

Herstellung eines neuen foamyviralen Vektors durch Einengung der cis-aktiven Sequenzen



DISSERTATION

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

vorgelegt von

M.Sc. Tatiana Wiktorowicz

aus Warschau

Würzburg, 2009

Eingereicht am: 22.07.2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M.J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. A. Rethwilm

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 11.11.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Retroviren.....	1
1.2	Foamyviren.....	4
1.2.1	Allgemeine Einleitung	4
1.2.2	Aufbau des FV Partikels	7
1.2.3	Genom der Foamyviren	9
1.2.4	Die foamyviralen Proteine.....	12
1.2.4.1	Gag (Kapsidprotein)	12
1.2.4.2	Pol (enzymatische Aktivitäten)	13
1.2.4.3	Env (Hüllprotein).....	15
1.2.4.4	Akzessorische Proteine Bet und Tas.....	16
1.2.5	Der foamyvirale Replikationszyklus	17
1.3	Gentherapie.....	19
1.4	Foamyvirale Vektoren.....	21
1.5	Fragestellung.....	27
2	Material.....	28
2.1	Chemikalien.....	28
2.2	Enzyme und Reaktionspuffer	28
2.3	Antibiotika	28
2.4	Verwendete Organismen.....	29
2.4.1	<i>E. coli</i> -Stämme.....	29
2.4.2	Hefestämme.....	29
2.4.3	Zelllinien.....	30
2.5	Antikörper	30
2.6	Nukleinsäuren	31
2.6.1	Mammaliervektoren	31
2.6.2	Hefevektoren.....	32
2.6.3	Vektorkarten.....	33
2.6.4	Oligonukleotide	35
2.7	Kits	37
2.8	Größen-/Längenstandards	37
2.9	Sonstige Materialien	37
3	Methoden	38
3.1	DNA Methoden.....	38
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.1.2	Sequenzierung von DNA	39

3.1.3	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	40
3.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
3.1.5	Restriktionsverdau von DNA	41
3.1.6	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	42
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	42
3.1.8	Verdau von 3´-Überhängen mittels T4 Polymerase	43
3.1.9	Hybridisierung und Einfügung von Oligonukleotiden.....	43
3.1.10	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	44
3.1.11	Transformation kompetenter Bakterien.....	45
3.1.12	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels der TENS-Methode.	46
3.1.13	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
3.1.14	Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	47
3.1.15	Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA ...	48
3.2	RNA-Methoden.....	49
3.2.1	Herstellung einer RNA-Sonde.....	49
3.2.2	Ribonuklease Protektions Assay <i>Direct Protect Lysate RPA Kit</i> von Ambion.....	50
3.3	Hefekultur	52
3.3.1	Herstellung kompetenter Hefezellen	53
3.3.2	Transformation von Hefezellen	53
3.4	Zellbiologische Methoden.....	54
3.4.1	Kultivierung adhärenter Zellen	54
3.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	55
3.4.3	Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin (PEI).....	55
3.4.4	Herstellung von Zelllysaten.....	57
3.5	Proteinbiochemischen Methoden	58
3.5.1	SDS-Polyacrylamidgel-Ektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.5.2	Western Blot	59
3.6	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	61
3.7	Retrovirales Vektorsystem.....	62
3.7.1	Herstellung virushaltiger Überstände	62
3.7.2	Infektion von Zielzellen mit Virusüberstand.....	63
4	Ergebnisse	64
4.1	Verkürzung der CASII Region	64
4.1.1	Das Testsystem	64
4.1.2	Einengung der CASII Region.....	66

4.1.3	Test auf Pol Inkorporation vermittelt durch die PESI und die verkürzte PESII.....	70
4.1.4	Transduktionsrate der pKP-Vektoren.....	73
4.1.5	Einfügung des cPPT in den pKP33 Vektor	74
4.1.6	Transduktionsrate von pTW01 auf Mesenchymalen Stammzellen (MSC)	79
4.2	Heterologe Verpackung der deletierten PFV CASII Vektoren mit SFV _{mac} Proteinen	80
4.2.1	Doppelverpackung von PFV und SFV _{mac}	83
4.3	Expression der foamyviralen Gag, Pol und Env Proteine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
5	Diskussion	92
5.1	Deletionen der CASII-Region und der Einfluss auf den Vektortransfer	93
5.2	PESI und PESII sind nicht ausreichend für die Pol Verpackung	94
5.3	Die Rolle des cPPT beim Vektortransfer	96
5.4	Verbesserter FV Vektor im Vergleich zu pMD9	98
5.5	Verpackung des Genoms verwandter Foamyviren (PFV und SFV _{mac})	100
5.5.1	Verpackung der deletierten PFV CASII Vektoren durch SFV _{mac} Proteine.	100
5.5.2	Verpackung eines fremden Genoms ist äußerst selten	101
5.6	Studien zur Produktion foamyviraler Partikel in Hefezellen	104
5.7	Vorteile von FV in der Gentherapie	106
5.8	Aussichten	108
6	Literaturverzeichnis	109
7	Anhang	129
7.1	Zusammenfassung	129
7.2	Summary	130
7.3	Abbildungsverzeichnis	131
7.4	Tabellenverzeichnis	132
7.5	Abkürzungsverzeichnis	133
7.6	Klonierungsstrategie	137
7.7	Vektorkarten	139
7.8	Erklärung	140
7.9	Lebenslauf	141
7.10	Publikationsliste	142
7.11	Danksagung	143

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Die Familie der *Retroviridae* umfasst eine große Gruppe von Viren, die in allen Spezies der Mammalia zu finden sind. Eines der Hauptmerkmale, welches die Retroviren von anderen Viren unterscheidet, ist ihr ungewöhnlicher und einzigartiger Replikationszyklus. Im viralen Partikel ist eine genomische positiv-einzelsträngige RNA (Ribonukleinsäure) enthalten, welche nach Eintritt in die Wirtszelle in DNA (Desoxyribonukleinsäure) umgeschrieben und in die chromosomale DNA des Wirts integriert wird (Lewinski and Bushman, 2005). Die integrierte virale DNA, das Provirus (Temin, 1971), dient als Matrize für die Synthese der viralen RNA und der Proteine zur Vermehrung des Virus. Die Umschreibung von RNA in DNA (reverse Transkription) (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970), wie auch die stabile Integration ins Wirtsgenom sind die besonderen Eigenschaften der Retroviren.

Das Enzym, die reverse Transkriptase (RT) findet man nur noch in zwei anderen Virusfamilien, nämlich bei den Hepadnaviridae (Buscher et al., 1985; Nassal and Schaller, 1993, 1996; Summers and Mason, 1982) und bei den Caulimoviridae der Pflanzen (Pfeiffer and Hohn, 1983), allerdings integrieren die Mitglieder dieser Virusfamilien nicht ins Wirtsgenom.

Retroviren werden in zwei verschiedene Unterfamilien eingeteilt, die Orthoretrovirinae und die Spumaretrovirinae. Zu den Orthoretrovirinae gehören sechs Gattungen: Alpharetroviren (z.B. Rous Sarcoma Virus), Betaretroviren (z.B. Mason-Pfizer Monkey Virus), Gammaretroviren (z.B. Murine Leukämie Virus), Deltaretroviren (z.B. Bovine Leukämie Virus), Epsilonretroviren (z.B. Walleye Dermal Sarcoma Virus) und Lentiviren (z.B. Humanes Immunodefizienzvirus). Bei den Spumaretrovirinae findet man als einzige Gattung die Foamyviren (FV, Tab.1.).

