plusstrangdiskontinuität als *gap* ist insofern von Bedeutung, als dass gezeigt werden konnte, dass hier kein *flap* vorliegt. Da das *flap* durch bereits dargelegte Besonderheiten bei der reversen Transkription über cPPT und CTS in HIV entsteht und es am Kernimport beteiligt ist, gelingt vielleicht über den Einbau eines HIV-cPPT mit CTS in ein foamyvirales Genom der

Kernimport in ruhende Zellen, womit das Spektrum für foamyvirale Gentherapie nochmals erweitert werden könnte auf z.B. Neurone.

Jedenfalls gibt es bereits erfolgreiche foamyvirale Vektoren zur Therapie der CD18-Defizienz im Hundemodell (Bauer et al., 2008) und der Fanconi-Anämie im Mausmodell (Si et al., 2008). FV-Vektoren sollten auf Grund der bereits dargelegten Unterschiede zu anderen RV besser zur Gentherapie geeignet sein als gammaretrovirale oder lentivirale Vektoren (Rethwilm et al., 2007). In den kommenden Jahren sind hier sicher noch viele Ergebnisse zu erwarten, die einige neue Therapieoptionen in der Medizin eröffnen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aida, Y. (2009). "[Novel nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr promoted by importin alpha]." *Seikagaku* **81**(8): 720-5.
- Anderson, W. F. (1984). "Prospects for human gene therapy." *Science* **226**(4673): 401-9.
- Arhel, N., S. Munier, et al. (2006). "Nuclear import defect of human immunodeficiency virus type 1 DNA flap mutants is not dependent on the viral strain or target cell type." *J Virol* **80**(20): 10262-9.
- Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, et al. (2007). "HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore." *Embo J* **26**(12): 3025-37.
- Baldwin, D. N. and M. L. Linial (1998). "The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus." *J Virol* **72**(5): 3658-65.
- Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." *Nature* **226**(5252): 1209-11.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-71.
- Barry, S. C., J. Seppen, et al. (2000). "Lentiviral and murine retroviral transduction of T cells for expression of human CD40 ligand." *Hum Gene Ther* **11**(2): 323-32.
- Bartenschlager, R. and H. Schaller (1992). "Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome." *Embo J* **11**(9): 3413-20.
- Bauer, T. R., Jr., J. M. Allen, et al. (2008). "Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors." *Nat Med* **14**(1): 93-7.
- Bieniasz, P. D., R. A. Weiss, et al. (1995). "Cell cycle dependence of foamy retrovirus infection." *J Virol* **69**(11): 7295-9.
- Bishop, K. N., R. K. Holmes, et al. (2004). "APOBEC-mediated editing of viral RNA." *Science* **305**(5684): 645.
- Bodem, J., H. G. Krausslich, et al. (2007). "Acetylation of the foamy virus transactivator Tas by PCAF augments promoter-binding affinity and virus transcription." *J Gen Virol* **88**(Pt 1): 259-63.
- Bodem, J., M. Lochelt, et al. (1996). "Characterization of the spliced pol transcript of feline foamy virus: the splice acceptor site of the pol transcript is located in gag of foamy viruses." *J Virol* **70**(12): 9024-7.
- Boulanger, P. and I. Jones (1996). "Use of heterologous expression systems to study retroviral morphogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* **214**: 237-60.
- Boussif, O., M. A. Zanta, et al. (1996). "Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold." *Gene Ther* **3**(12): 1074-80.
- Bowman, E. H., V. K. Pathak, et al. (1996). "Efficient initiation and strand transfer of polypurine tract-primed plus-strand DNA prevent strand transfer of internally initiated plus-strand DNA." *J Virol* **70**(3): 1687-94.
- Bray, M., S. Prasad, et al. (1994). "A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1256-60.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, et al. (1992). "Active nuclear import of human

- immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6580-4.
- Charneau, P., M. Alizon, et al. (1992). "A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication." J Virol **66**(5): 2814-20.
- Charneau, P. and F. Clavel (1991). "A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract." J Virol **65**(5): 2415-21.
- Charneau, P., G. Mirambeau, et al. (1994). "HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome." J Mol Biol **241**(5): 651-62.
- Colicelli, J. and S. P. Goff (1988). "Sequence and spacing requirements of a retrovirus integration site." J Mol Biol **199**(1): 47-59.
- de la Maza, L. M., A. Faras, et al. (1975). "Integration of avian sarcoma virus specific DNA in mammalian chromatin." Exp Cell Res **93**(2): 484-6.
- Delebecque, F., R. Suspene, et al. (2006). "Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases." J Virol **80**(2): 605-14.
- Delelis, O., A. Saib, et al. (2003). "Biphasic DNA synthesis in spumaviruses." J Virol **77**(14): 8141-6.
- DeStefano, J. J., L. M. Mallaber, et al. (1994). "Quantitative analysis of RNA cleavage during RNA-directed DNA synthesis by human immunodeficiency and avian myeloblastosis virus reverse transcriptases." Nucleic Acids Res **22**(18): 3793-800.
- Donello, J. E., J. E. Loeb, et al. (1998). "Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element." J Virol **72**(6): 5085-92.
- Dotti, G., B. Savoldo, et al. (2009). "Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: "are we nearly there yet?"" Hum Gene Ther **20**(11): 1229-39.
- DuBridge, R. B., P. Tang, et al. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol Cell Biol **7**(1): 379-87.
- Dvorin, J. D., P. Bell, et al. (2002). "Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import." J Virol **76**(23): 12087-96.
- Enders, J. F. and T. C. Peebles (1954). "Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles." Proc Soc Exp Biol Med **86**(2): 277-86.
- Enssle, J., I. Jordan, et al. (1996). "Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4137-41.
- Erlwein, O., P. D. Bieniasz, et al. (1998). "Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors." J Virol **72**(7): 5510-6.
- Falcone, V., J. Leupold, et al. (1999). "Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa." Virology **257**(1): 7-14.
- Falcone, V., M. Schweizer, et al. (2003). "Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 161-80.
- Federici, T. and N. Boulis (2007). "Gene therapy for peripheral nervous system diseases." Curr Gene Ther **7**(4): 239-48.
- Finston, W. I. and J. J. Champoux (1984). "RNA-primed initiation of Moloney murine leukemia virus plus strands by reverse transcriptase in vitro." J Virol **51**(1): 26-33.

- Fischer, N., M. Heinkelein, et al. (1998). "Foamy virus particle formation." J Virol **72**(2): 1610-5.
- Fuentes, G. M., P. J. Fay, et al. (1996). "Relationship between plus strand DNA synthesis removal of downstream segments of RNA by human immunodeficiency virus, murine leukemia virus and avian myeloblastoma virus reverse transcriptases." Nucleic Acids Res **24**(9): 1719-26.
- Gallay, P., S. Swingler, et al. (1995). "HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase." Cell **83**(4): 569-76.
- Gartner, K., T. Wiktorowicz, et al. (2009). "Accuracy estimation of foamy virus genome copying." Retrovirology **6**: 32.
- Gartner, S., P. Markovits, et al. (1986). "Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS." Jama **256**(17): 2365-71.
- Gharwan, H., R. K. Hirata, et al. (2007). "Transduction of human embryonic stem cells by foamy virus vectors." Mol Ther **15**(10): 1827-33.
- Giannini, C., S. Morosan, et al. (2003). "A highly efficient, stable, and rapid approach for ex vivo human liver gene therapy via a FLAP lentiviral vector." Hepatology **38**(1): 114-22.
- Goff, S., 2007. Retroviridae: The retroviruses and their replication. In "Fields Virology, 5th Ed." (D.M. Knipe and P.M. Howley, Ed.), Vol. 2, pp. 1999-2069. 2 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Hacein-Bey, S., F. Yates, et al. (2002). "Gene therapy of severe combined immunodeficiencies: from mice to humans." Neth J Med **60**(7): 299-301.
- Hacein-Bey-Abina, S., F. Le Deist, et al. (2002). "Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy." N Engl J Med **346**(16): 1185-93.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, et al. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-6.
- Hahn, H., G. Baunach, et al. (1994). "Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins." J Gen Virol **75** ( Pt 10): 2635-44.
- Hattman, S., S. Schlagman, et al. (1973). "Isolation of a mutant of Escherichia coli defective in cytosine-specific deoxyribonucleic acid methylase activity and in partial protection of bacteriophage lambda against restriction by cells containing the N-3 drug-resistance factor." J Bacteriol **115**(3): 1103-7.
- Hayman, M. J. (1978). "Viral polyproteins in chick embryo fibroblasts infected with avian sarcoma leukosis viruses." Virology **85**(1): 241-52.
- Heinkelein, M., M. Dressler, et al. (2002). "Improved primate foamy virus vectors and packaging constructs." J Virol **76**(8): 3774-83.
- Heinkelein, M., C. Leurs, et al. (2002). "Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids." J Virol **76**(19): 10069-73.
- Heinkelein, M., T. Pietschmann, et al. (2000). "Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome." Embo J **19**(13): 3436-45.
- Heinkelein, M., M. Rammling, et al. (2003). "Retrotransposition and cell-to-cell transfer of foamy viruses." J Virol **77**(21): 11855-8.
- Heinkelein, M., M. Schmidt, et al. (1998). "Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors." J Virol **72**(8): 6307-14.