Aufgrund ihrer Genomstruktur, werden Retroviren nochmals in einfache und komplexe Retroviren unterteilt. Die einfachen Retroviren wie z.B. das Rous Sarkom Virus (RSV), Murine Leukämie Virus (MLV) und das Mason-Pfizer Monkey Virus (M-PMV) kodieren nur die vier elementaren Virusbestandteile Gag (Kapsidprotein), Pro (Protease), Pol (Polymerase) und Env (Hüllprotein). Die

komplexen Retroviren hingegen besitzen zusätzlich codierende Bereiche für akzessorische Proteine, die verschiedene regulatorische Funktionen erfüllen (Cullen, 1998). Zu den komplexen Retroviren gehören z.B. das Bovine Leukämie Virus (BLV), das Humane T-Zell-Leukämie Virus (HTLV) und das Humane Immundefizienzvirus (HIV) wie auch die Foamyviren (FV).

Tab. 1. Klassifizierung der Retroviren

Name	Beispiele
Alpharetroviren	Avian leukosis virus (ALV) Rous sarcoma virus (RSV)
Betaretroviren	Mouse mammary tumor virus (MMTV) Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) Jaagsiekte sheep retrovirus
Gammaretroviren	Murine leukemia viruses (MLV) Feline leukemia virus (FeLV) Gibbon ape leukemia virus (GALV) Reticuloendotheliosis virus (RevT)
Deltaretroviren	HTLV-1, -2, -3, -4 Bovine leukemia virus (BLV) STLV-1, -2, -3
Epsilonretroviren	Walleye dermal sarcoma virus Walleye epidermal hyperplasia virus 1
Lentiviren	Human Immunodefizienzvirus (HIV) type 1 Human immunodeficiency virus type 2 Simian immunodeficiency virus (SIV) Equine infectious anemia virus (EIAV) Feline immunodeficiency virus (FIV) Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) Visna maedi virus (VMV)
Spumaviren/ Foamyviren	Simian foamy virus, BFV, EFV, FFV

Modifiziert nach Stephen P. Goff

Retroviren wurden schon sehr früh als Erreger von Tumorerkrankungen beschrieben. Sie verursachen sowohl bei Tieren, als auch beim Menschen z.B. Leukämien (BLV, MLV, HTLV) (Gallo, 1981; Poiesz et al., 1981) und solide Tumoren (RSV) (Jolicoeur et al., 1978). Auch die Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) (Barre-Sinoussi et al., 1983; Levy et al., 1984a) und neurologische Erkrankungen (Jacobson et al., 1990; Levy et al., 1984b; Nagai and Osame, 2003; Simpson and Tagliati, 1994) werden durch Retroviren (HIV-1, HTLV-1, MLV) hervorgerufen.

Schätzungsweise 1% des menschlichen Genoms besteht aus endogenen Retrovirussequenzen, welche auf frühe Infektion und Inkorporation von viralen Sequenzen in die Keimbahn zurückzuführen sind (Nelson et al., 2003).

Es ist möglich, die besonderen Eigenschaften der Retroviren, wie die Integration ins Genom, therapeutisch zu nutzen. Anfang der achtziger Jahre, begann die Entwicklung von retroviralen Vektoren als Werkzeug zur Korrektur genetisch vererbbarer somatischer Krankheiten (Gentherapie) (Anderson, 1984; Gaspar and Thrasher, 2005; Joyner et al., 1983; Verma and Weitzman, 2005).

In den folgenden Kapiteln wird näher auf die Spumaviren, ihren Platz in der Familie der Retroviren und die Nutzung retroviraler Vektoren in der Gentherapie eingegangen.

1.2 Foamyviren

1.2.1 Allgemeine Einleitung

Foamyviren sind in vielen Säugetieren weit verbreitet (Hooks and Gibbs, 1975). Dazu gehören Wild- und Hauskatzen, Rinder, Pferde und wahrscheinlich alle Primaten mit Ausnahme des Menschen (Falcone et al., 2003; Saib, 2003). FV wurden auch in Schafen und Seelöwen nachgewiesen (Lecellier and Saib, 2000). Beispiele für FV-Isolate sind in Tab. 2. gezeigt. Das 1971 isolierte FV-Isolat wurde initiiel als Humanes Foamyvirus (HFV, später Prototypisches Foamvirus PFV) beschrieben, welches aus dem Nasenpharynxkarzinom eines Kenianers stammte (Achong et al., 1971a; Achong et al., 1971b). Spätere Sequenzanalysen (Herchenröder et al., 1994) ergaben jedoch, dass es sich dabei um ein Schimpansenfoamyvirus handelte, welches wahrscheinlich durch eine Zoonose auf den Menschen übertragen wurde (Callahan et al., 1999; Switzer et al., 2004; Wolfe et al., 2004).

Tab. 2. Beispiele für Foamyvirus-Isolate und ihre Wirte [nach (Meiering and Linial, 2001)]

Wirt	Virus	Referenz
Katze (Felines FV)	FFV (FeFV, FeSFV)	(Riggs et al., 1969)
Rind (Bovines FV)	BFV (BSV)	(Malmquist et al., 1969)
Pferd (Equines FV)	EFV	(Tobaly-Tapiero et al., 2000)
Rundgesichtsmakake, Rhesusaffe (<i>Macaca cyclopsis</i> , <i>M. mulatta</i>)	SFVmac (SFV-1, SFV-2)	(Johnston, 1961)
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i> sp.)	SFVcpz (SFV-6, SFV-7)	(Rogers et al., 1967)

Der Name Foamyviren (FV) oder Spumaviren, wird von dem englischen Wort „foam“ bzw. lateinischem Wort „Spuma“ abgeleitet, was ins Deutsche übersetzt „Schaum“ bedeutet. In Zellkultur bilden sich in zahlreichen Zelltypen, die mit FV infiziert wurden, intrazelluläre Vakuolen und multinukleäre Synzytium, was schließlich zum Zelltod führt. (Abb. 1). Diese Vakuolen erscheinen als „schaumiges“ Bild im Mikroskop. Zum ersten mal wurde dieser Effekt bei Zellen aus gesunden Affen beschrieben (Enders and Peebles, 1954; Rustigian et al., 1955).

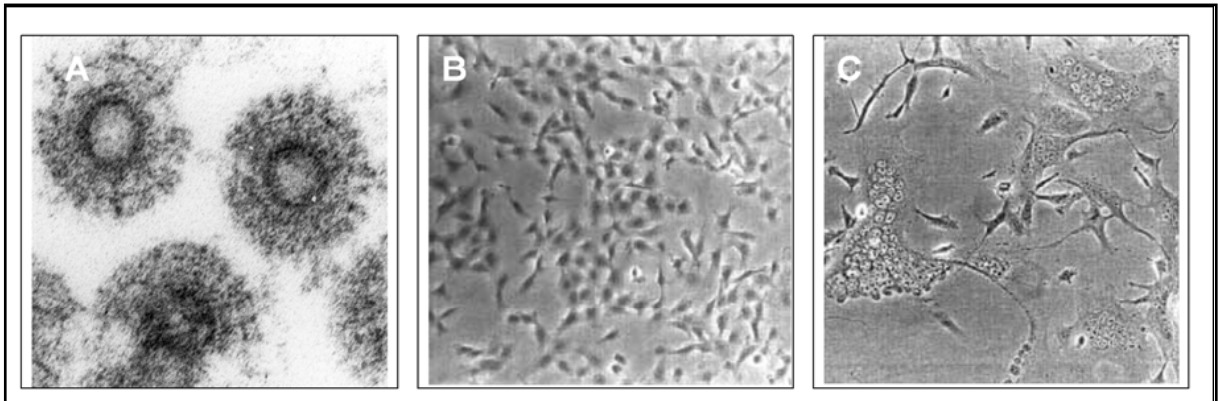


Abb. 1: (A) EM Aufnahme von Spumaviren (H. Zentgraf); (B) uninfizierte humane Fibroblasten; (C) PFV infizierte humane Fibroblasten mit zytopathischen Effekt (Picard-Maureau, 2003)