- Herchenroder, O., R. Renne, et al. (1994). "Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV)." *Virology* **201**(2): 187-99.
- Heyman, T., M. Wilhelm, et al. (2003). "The central PPT of the yeast retrotransposon Ty1 is not essential for transposition." *J Mol Biol* **331**(2): 315-20.
- Hill, C. L., P. D. Bieniasz, et al. (1999). "Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy." *J Gen Virol* **80 ( Pt 8)**: 2003-9.
- Hirota, K., A. H. Sherker, et al. (1987). "Effects of adenine arabinoside on serum and intrahepatic replicative forms of duck hepatitis B virus in chronic infection." *Hepatology* **7**(1): 24-8.
- Huang, J. and T. J. Liang (1993). "A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products." *Mol Cell Biol* **13**(12): 7476-86.
- Huang, S. Z., F. Y. Zeng, et al. (1999). "The delta-globin RNA transcript level in beta-thalassemia carriers." *Acta Haematol* **102**(1): 1-6.
- Huber, H. E. and C. C. Richardson (1990). "Processing of the primer for plus strand DNA synthesis by human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase." *J Biol Chem* **265**(18): 10565-73.
- Hungnes, O., E. Tjøtta, et al. (1992). "Mutations in the central polypurine tract of HIV-1 result in delayed replication." *Virology* **190**(1): 440-2.
- Imrich, H., M. Heinkelein, et al. (2000). "Primate foamy virus Pol proteins are imported into the nucleus." *J Gen Virol* **81**(Pt 12): 2941-7.
- Jacks, T. and H. E. Varmus (1985). "Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting." *Science* **230**(4731): 1237-42.
- Jamjoom, G. A., R. B. Naso, et al. (1977). "Further characterization of intracellular precursor polyproteins of Rauscher leukemia virus." *Virology* **78**(1): 11-34.
- Jaskolski, M., J. N. Alexandratos, et al. (2009). "Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy." *Febs J* **276**(11): 2926-46.
- Jones, T. A., G. Blaug, et al. (1990). "Assembly of gag-beta-galactosidase proteins into retrovirus particles." *J Virol* **64**(5): 2265-79.
- Jordan, I., J. Enssle, et al. (1996). "Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA." *Virology* **224**(1): 314-9.
- Katzourakis, A., R. J. Gifford, et al. (2009). "Macroevolution of complex retroviruses." *Science* **325**(5947): 1512.
- Kelleher, C. D. and J. J. Champoux (1998). "Characterization of RNA strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase." *J Biol Chem* **273**(16): 9976-86.
- Kelleher, C. D. and J. J. Champoux (2000). "RNA degradation and primer selection by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase contribute to the accuracy of plus strand initiation." *J Biol Chem* **275**(17): 13061-70.
- Klarmann, G. J., H. Yu, et al. (1997). "Discontinuous plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and in a partially reconstituted cell-free system." *J Virol* **71**(12): 9259-69.
- Kupiec, J. J., J. Tobaly-Tapiero, et al. (1988). "Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses." *Nucleic Acids Res* **16**(20): 9557-65.
- Lee, E. G. and M. L. Linial (2008). "The C terminus of foamy retrovirus Gag

- contains determinants for encapsidation of Pol protein into virions." J Virol **82**(21): 10803-10.
- Leurs, C., M. Jansen, et al. (2003). "Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells." Hum Gene Ther **14**(6): 509-19.
- Lewis, P., M. Hensel, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle." Embo J **11**(8): 3053-8.
- Lewis, P. F. and M. Emerman (1994). "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus." J Virol **68**(1): 510-6.
- Limon, A., E. Devroe, et al. (2002). "Nuclear localization of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes (PICs): V165A and R166A are pleiotropic integrase mutants primarily defective for integration, not PIC nuclear import." J Virol **76**(21): 10598-607.
- Lindemann, D. and P. A. Goepfert (2003). "The foamy virus envelope glycoproteins." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 111-29.
- Lindemann, D., T. Pietschmann, et al. (2001). "A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity." J Virol **75**(13): 5762-71.
- Linial, M., 2007. Foamy Viruses. In "Fields Virology, 5th Ed." (D.M. Knipe and P.M. Howley, Ed.), Vol. 2, pp. 2245-2262. 2 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Linial, M. (2000). "Why aren't foamy viruses pathogenic?" Trends Microbiol **8**(6): 284-9.
- Lochelt, M. and R. M. Flugel (1996). "The human foamy virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein." J Virol **70**(2): 1033-40.
- Lochelt, M., F. Romen, et al. (2005). "The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7982-7.
- Mann, R., R. C. Mulligan, et al. (1983). "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus." Cell **33**(1): 153-9.
- Mariani, R., D. Chen, et al. (2003). "Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif." Cell **114**(1): 21-31.
- Maurer, B., H. Bannert, et al. (1988). "Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus." J Virol **62**(5): 1590-7.
- McWilliams, M. J., J. G. Julias, et al. (2003). "Mutations in the 5' end of the human immunodeficiency virus type 1 polypurine tract affect RNase H cleavage specificity and virus titer." J Virol **77**(20): 11150-7.
- Meiering, C. D., K. E. Comstock, et al. (2000). "Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells." J Virol **74**(4): 1718-26.
- Meiering, C. D. and M. L. Linial (2001). "Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection." Clin Microbiol Rev **14**(1): 165-76.
- Miles, L. R., B. E. Agresta, et al. (2005). "Effect of polypurine tract (PPT) mutations on human immunodeficiency virus type 1 replication: a virus with a completely randomized PPT retains low infectivity." J Virol **79**(11): 6859-67.
- Miller, D. G., M. A. Adam, et al. (1990). "Gene transfer by retrovirus vectors occurs



- only in cells that are actively replicating at the time of infection." Mol Cell Biol **10**(8): 4239-42.
- Modrow S., Falke D. & Truyen U. (2003): *Molekulare Virologie*. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Moebes, A., J. Enssle, et al. (1997). "Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle." J Virol **71**(10): 7305-11.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Murray, S. M. and M. L. Linial (2006). "Foamy virus infection in primates." J Med Primatol **35**(4-5): 225-35.
- Murray, S. M., L. J. Picker, et al. (2008). "Replication in a superficial epithelial cell niche explains the lack of pathogenicity of primate foamy virus infections." J Virol **82**(12): 5981-5.
- Nanou, A. and M. Azzouz (2009). "Gene therapy for neurodegenerative diseases based on lentiviral vectors." Prog Brain Res **175**: 187-200.
- Noad, R. J., N. S. Al-Kaff, et al. (1998). "Analysis of polypurine tract-associated DNA plus-strand priming in vivo utilizing a plant pararetroviral vector carrying redundant ectopic priming elements." J Biol Chem **273**(49): 32568-75.
- Nowrouzi, A., M. Dittrich, et al. (2006). "Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line." J Gen Virol **87**(Pt 5): 1339-47.
- Ogert, R. A. and K. L. Beemon (1998). "Mutational analysis of the rous sarcoma virus DR posttranscriptional control element." J Virol **72**(4): 3407-11.
- Ogert, R. A., L. H. Lee, et al. (1996). "Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm." J Virol **70**(6): 3834-43.
- Omer, C. A., R. Resnick, et al. (1984). "Evidence for involvement of an RNA primer in initiation of strong-stop plus DNA synthesis during reverse transcription in vitro." J Virol **50**(2): 465-70.
- Oppermann, H., J. M. Bishop, et al. (1977). "A joint produce of the genes gag and pol of avian sarcoma virus: a possible precursor of reverse transcriptase." Cell **12**(4): 993-1005.
- Panganiban, A. T. and H. M. Temin (1983). "The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production." Nature **306**(5939): 155-60.
- Park, J. and C. D. Morrow (1991). "Overexpression of the gag-pol precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production." J Virol **65**(9): 5111-7.
- Parks, W. P., G. J. Todaro, et al. (1971). "RNA dependent DNA polymerase in primate syncytium-forming (foamy) viruses." Nature **229**(5282): 258-60.
- Patton, G. S., O. Erlwein, et al. (2004). "Cell-cycle dependence of foamy virus vectors." J Gen Virol **85**(Pt 10): 2925-30.
- Peeters, M., V. Courgnaud, et al. (2002). "Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat." Emerg Infect Dis **8**(5): 451-7.
- Peters, K., N. Barg, et al. (2008). "Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication." Virology **373**(1): 51-60.
- Peters, K., T. Wiktorowicz, et al. (2005). "RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles." J Virol **79**(11): 7005-13.