Trotz des starken zytopathischen Effekts in Zellkultur, konnte selbst in langjährigen Studien in keinem der natürlichen oder zufällig infizierten Wirte eine Krankheit mit FV assoziiert werden (Linial, 2000; Meiering and Linial, 2001; Schweizer et al., 1995). Auch eine neuere Studie an Katzen, die mit dem Felinen Foamyvirus (FFV) intramuskulär infiziert wurden, zeigten keine Krankheitserscheinungen. Eine genauere histopathologische Analyse zeigte jedoch Veränderungen im Lungen- und Nierengewebe der infizierten Tiere (German et al., 2008). Diese

Beobachtungen sind jedoch nur bei Laborinfektionen beschrieben worden und nie bei einer natürlichen Infektion mit FV (Falcone et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, ist der Mensch kein natürlicher Wirt für FV (Ali et al., 1996; Schweizer et al., 1995). Alle bekannten Foamyvirusinfektionen des Menschen sind auf die Transmission aus Affen zurückzuführen (Zoonosen) (Heneine et al., 2003; Heneine et al., 1998; Sandstrom et al., 2000; Switzer et al., 2004; Wolfe et al., 2004). Eine Virusübertragung von Mensch zu Mensch konnte auch während langjähriger Studien nicht nachgewiesen werden (Boneva et al., 2002; Heneine et al., 2003; Linial, 2000; Meiering and Linial, 2001; Switzer et al., 2004)

FV-DNA-Kopien können in fast allen Geweben infizierter Tiere nachgewiesen werden (Feldman et al., 1975; Swack and Hsiung, 1975), die FV-Virusreplikation scheint sich jedoch auf die orale Mucosa zu beschränken (Falcone et al., 1999; Linial, 2000; Meiering and Linial, 2001; Murray et al., 2008). Eine Übertragung von FV bei Primaten und Rindern scheint über den Speichel zu erfolgen, höchstwahrscheinlich durch Bisse oder Lecken (Hooks and Gibbs, 1975; Johnson et al., 1988). Bei Rindern wurde eine Transmission von FV auch durch Milch beschrieben (Romen et al., 2007).

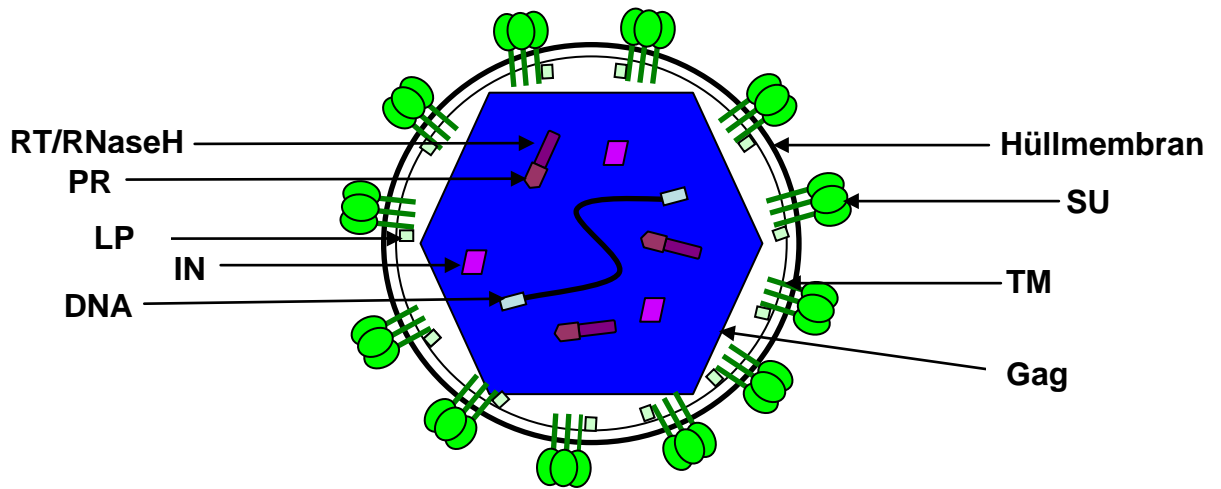
1.2.2 Aufbau des FV Partikels

Das foamyvirale Partikel hat einen Durchmesser von etwa 100 nm und ist von einer Hüllmembran umgeben (Wilk et al., 2001) (Abb. 1). Ähnlich wie bei anderen Retroviren ist das FV Hüllprotein (Env) als Trimer in der Lipidmembran verankert (Wilk et al., 2000). Das Kapsid wird durch das Gag-Protein gebildet, welches prozessiert und unprozessiert vorliegt (Cartellieri et al., 2005a; Fischer et al., 1998; Hahn et al., 1994). Anders als bei Orthoretroviren, wird das FV Gag-Vorläuferprotein durch die virale Protease nicht in Matrixprotein (MA), Kapsidprotein (CA) und Nukleokapsidprotein (NC) gespalten, sondern es findet nur eine C-terminale Verkürzung des 71 kDa großen Gag-Vorläuferproteins um 3 kDa statt. Das FV Kapsid beinhaltet also das Gag-Vorläuferprotein (p71) und die prozessierte 68 kDa große Gag-Variante (p68).

Außer den Strukturproteinen beinhaltet das FV-Virion auch die für die Replikation notwendigen Enzyme, welche aus dem Pol-Vorläuferprotein, mit folgenden Untereinheiten gebildet werden: Protease (PR), Reverse Transkriptase mit RNase H (RT/RH) und Integrase (IN) (Flügel and Pfrepper, 2003; Netzer et al., 1993).

Anders als bei anderen Retroviren, wo die RNA nach Infektion einer Zelle in DNA umgeschrieben wird, erfolgt dieser Prozess bei Foamyviren in einer späten Phase des Replikationszyklus, größtenteils vor der Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel. Deshalb enthalten extrazelluläre Viruspartikel nicht nur DNA aber auch RNA. FV sollten also als Retroviren betrachtet werden, welche ihre RNA vor der Infektion einer neuer Zelle in DNA revers transkribieren (Moebes et al., 1997; Roy et al., 2003; Yu et al., 1999).

A.



B.