- Petit, C., M. L. Giron, et al. (2003). "Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3433-42.
- Pfrepper, K. I., H. R. Rackwitz, et al. (1998). "Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease." J Virol **72**(9): 7648-52.
- Philipson, L., P. Andersson, et al. (1978). "Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: enhancement of the gag-pol polypeptide with yeast suppressor tRNA." Cell **13**(1): 189-99.
- Picard-Maureau, M., G. Jarmy, et al. (2003). "Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process." J Virol **77**(8): 4722-30.
- Pietschmann, T., M. Heinkelein, et al. (1999). "Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export." J Virol **73**(4): 2613-21.
- Pope, B. and H. M. Kent (1996). "High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **24**(3): 536-7.
- Powell, M. D. and J. G. Levin (1996). "Sequence and structural determinants required for priming of plus-strand DNA synthesis by the human immunodeficiency virus type 1 polypurine tract." J Virol **70**(8): 5288-96.
- Qasim, W., H. B. Gaspar, et al. (2009). "Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies." Gene Ther **16**(11): 1285-91.
- Ratray, A. J. and J. J. Champoux (1989). "Plus-strand priming by Moloney murine leukemia virus. The sequence features important for cleavage by RNase H." J Mol Biol **208**(3): 445-56.
- Ratray, A. J. and J. J. Champoux (1989). "Plus-strand priming by Moloney murine leukemia virus. The sequence features important for cleavage by RNase H." J Mol Biol **208**(3): 445-56.
- Rethwilm, A. (2003). "The replication strategy of foamy viruses." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 1-26.
- Rethwilm, A., 2005. Foamy viruses *In* "Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections - Virology, 10th Ed." (B.W.J. Mahy and V. ter Meulen, Ed.), Vol. 2, pp. 1304-1321. Hodder Arnold, London.
- Rethwilm, A. (2007). "Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors." Curr Gene Ther **7**(4): 261-71.
- Rethwilm, A., O. Erlwein, et al. (1991). "The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(3): 941-5.
- Robson, N. D. and A. Telesnitsky (1999). "Effects of 3' untranslated region mutations on plus-strand priming during moloney murine leukemia virus replication." J Virol **73**(2): 948-57.
- Roe, T., T. C. Reynolds, et al. (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." Embo J **12**(5): 2099-108.
- Roy, J., W. Rudolph, et al. (2003). "Feline foamy virus genome and replication strategy." J Virol **77**(21): 11324-31.
- Russell, R. A., H. L. Wiegand, et al. (2005). "Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors." J Virol **79**(14): 8724-31.
- Saib, A., F. Puvion-Dutilleul, et al. (1997). "Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step." J Virol **71**(2): 1155-61.
- Saib, A., F. Puvion-Dutilleul, et al. (1997). "Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step." J Virol **71**(2): 1155-61.

- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-79.
- Schlagman, S., S. Hattman, et al. (1976). "In vivo methylation by Escherichia coli K-12 mec+ deoxyribonucleic acid-cytosine methylase protects against in vitro cleavage by the RII restriction endonuclease (R. Eco RII)." J Bacteriol **126**(2): 990-6.
- Schmidt, M. and A. Rethwilm (1995). "Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes." Virology **210**(1): 167-78.
- Schultz, S. J., M. Zhang, et al. (1999). "Polypurine tract primer generation and utilization by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase." J Biol Chem **274**(49): 34547-55.
- Schultz, S. J., M. Zhang, et al. (2000). "Analysis of plus-strand primer selection, removal, and reutilization by retroviral reverse transcriptases." J Biol Chem **275**(41): 32299-309.
- Sharp, P. M., E. Bailes, et al. (2001). "The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1410): 867-76.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, et al. (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." Nature **418**(6898): 646-50.
- Si, Y., A. C. Pulliam, et al. (2008). "Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of Fancc<sup>-/-</sup> stem cells." Blood **112**(12): 4458-65.
- Sirven, A., F. Pflumio, et al. (2000). "The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells." Blood **96**(13): 4103-10.
- Smith, J. K., A. Cywinski, et al. (1984). "Initiation of plus-strand DNA synthesis during reverse transcription of an avian retrovirus genome." J Virol **49**(1): 200-4.
- Steffen, D. and R. A. Weinberg (1978). "The integrated genome of murine leukemia virus." Cell **15**(3): 1003-10.
- Tobaly-Tapiero, J., J. J. Kupiec, et al. (1991). "Further characterization of the gapped DNA intermediates of human spumavirus: evidence for a dual initiation of plus-strand DNA synthesis." J Gen Virol **72** ( Pt 3): 605-8.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Trobridge, G. and D. W. Russell (2004). "Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors." J Virol **78**(5): 2327-35.
- Trobridge, G., G. Vassilopoulos, et al. (2002). "Gene transfer with foamy virus vectors." Methods Enzymol **346**: 628-48.
- Trobridge, G. D., J. Allen, et al. (2009). "Foamy and lentiviral vectors transduce canine long-term repopulating cells at similar efficiency." Hum Gene Ther **20**(5): 519-23.
- Varmus, H. E., T. Padgett, et al. (1977). "Cellular functions are required for the synthesis and integration of avian sarcoma virus-specific DNA." Cell **11**(2):

- 307-19.
- Varmus, H. E., P. K. Vogt, et al. (1973). "Integration of deoxyribonucleic acid specific for Rous sarcoma virus after infection of permissive and nonpermissive hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(11): 3067-71.
- Vogt, V. M. (1996). "Proteolytic processing and particle maturation." Curr Top Microbiol Immunol **214**: 95-131.
- Wiktorowicz, T., K. Peters, et al. (2009). "Generation of an improved foamy virus vector by dissection of cis-acting sequences." J Gen Virol **90**(Pt 2): 481-7.
- Williams, D. A., I. R. Lemischka, et al. (1984). "Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse." Nature **310**(5977): 476-80.
- Wills, J. W. and R. C. Craven (1991). "Form, function, and use of retroviral gag proteins." Aids **5**(6): 639-54.
- Wodrich, H., A. Schambach, et al. (2000). "Multiple copies of the Mason-Pfizer monkey virus constitutive RNA transport element lead to enhanced HIV-1 Gag expression in a context-dependent manner." Nucleic Acids Res **28**(4): 901-10.
- Wu, M., S. Chari, et al. (1998). "cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors." J Virol **72**(4): 3451-4.
- Yoshinaka, Y., I. Katoh, et al. (1985). "Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(6): 1618-22.
- Yu, S. F., D. N. Baldwin, et al. (1996). "Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses." Science **271**(5255): 1579-82.
- Yu, S. F., M. D. Sullivan, et al. (1999). "Evidence that the human foamy virus genome is DNA." J Virol **73**(2): 1565-72.
- Zacchigna, S. and M. Giacca (2009). "Chapter 20: Gene therapy perspectives for nerve repair." Int Rev Neurobiol **87**: 381-92.
- Zenger, E., W. C. Brown, et al. (1993). "Evaluation of cofactor effect of feline syncytium-forming virus on feline immunodeficiency virus infection." Am J Vet Res **54**(5): 713-8.
- Zennou, V., C. Petit, et al. (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." Cell **101**(2): 173-85.
- Zennou, V., C. Serguera, et al. (2001). "The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain." Nat Biotechnol **19**(5): 446-50.
- Zolotukhin, A. S., A. Valentin, et al. (1994). "Continuous propagation of RRE(-) and Rev(-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a cis-acting element of simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes." J Virol **68**(12): 7944-52.

## 7 Anhang

### 7.1 Zusammenfassung

Foamyviren enthalten vier zentrale purinreiche Sequenzen, die Elemente A bis D. Bekannt sind solche auch bei anderen Retroviren, u.a. bei HIV, wo der cPPT (central polypurine tract) für eine effektive Replikation benötigt wird und eine Kopie des 3'PPT darstellt. Bei FV ist nur das Element D sequenzidentisch zum 3'PPT, welcher sich bei allen Retroviren findet und von welchem die Plusstrang-Synthese bei der Bildung der cDNA intiiert wird. Vermutet wurde daher für das Element D, das es einen zweiten Initiationsort für die Plusstrang-Synthese darstellt und analog zum cPPT bei HIV die Replikation zu beschleunigen vermag.

Um die Funktion der purinreichen Sequenzen zu verstehen, führten wir Mutationen in die Elemente A bis D ein und untersuchten sie im infektiösen Vollängenklon sowie im Vektorkontext; zusätzlich analysierten wir die viralen Proteine in infizierten Zellen und Viruspartikeln. Es ließ sich zeigen, dass Elemente A und B an der Pol-Inkorporation ins Partikel beteiligt sind. Element C scheint eine Rolle bei der gag-Transkription zu spielen. Mutationen in Element D führten zu einer reduzierten Effektivität des Vektortransfers. Ferner untersuchten wir die an Element D angrenzende Plusstrang-Diskontinuität, wie sie ebenfalls in anderen Viren auftritt. Bei PFV konnten wir im Rahmen von RACE-Experimenten ein *gap* auf dem Plusstrang nachweisen, welches von variabler Länge mit verschiedenen Start- und Endpunkten ist. Die Funktion des Elements D und Ursache und Funktion des *gaps* bleiben weiter unklar. Insbesondere die Etablierung von Langzeit-Viruskulturen und weitere RACE-Experimente an Element D-Mutanten wären zum besseren Verständnis in Zukunft interessant.

## 7.2 Summary

Foamy viruses contain four central purine-rich sequences, namely element A, B, C and D. Such sequences are also known in other retroviruses, for example in HIV, which harbours a cPPT (central polypurine tract) that is needed for effective replication and is an exact copy of the 3'PPT. In FV only element D is a copy of the 3'PPT, which is essential for reverse transcription as it is the initiation site for plus strand DNA synthesis. Therefore, element D is thought to serve as a second initiation site for plus strand DNA synthesis in order to accelerate viral replication. We mutated the four purine-rich elements and analysed them in vector and infectious virus context to determine their role; furthermore we investigated viral protein production in infected cells and viral particles.