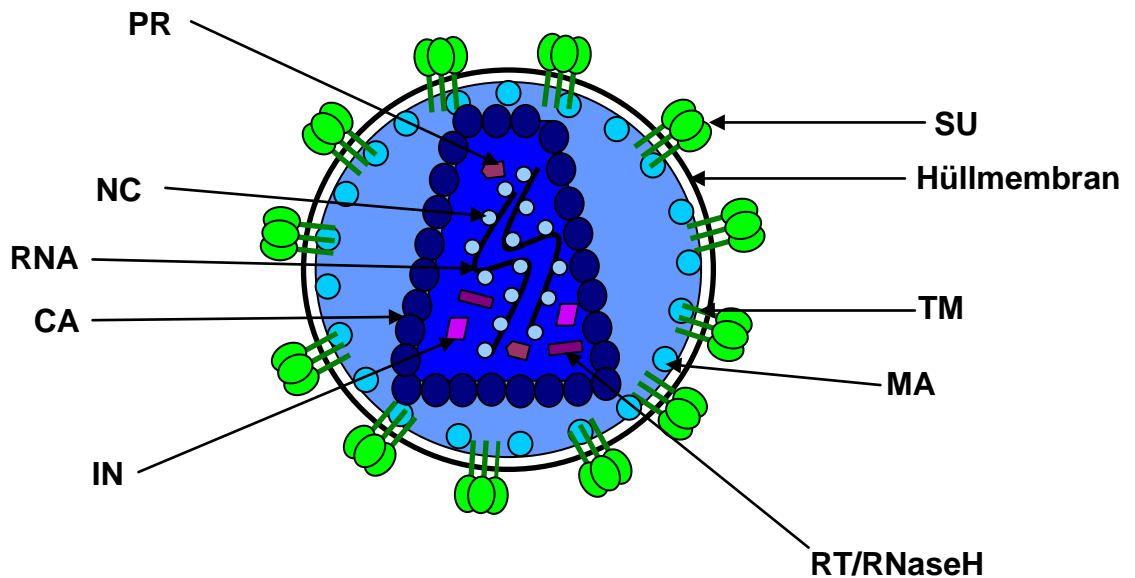


Abb. 2: Morphologie der retroviralen Partikel

A. schematischer Aufbau eines foamyviralen Partikels, **B.** schematischer Aufbau eines orthoretroviralen Partikels. Gag (blau), Pol (lila/violett), Env (grün), RT/RNaseH reverse Transkriptase mit RNaseH, IN Integrase, PR Protease, DNA genomische DNA, SU Oberflächenuntereinheit, TM Transmembranuntereinheit, LP Leaderpeptid, NC Nukleokapsidprotein, CA Kapsidprotein, RNA genomische RNA.

1.2.3 Genom der Foamyviren

Das Genom der Foamyviren ist das größte im Vergleich zu anderen Retroviren. Die Länge der RNA von PFV beträgt 11,68 kb, die Länge des Provirus, zusammen mit den retroviralen LTRs (Long Terminal Repeats) an beiden Enden (3´ und 5´) beträgt 13,25 kb (Schmidt et al., 1997). Wie schon oben erwähnt, gehören FV zu den komplexen Retroviren, das heißt, sie kodieren außer den Gag-, Pol- und Env-Proteinen noch akzessorische Proteine, Bet und Tas (Transaktivator) (Muranyi and Flügel, 1991). Eine weitere Besonderheit bei Foamyviren ist ein zweiter Promoter. FV besitzen neben dem U3-Promoter der LTRs einen internen Promoter (IP) welcher im 3´-Bereich des *env* Gens liegt und eine schwache basale Aktivität besitzt (Löchelt et al., 1993; Mergia, 1994; Yang et al., 1997). Der IP vermittelt die Expression der akzessorischen Proteine Bet und Tas (Rethwilm et al., 1991). Das Tas-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Genexpression von FV. Es aktiviert durch seine direkte Bindung an die Tas responsive Elemente (TREs) den internen Promoter, was zu einer verstärkten Bildung von Tas und Bet führt. Wird eine gewisse Tas Konzentration erreicht, bindet Tas an den U3-Promoter und schaltet so die Transkription von genomischer und einfach gespleißter mRNA an. Diese mRNAs führen zu Expression von viralem Gag, Pol und Env in der Zelle (Bodem et al., 2004; Erlwein and Rethwilm, 1993; Löchelt, 2003).

In der genomischen RNA sind strukturelle Motive vorhanden, die für die Dimerisierung, Verpackung, reverse Transkription und Integration des viralen Genoms erforderlich sind. Es handelt sich hier um die cis-aktiven Sequenzen (CAS). Auch hier unterscheiden sich Foamyviren von anderen Retroviren. Bei Orthoretroviren liegt das sogenannte Verpackungssignal, PSI (packaging signal), überwiegend in der 5´UTR (untranslated region) (Banks et al., 1998; Berkowitz et al., 1996). Es befindet sich meistens zwischen dem 5´SD (Spleißdonor) und dem Start-Codon des *gag*-Gens, manchmal reicht es aber auch in den *gag* Leserahmen hinein. Foamyviren hingegen benötigen noch eine weitere cis-aktive Sequenz (CASII), welche sich im 3´Bereich des *pol*-Gens befindet, CASI und CASII sind beide essentiell für effizienten Vektortransfer. Die Länge, der CASI

beträgt ca. 650 bp, beginnt in der 5'U5-Region und endet im *gag*-Gen. CASII dagegen liegt im 3' Bereich des *pol*-Gens und ist 2 kb lang (siehe Abb.3) (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998). Außerdem ist in der 5'UTR noch die Dimerisierungssequenz (UCCCUAGGGA) enthalten, welche zwischen der Primerbindungsstelle (PBS) und dem *gag*-Gen liegt. Des Weiteren befindet sich in der R-Region der Hauptspleißdonor für *pol* und *env* (Cain et al., 2001; Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 2000b; Russell et al., 2001). Da bei FV das Pol-Protein von einer separaten gespleißten mRNA exprimiert wird und nicht als Gag-Pol-Fusionsprotein wie bei Orthoretroviren, stellt sich die Frage, wie Pol ins FV-Partikel kommt. Es konnte gezeigt werden, dass ohne RNA kein Pol im FV-Partikel nachweisbar ist (Heinkelein et al., 2002b). Deletionsanalysen haben gezeigt, dass Sequenzen, die für die Inkorporation des Pol Proteins notwendig sind, in den früher identifizierten CASI und CASII enthalten sind. Diese Sequenzen, die als Pol Enkapsidierungssequenz (PES) bezeichnet wurden beinhalten ca. 28 bp, stromaufwärts der PBS und ungefähr 1kb der 3'-Region von CASII. Deletiert man die PES, kommt es zum Verlust der Pol Inkorporation, die RNA Verpackung bleibt jedoch erhalten (Heinkelein et al., 2002b; Peters et al., 2008).

Wie bei den Orthoretroviren, enthalten FV einen Polypurintrakt (PPT). Dies ist eine Abfolge von mindestens 9 Adenosin- und Guanosinresten, die für die Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese wichtig und 5' der 3'U3-Region gelegen ist. Im 3'-Bereich des *pol*-Gens befinden sich weitere vier purinreiche Sequenzen, deren Funktionen noch nicht genau bekannt sind. Eine dieser Sequenzen (cPPT) ist eine exakte Kopie des 3'PPT, sie dient wahrscheinlich als zweiter Initiationsort für die Plusstrang-DNA-Synthese und ist für die optimale Virusreplikation wichtig (Charneau et al., 1992; Kupiec et al., 1988; Peters et al., 2008; Tobaly-Tapiero et al., 1991).