Element A and B turned out to be necessary for pol encapsidation. Element C seems to play a role in gag expression. Mutation of element D caused a less effective vector transduction. Its role remained elusive, despite of investigation of the plus strand discontinuity adjacent to element D, which is also found in other retroviruses. In FV, the discontinuity is a gap of variable length and with multiple possible origin and termination sites. Further research will have to be done to understand the role of the purine rich sequences and the gap for foamyviral replication. Especially long term viral cultures and RACE experiments on element D variants are of interest.

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent = 1/100
°C	Grad Celsius = Maßeinheit der Temperatur
Δ	abkürzend für „geändert“ oder „deletiert“ je nach Kontext
A	Adenosin
A	Ampere = SI-Maßeinheit der Stromstärke
a.d.	aqua dest
Abb.	Abbildung
AIDS	Autoimmune deficiency syndrome
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATV	Antibiotic-trypsine-versene
Bet	between env and tas = akzessorisches Protein bei Foamyviren
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Capsid
ca.	circa
CAS	cis-aktive Sequenzen
cDNA	copied DNA = revers transkribierte DNA
CGD	chronic granulomatous disease
cm	centimeter
CMV	Cytomegalievirus
CPE	cytopathological effect = zytopathogener Effekt
cPPT	central polypurine tract = zentraler Polypurintrakt
CTE	constitutive transport element
DLS	dimer linkage site
DNA	desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
Env	envelope = Hüllprotein
ER	endoplasmatisches Retikulum
etc.	et cetera = und so weiter
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
ff.	folgend(e)
FFV	Felines Foamyvirus
FIV	Felines Immundefizienzvirus
FV	Foamyviren
G	Guanin
g	Gramm = Maßeinheit des Gewichts

Gag	Gruppenspezifisches Antigen = Capsid
gp120	Glykoprotein 120 bei HIV
GR-Box	Glycin-reiche Boxen
h	hour = Stunde
HAART	highly active antiretroviral treatment
HFV	Humanes Foamyvirus (veralteter Begriff)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IN	Integrase
IP	interner Promotor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kD	kilo Dalton = Maßeinheit für die Größe von Proteinen
l	Liter = Maßeinheit des Volumens
LP	leader peptide
LTR	long terminal repeat
M	Molar = mol/l
m	mili = $\times 10^{-3}$
m	Meter = SI-Maßeinheit der Länge
MA	Matrixprotein
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
MLV	Murines Leukämie-Virus
mol	SI-Maßeinheit der Stoffmenge
n	nano = $\times 10^{-9}$
N	Normal = Maßeinheit der Konzentration bei Säuren, 1 M = 1 N bei einprotonigen Säuren
NC	Nucleocapsid
p	pico = $\times 10^{-12}$
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEI	Polyethylenimine
PB	Primer-Bindungsstelle
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PFV	Prototyp-Foamyvirus
pH	partes hydrogenii = negativer dekadischer Logarithmus der Wassertstoffionenkonzentration
PIC	Präintegrationskomplex
Pol	Polymerase = zusammenfassend für alle Enzyme bei Retroviren
PPP	Proteinprobenpuffer
PPT	Polypurintrakt
PR	Protease
R	redundant
RACE	rapid amplification of cDNA ends
Rev	regulator of expression of virion proteins
RIPA	Radioimmunopräzipitation
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RRE	Rev responsive element
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	reverse Transkriptase
RV	Retroviren
s	Sekunde = SI-Maßeinheit der Zeit



---

s.	siehe
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	sodium dodecyle sulfate = Natrumdodecylsulfat
SFV	simian foamy virus = Affen-Foamyvirus
s.o.	siehe oben
SU	surface unit
SVP	subvirale Partikel
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tas	transaktivator of spumaviruses
Tat	transaktivator of transcription
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TM	transmembranes Protein
TRE	Tas-responsive element
Tris	Trishydroxy-methylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit = Maßeinheit für Enzymaktivität
U	Uracil
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
U3	unique 3
U5	unique 5
UV	Ultraviolett
V	Volt = Maßeinheit der Stromspannung
v.a.	vor allem
vif	viral factor of infectivity
VLP	virus like particles
X-SCID	X-linked severe combined immunodeficiency syndrome
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μ	mikro = $\times 10^{-6}$