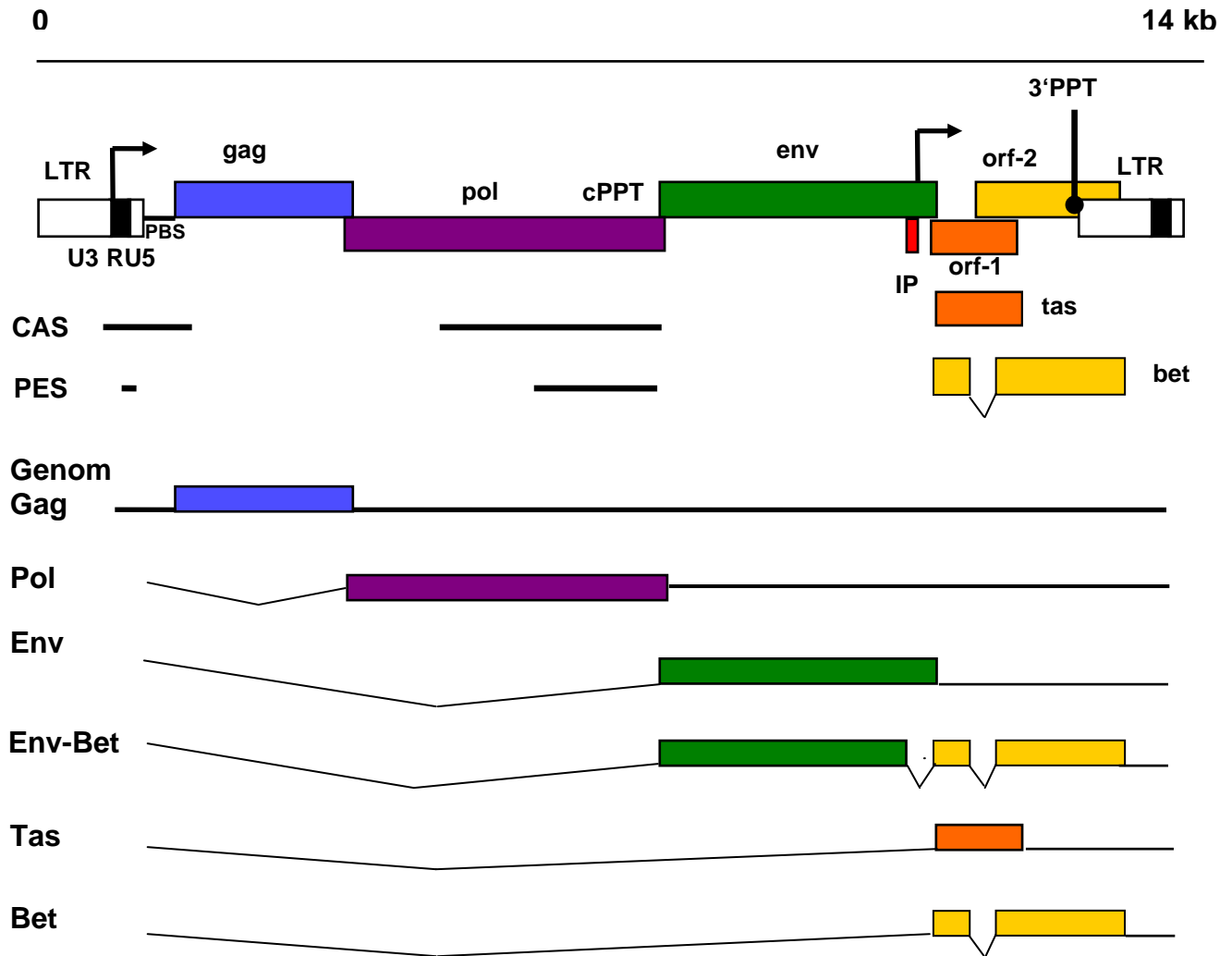


Abb. 3: Genomorganisation und Genexpression von PFV

Die Pfeile symbolisieren den Transkriptionsstart, U3/R/U5 Bestandteile der Long Terminal Repeats LTR, PBS Primerbindungsstelle, gag Gag Leserahmen, pol Pol Leserahmen, cPPT zentraler Polypurintrakt, env Env Leserahmen, IP interner Promoter, orf open reading frame, 3'PPT 3' Polypurintrakt, CAS cis acting sequence, PES Pol-Enkapsidierungssequenz.

1.2.4 Die foamyviralen Proteine

1.2.4.1 Gag (Kapsidprotein)

Das foamyvirale Gag-Protein wird, ähnlich wie bei den Orthoretroviren, von einer ungespleißten mRNA translatiert. Gag ist ein Strukturprotein, welches das Kapsid des Virus bildet. Wie bereits erwähnt, wird das FV Gag-Vorläuferprotein (p71) von der viralen Protease prozessiert, anders als bei Orthoretroviren findet keine Prozessierung in Matrix, Kapsid und Nukleokapsid statt, sondern es werden nur 3 kDa am C-Terminus des FV Gag-Vorläufer abgespalten (p68) (Konvalinka et al., 1995) (Abb. 4). Diese Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins ist wichtig für die Infektiosität der Viren (Enssle et al., 1997). Im viralen Partikel befinden sich p71 und p68 im ungefähren Verhältnis von eins zu vier (Cartellieri et al., 2005b).

Während alle anderen Retroviren über Cys-His-Boxen im Gag-Protein verfügen, welche wichtig für die Bindung und Verpackung der genomischen RNA sind, fehlt diese Proteindomäne im foamyviralen Gag (Berkowitz et al., 1996; Linial, 1999). Stattdessen befinden sich im C-Terminus des Gag drei Glyzin-Arginin-reiche Sequenzen (GR-Boxen I-III). Die GR-Box I enthält eine Nukleinsäurebindedomäne, welche sowohl DNA als auch RNA bindet (Schliephake and Rethwilm, 1994; Yu et al., 1996b). Diese Eigenschaft erinnert an das Core-Protein der Hepadnaviren, das auch eine Glyzin-Arginin-reiche Sequenz enthält, die DNA und RNA binden kann (Hatton et al., 1992; Nassal, 1992). In den neuesten Publikationen wird eine Rolle der GR-Box I in der FV Pol-Verpackung diskutiert (Lee and Linial, 2008). In der GR-Box II hingegen befindet sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS engl. Nuclear Localization Signal), welches während des Infektionszyklus für den Transport von Gag in den Nukleus verantwortlich ist. Diese Kernlokalisierung ist eine Besonderheit bei FV, aber ihre Bedeutung ist unbekannt. Ebenfalls noch unbekannt ist die Funktion der dritten GR-Box (Schliephake and Rethwilm, 1994; Yu et al., 1996b). Der aminoternale Bereich (N-Bereich) von Gag ist für die Interaktion mit dem Glykoprotein und die Freisetzung der viralen Partikel aus der Wirtszelle wichtig (Cartellieri et al., 2005a).

Im Gag-Protein ist auch eine L-Domäne (late; PSAP Motiv bei PFV) enthalten, welche eine wichtige Rolle für das Knospen und den Zusammenbau der Viruspartikel spielt (Stange et al., 2005). Im Gegensatz zu Orthoretroviren können foamyvirale Kapside nicht von der Zellmembran knospen und virusähnliche Partikel bilden (VLP - virus like particle), ohne Env verbleiben alle Kapside im Cytoplasma (Fischer et al., 1998; Shaw et al., 2003). Die Interaktion zwischen Gag und Env ist also Voraussetzung für die Freisetzung der FV aus der Zelle. Der exakte Interaktionsbereich von Gag und Env ist noch nicht identifiziert, bekannt ist nur, dass die ersten 300 bp von Gag ausreichend für eine spezifische Bindung sind (Cartellieri et al., 2005a). Unsicher ist auch, ob die Gag-Env-Bindung direkt oder durch zelluläre Proteine vermittelt wird. Der N-Terminus von Env enthält konservierte Aminosäurereste die spezifisch an das FV Gag binden (Lindemann et al., 2001; Rethwilm, 2007; Wilk et al., 2001). Im N-Terminus von Gag befindet sich das coil-coiled Motiv welches wahrscheinlich beim intrazellulären Zusammenbau des Kapsid die Interaktionsstelle für die einzelnen Gag Proteine ist (Tobaly-Tapiero et al., 2001).

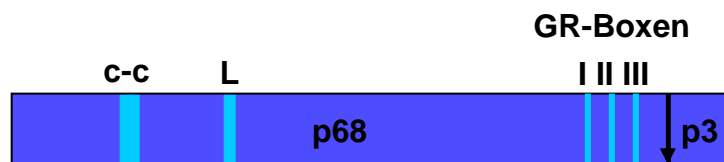


Abb. 4: Gag-Vorläuferprotein von PFV

Der Pfeil zeigt die Protease-Schnittstelle. L Late Domäne, c-c coil-coiled Motiv, p68 & p3 Gag Untereinheiten, GR-Boxen I-III die Glycin-Argenin-reiche Sequenz.

1.2.4.2 Pol (enzymatische Aktivitäten)

Das *pol*-Gen kodiert die retroviralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase mit RNase H-Aktivität und die Integrase (Katz and Skalka, 1994; Netzer et al., 1993) (Abb. 5). Anders als bei Orthoretroviren wird bei Foamyviren das Pol-Protein nicht als ein Gag-Pol-Fusionsprotein translatiert, sondern unabhängig von Gag von einer eigenen gespleißten mRNA (Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Löchelt

and Flügel, 1996; Yu et al., 1996a). Eine autonome Pol-Expression stellt die Frage, wie FV Pol ins virale Partikel gelangt. Im Falle von Foamyviren ist man noch unschlüssig, ob Pol über eine Interaktion mit der RNA, Wechselwirkung mit Gag oder einer Kombination aus beiden Möglichkeiten (RNA als Brückenmolekül zwischen Gag und Pol) ins Partikel gelangt. In Versuchen mit einem foamyviralen Vektorsystem konnte gezeigt werden, dass ohne prägenomische RNA kein Pol im Partikel nachweisbar ist. Wird Pol enkapsidiert, wird nur das Pol-Vorläuferprotein verpackt, so dass die Spaltung von Pol erst im Partikel stattfindet (Heinkelein et al., 2002b; Peters et al., 2005). Das 127 kDa große Pol-Vorläuferprotein wird autokatalytisch in ein 85 kDa großes Protease-Reverse Transkriptase-RNase H-Protein und die 40 kDa große Integrase prozessiert (Löchelt and Flügel, 1996; Netzer et al., 1993). Bei FV konnte die Protease nicht als eigenständige Protein-Untereinheit nachgewiesen werden (Flügel and Pfrepper, 2003). Dies ist erneut anders als bei anderen Retroviren, bei welchen in den meisten Fällen Pol in drei Proteine gespalten wird (PR, RT, IN) (Flügel and Pfrepper, 2003). Auch die FV RT unterscheidet sich von den RT anderer Retroviren. Sie ist im Gegensatz zu anderen retroviralen RTs nicht Mg^{2+} sondern Mn^{2+} abhängig (Kögel et al., 1995), zusätzlich scheint ihre Prozessivität höher zu sein als bei anderen Retroviren (Rinke et al., 2002). *In vitro* Versuche zeigten, dass die Fehlerrate der PFV RT ähnlich wie die HIV-1 RT ist (Boyer et al., 2004; Boyer et al., 2007; Rinke et al., 2002), neue Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass diese durch *in vitro* Versuche erhaltenen Daten nicht dem *in vivo* Verhalten entsprechen (Gärtner et al., 2009).

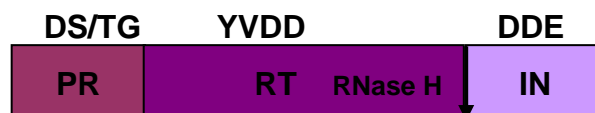


Abb. 5: Pol-Vorläuferprotein von PFV

Der Pfeil zeigt die Protease-Schnittstelle zwischen der PR-RT-Untereinheit und der IN-Untereinheit. PR Protease, RT Reverse Transkriptase, IN Integrase, DS/T aktives Zentrum der Protease, YVDD aktives Zentrum der Reversen Transkriptase, DDE aktives Zentrum der Integrase.

1.2.4.3 Env (Hüllprotein)

Das 130 kDa große foamyvirale Hüllprotein besteht aus 3 Proteinuntereinheiten nämlich der Oberflächenuntereinheit (SU; 80 kDa), der 48 kDa großen Transmembranuntereinheit (TM) und dem Leaderpeptid (LP; 18 kDa) (Lindemann and Goepfert, 2003) (Abb. 6). Die Spaltung des Env-Vorläuferproteins in LP, SU und TM durch zelluläre Proteasen ist die Voraussetzung für die Infektiosität des Virus (Duda et al., 2004; Geiselhart et al., 2004). Sowohl das Leaderpeptid, als auch die Transmembranuntereinheit enthalten membranspannende Domänen. Das LP spielt eine wichtige Rolle bei der Knospung der Viren, da es die Domäne enthält, die mit dem FV Gag-Protein interagiert (Geiselhart et al., 2003; Lindemann et al., 2001). Das orthoretrovirale Env hingegen gehört zu den Typ I Membranproteinen und wird nur in zwei Untereinheiten prozessiert (SU und TM) (Rethwilm, 2007; Swanstrom and Wills, 1997). Eine Besonderheit des FV Env besteht darin, dass es die Fähigkeit besitzt, selbständig aus der Zelle zu knospen, was zur Bildung von Subviralen Partikeln (SVP) führt (Shaw et al., 2003).

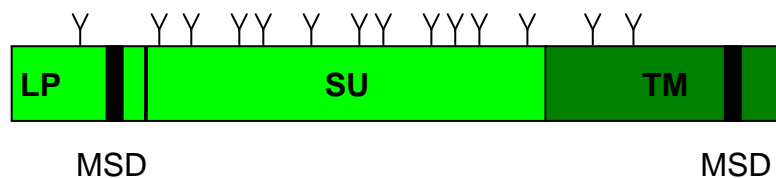


Abb. 6: Env Vorläuferprotein von PFV

Die Pfeile zeigen die Proteaseschnittstellen, LP Leaderpeptid, MSD membranspannende Domäne, SU Oberflächenuntereinheit, TM Transmembranuntereinheit, Y Glykosylierungsstellen (Lüftenegger et al., 2005).

1.2.4.4 Akzessorische Proteine Bet und Tas

Foamyviren gehören zu den komplexen Retroviren und besitzen, zusätzlich zu den drei klassischen retroviralen Proteinen (Gag, Pol und Env), zwei akzessorische Leserahmen (ORF-open reading frame), welche zwischen dem *env*-Gen und der 3'LTR liegen (Rethwilm, 1995). ORF1 kodiert den foamyviralen Transaktivator Tas (36 kDa), welcher sowohl den internen Promoter, als auch den U3-Promoter aktiviert (siehe auch 1.2.3) (He et al., 1996; Kang et al., 1998; Zou and Luciw, 1996). Tas enthält eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminal gelegene DNA Aktivierungsdomäne (Bodem et al., 2007; Garrett et al., 1993; He et al., 1996; Kang et al., 1998). Tas aktiviert auch zelluläre Promotoren und interagiert mit zellulären Proteinen, wie z.B. Histonacetyltransferase (HAT), p300 und PCAF (Lysin-acetyltransferase 2B, acetyliert Tas sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*), welche seine DNA-Bindungsaffinität verstärken. Der genaue Mechanismus dieser Interaktionen ist noch nicht bekannt (Bannert et al., 2004; Bodem et al., 2007; Wagner et al., 2000). Bet wird von einer gespleißten mRNA von ORF1 und ORF2 translatiert (siehe Abb.3) (Hahn et al., 1994; Muranyi and Flügel, 1991). Über die Funktion von Bet wurde schon viel spekuliert (Bock et al., 1998). FV-Bet scheint eine ähnliche Rolle wie das Vif Protein von HIV-1 zu spielen, welches den Einbau von den zellulären APOBEC-3 Proteinen (Apolipoprotein B mRNA editing enzym catalytic complex 3) ins Partikel verhindert. APOBEC-Proteine sind zelluläre Proteine, denen eine antivirale Wirkung nachgewiesen wurde. APOBEC-Proteine deaminieren präferentiell in einzelsträngiger DNA Cytosin zu Uracil, was zum Einbau von Adenin statt Guanin im komplementären Strang führt. In Primaten findet man 3 bis 7 unterschiedliche APOBEC 3 Proteine (APOBEC 3A, -B, -C, -DE, -F, -G, -H) (Bieniasz, 2004; Perkovic et al., 2008; Sawyer et al., 2004). Der genaue Mechanismus der APOBEC-Bet-Interaktion ist noch nicht bekannt (Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005). Perkovic et al. (2008) konnten zeigen, dass Bet direkt mit APOBEC 3C interagiert, aber nicht zu einer Degradation von APOBEC 3C führt, wie bei HIV-1 Vif, sondern verhindert, dass sich APOBEC 3C Komplexe bilden. Für das humane APOBEC 3G und 3F konnte gezeigt werden, dass sie PFV inhibieren, indem sie spezifisch FV Gag binden und zu zahlreichen G zu A Mutationen im