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau eines Retrovirus.....	9
Abb. 2 RNA-Genom eines einfachen Retrovirus .....	11
Abb. 3 Minusstrangsynthese in Retroviren.....	14
Abb. 4 Plusstrangsynthese in Retroviren. Die Initiation erfolgt am 3`PPT.....	15
Abb. 5 Provirus.....	16
Abb. 6 Foamyvirales RNA-Genom .....	21
Abb. 7 Vergleich der reversen Transkription bei Lenti-, Hepadna- und Foamyviren .....	24
Abb. 8 Foamyvirales Provirus.....	26
Abb. 9 RNA-Reste nach RNase H-Verdau.....	26
Abb. 10 Plusstrang-Synthese von den purinreichen Elementen und dem 3`PPT ausgehend.....	27
Abb. 11 Mutationen der purinreichen Sequenzen .....	70
Abb. 12 Wildtyp-Plasmid pcHSRV2.....	72
Abb. 13 Titration der pcHSRV2-Varianten.....	74
Abb. 14 Western Blot-Analyse von 293T-Zell-Lysaten nach Polyfect-Transfektion mit pcHSRV2 (Spur 1) und Varianten (Spur 2 bis 15). .....	75
Abb. 15 Plasmide, die im Vier-Plasmid-System verwendet wurden .....	78
Abb. 16 Transduktionseffizienz der Mutanten in pCpol2 .....	79
Abb. 17 Modifiziertes pcHSRV2-Plasmid: pcHSRV2 M54.....	81
Abb. 18 Titration der pcHSRV2M54-Varianten x 10 <sup>4</sup> /ml.....	82
Abb. 19 Western Blot der 293 T-Zell-Lysate nach Polyfect-Transfektion mit pcHSRV2 M54.....	83
Abb. 20 Transduktionseffizienz der Element-Mutanten in pMD9.....	87
Abb. 21 Western Blot-Analyse der 293T-Zell-Lysate nach PEI-Transfektion mit pMD9, pCenv, pCgag2 und pCpol2.....	88
Abb. 22 Western Blot-Analyse der Partikelpräparation .....	89
Abb. 23 Die Entstehung des DNA-flaps bei HIV.....	102
Abb. 24 gap bei PFV. ....	104

---

## 7.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der Retroviren (nach Rethwilm et al., 2003) .....	8
Tab. 2: Mutagenese-Primer .....	31
Tab. 3: Sequenzierungsprimer .....	33
Tab. 4: Restriktionsverdau .....	47
Tab. 5: PCR – präparativer Ansatz .....	52
Tab. 6: PCR – analytischer Ansatz .....	53
Tab. 7: PCR – Mutationssynthese-Reaktion .....	54
Tab. 8: Transfektionen .....	58
Tab. 9: Überstandtransfer .....	58
Tab. 10: Plasmide in der Polyfect-Transfektion .....	61
Tab. 11: Plasmide in der HBS-Transfektion .....	62
Tab. 12: Plasmide in der PEI-Transfektion .....	63
Tab. 13: pCHSRV2-Varianten .....	73
Tab. 14: pCpol2-Varianten .....	77
Tab. 15: pMD9-Varianten .....	85
Tab. 16: Einflüsse der Elemente auf PFV .....	94

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig 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.

Nicole Barg

Michelstadt, September 2010

## Lebenslauf

**Geburtsdatum:** 08.02.1982  
**Geburtsort:** Berlin, Deutschland  
**Nationalität:** Deutsch  
**Familienstand:** Ledig

### Schulbildung:

1988-1992 Grundschohle Michelstadt  
1992-2001 Gymnasium Michelstadt, Abschluss: Abitur

### Hochschulbildung:

2001-2008 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Abschluss: Examen  
2004-2008 Promotion am Institut für Virologie und Immunologie Würzburg

### Berufsausbildung:

Seit 2008 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Neurologie Klinikum Carl Gustav Carus in Dresden

Nicole Barg

## Publikationsliste

Peters K, Barg N, Gärtner K, Rethwilm A (2008): Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication. Virology 373:51–60  
(Erstautoren unterstrichen)

## Danksagung

Vor allem möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Axel Rethwilm danken, der unerschöpfliche Geduld bewies, als es um die Fertigstellung dieser Arbeit ging. Das Arbeiten im Institut für Virologie in seiner Arbeitsgruppe war sehr angenehm, und ich bedauere vor allem wegen den nun nicht mehr wahrnehmbaren Weihnachtsgansessen den Wegzug aus Würzburg.

Vielen Dank auch an meine Betreuerin (mittlerweile nicht mehr vor Ort), Dr. Katrin Peters, sowie an alle (z.T. ehemaligen) Mitarbeiter der Foamyviren-Arbeitsgruppe, welche mit Rat und Tat zur Seite standen, vor allem Dr. Tatiana Wiktorowicz, Dr. Ali Nowrouzi und Dr. Kathleen Gärtner.

Den größten Dank schulde ich meiner Familie, die mich „vor mich hin doktern“ ließ und mir das Studium an sich ermöglichte, vielen Dank an meinen Vater Dr. Jürgen Barg und meine Mutter, Gabriele Barg.

Im Weiteren für die moralische Unterstützung danke ich meiner Schwester Miriam Barg.