reverstranskribierten viralen Genom führen (Delebecque et al., 2006; Perkovic et al., 2008). Eine Interaktion zwischen APOBEC 3G und -3F mit FV-Bet konnte nachgewiesen werden (Russell et al., 2005).

1.2.5 Der foamyvirale Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der Foamyviren unterscheidet sich in mehreren Punkten von dem der Orthoretroviren und ähnelt dem der Hepadnaviren in gewissen Aspekten (Linial, 1999; Meiering and Linial, 2001). Der gravierendste Unterschied zu Orthoretroviren ist der Zeitpunkt der reversen Transkription. Bei Orthoretroviren findet die reverse Transkription nach Eintritt in die Zielzelle statt, also zu einem frühen Zeitpunkt im Replikationszyklus. Bei Foamy- und Hepadnaviren hingegen findet die reverse Transkription noch in der virusproduzierenden Zelle statt, also spät im Replikationszyklus. Das infektiöse Genom der Foamyviren ist also DNA und nicht RNA wie bei Orthoretroviren, obwohl auch RNA in das foamyvirale Partikel verpackt wird (Moebes et al., 1997; Roy et al., 2003; Yu et al., 1999).

Der breite Zelltropismus der Foamyviren deutet auf ein weit verbreitetes Oberflächenmolekül als Rezeptor hin, da alle bisher getesteten Zelllinien mit Foamyviren infizierbar sind (Falcone et al., 2003; Hill et al., 1999; Lindemann and Goepfert, 2003; Meiering and Linial, 2001). Nach der Bindung an den zellulären Rezeptor folgt die Fusion der viralen mit der zellulären Membran, die Penetration der Wirtszelle über Endocytose, welche im Gegensatz zu HIV pH-abhängig ist (Picard-Maureau et al., 2003). Nach Eintritt in die Zelle wird die virale DNA freigesetzt und es kommt zur Bildung eines Präintegrationskomplexes (PIC), welcher aus viralem Genom und viralen sowie zellulären Proteinen besteht (siehe Abb. 7). Anschließend wird der PIC Richtung Zellkern transportiert. Dieser Transport erfolgt ähnlich wie bei HIV-1, entlang der Mikrotubuli (Delelis et al., 2004; McDonald et al., 2002; Petit et al., 2003; Saib et al., 1997). Im Zellkern erfolgt die Integration der viralen DNA in das Genom der Zelle. Foamyviren benötigen zur Integration die Auflösung der Zellkernmembran während der Mitose, da sie nicht in der Lage sind, im Gegensatz zu Lentiviren sich nicht teilende Zellen zu infizieren (Bieniasz et al., 1995; Lewis et al., 1992). Nach der Integration erfolgt die Expression des Transaktivators Tas, über den internen Promoter, welcher die

Transkription der akzessorischen und anschließend strukturellen viralen Proteine vermittelt (siehe 1.2.3) (Linial, 1999; Löchelt et al., 1993). Der Export der mRNAs von Gag und Pol aus dem Zellkern wird durch die zellulären Proteine CRM1, HuR, ANP32A und ANP33B unterstützt (J. Bodem unpublizierte Ergebnisse). Es erfolgt die Umschreibung der viralen RNA mit Hilfe der FV RT in DNA. Obwohl das virale Genom als doppelsträngige DNA vorliegt, wird auch RNA ins Partikel verpackt (Lecellier and Saib, 2000; Linial, 1999; Roy et al., 2003; Yu et al., 1999). Die FV Partikelmorphogenese findet im Zytoplasma statt, die Abschnürung der foamyviralen Kapside erfolgt an intrazellulären Membranen (siehe 1.2.4.3). Die gebildeten Kapside assoziieren mit Env und es kommt zur Freisetzung der Viruspartikel (Goepfert et al., 1999; Linial, 1999; Pietschmann et al., 1999).

Da Foamyviren schon vor dem Verlassen der Zelle DNA enthalten, wird ihnen die intrazelluläre Retransposition (IRT) ermöglicht, was eine Anhäufung von Provirus-Kopien im Wirtsgenom zur Folge hat (Heinkelein et al., 2000a; Heinkelein et al., 2003).

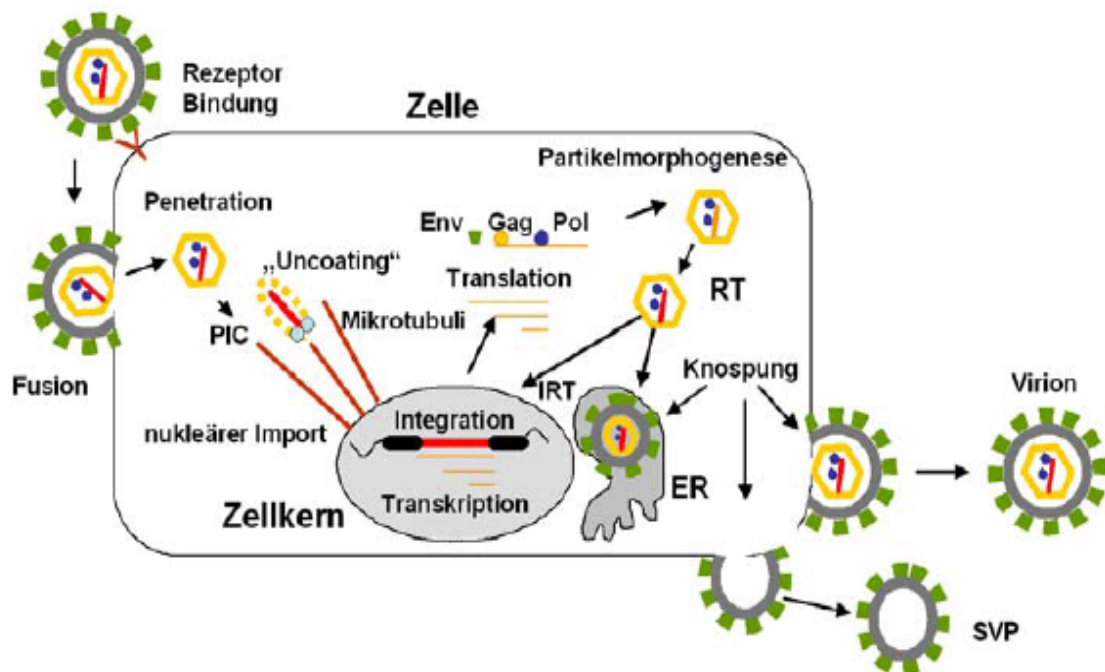


Abb. 7: Replikationszyklus der Foamyviren

Dargestellt ist der schematische Ablauf des Replikationszyklus. Env (grün), Gag (gelb), Pol (blau), DNA (rot), RNA (orange), PIC Präintegrationskomplex, RT reverse Transkription, ER Endoplasmatisches Reticulum, IRT intrazelluläre Retransposition, SVP Subvirale Partikel (nach Ali Nowrouzi 2007).

1.3 Gentherapie

Gentherapie ist eine Therapieform, die sich in den letzten ca. 25 Jahren aus der Molekularbiologie und Gentechnologie entwickelt hat. Das Prinzip der Gentherapie beruht auf der Einführung eines funktionellen Gens in Körperzellen, um entweder einen zellulären Fehler zu beheben oder eine neue Funktion in die Zelle einzuführen (Cotrim and Baum, 2008; Mulligan, 1993).

Die Gentherapie wird in zwei Arten unterteilt. Bei somatischer Gentherapie werden Veränderungen des Genoms nur in bestimmten Körperzellen eingeführt, so dass z.B. nur ein Organ des Patienten die modifizierten Zellen enthält. Die Keimbahntherapie (mit embryonalen Stammzellen) kann an die nächste Generation vererbt werden (Wivel and Walters, 1993). Ferner unterscheidet man zwischen *in-vivo*- und *ex-vivo*-Therapie. Bei der *in-vivo*-Therapie wird die DNA oder der Vektor mit dem entsprechenden Gen in den lebenden Organismus injiziert. Bei der *ex-vivo*-Behandlung hingegen werden dem Patienten zuerst Zellen entnommen, im Labor gentechnisch modifiziert, vermehrt und anschließend retransplantiert (Suhonen et al., 2006).

Trotz moderner Medizintechniken, können viele Erbkrankheiten nur symptomatisch behandelt werden. Eine große Zahl von diesen Krankheiten wie Mukoviszidose, Hämophilie, SCID (severe combined immunodeficiency disorder - schwerer kombinierter Immundefekt), Muskeldystrophien und verschiedene Krebserkrankungen können auf defekte Gene zurückgeführt werden (Cotrim and Baum, 2008). In diesen Fällen kann man die Gentherapie zur Behandlung anwenden, um einen genetischen Fehler zu korrigieren oder defekte Gene zu ersetzen.

Seit Anfang der achtziger Jahre wurden retrovirale Vektoren (MLV-murines Leukämievirus, ALV-aviäres Leukosevirus) standardmäßig verwendet, um Gene in Säugerzellen einzuführen (Eglitis and Anderson, 1988; Miller and Buttimore, 1986). So wurde 1989 der erste Bericht über eine klinische Studie über einen Gentransfer veröffentlicht. Eine Neomycin Resistenz-Kassette wurde in Tumor-infiltrierende Leukozyten aus malignem Melanom eingeführt und diese modifizierten Zellen wurden in die Patienten retransplantiert (Culver et al., 1991;

Rosenberg et al., 1990). Nach dieser ersten Studie folgten viele andere und es wurden unterschiedliche Vektorsysteme für Therapieansätze entwickelt.

Zu den erfolgreichen Beispielen der Gentherapie gehört die Therapie von X-SCID (Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007; Cavazzana-Calvo et al., 2000; Cavazzana-Calvo et al., 2001; Hacein-Bey et al., 2001). Es handelt sich hier um eine angeborene X-Chromosom-gekoppelte Krankheit. Die Krankheit wird verursacht durch Mutationen in der γ Kette des Interleukin 2-Rezeptors. Dies führt zu einer frühen Blockade der Differenzierung von T-Leukozyten und natürlichen Killerzellen (Conley, 1991; Conley et al., 1990; Leonard, 1996, 2000; Puck et al., 1997). Die Patienten besitzen ein mangelhaftes Immunsystem und ohne eine Stammzelltransplantation versterben sie im ersten Lebensjahr an Infektionen (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Im Jahr 2000 wurden zwei SCID-X1 (X1-linked severe immunodeficiency syndrom) Patienten im Alter von einem und elf Monaten erfolgreich therapiert. Den Patienten wurden Knochenmarkstammzellen ($CD34^+$) entnommen und *ex vivo* mit MLV-basierenden Vektoren transduziert, die das korrekte Gen der γC -Untereinheit des Zytokinrezeptors exprimierten. Nach Anreicherung der Zellen wurden diese in die Patienten retransplantiert. Beide Patienten wurden geheilt und konnten ein normales Leben führen (Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007; Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Allerdings waren auch Rückschläge zu verzeichnen. Einige Patienten entwickelten eine akute Leukämie nach der Transduktion ihrer Zellen mit einem MLV-basierten Vektor (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Der Grund dafür war eine Integration der MLV-basierten Vektoren in der Nähe von zellulären Protoonkogenen (z.B. LMO-2), was zu einer Überexpression des Protoonkogens und dadurch zur Leukämie führte (Nienhuis et al., 2006). Diese als Severe Adverse Effect (SAE) bezeichneten Zwischenfälle liegen mit 25% (5 von 20 Patienten) bei der Gentherapie von X-SCID ausgesprochen hoch.

Nach diesem Vorfall, wurden die Integrationsmuster verschiedener retroviralen Vektoren genauer untersucht, um die Sicherheit dieser Systeme zu verstehen und zu verbessern (Nienhuis et al., 2006; Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). Erwähnen sollte man auch, dass es noch weitere Erfolge bei gentherapeutischen Studien gab wie z.B. bei der Studie von CGD (chronic granulomatous disease; engl. für Septische Granulomatose) (Grez et al., 2000; Ott

et al., 2006; Ott et al., 2007) und ADA-SCID (ADA-Adenosindeaminase) (Aiuti et al., 2002; Cassani et al., 2008).

1.4 Foamyvirale Vektoren

Die ersten in der Gentherapie eingesetzten viralen Vektoren waren replikationsinkompetente orthoretrovirale Vektoren (Eglitis and Anderson, 1988; Friel et al., 1987; Ostertag et al., 1986). Bis 2004 waren diese die am häufigsten verwendeten viralen Vektoren (Edelstein et al., 2007; Edelstein et al., 2004), doch nach den Rückschlägen der X-SCID-Therapie wurden sie nur noch begrenzt verwendet. Was als Vorteil von retroviralen Vektoren unterstrichen wurde, das heißt, der stabile Gentransfer durch die Integration ins Genom, erwies sich nun als unsicher. Diese Vektoren weisen kein zufälliges Integrationsmuster im Genom auf, sondern integrieren bevorzugt nah am Transkriptionsstart und in die ersten Exons von verschiedenen Genen (siehe 1.3) (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Laufs et al., 2004). Als Alternative zu retroviralen Vektoren werden in den meisten Studien adenovirale Vektoren verwendet. Diese können zwar sich nicht teilende Zellen infizieren und haben eine große Genverpackungskapazität, doch ihre hohe Expression ist nur transient. Zusätzlich können sie eine starke Immunantwort hervorrufen (Lee et al., 1995; Raper et al., 2003; Yang et al., 1994). Daher werden aus Sicherheitsgründen und besserer Leistungsfähigkeit andere Viren zum Einsatz als Vektoren erforscht. Foamyviren erwiesen sich dabei als ausgezeichnete Kandidaten für den Einsatz in der Gentherapie bei der Transduktion von Hämatopoetischen Stammzellen.

Anfang der Neunziger Jahre entstanden die ersten, noch replikationskompetenten foamyviralen Vektoren (siehe Abb.8). In diesen wurde ein Teil des ORF-2 gegen spezifische Markergene unter der Kontrolle von homologen oder heterologen Promotoren ausgetauscht (Meiering et al., 2000; Schmidt and Rethwilm, 1995). Russel und Miller ersetzten einen Teil des *env*-Gens und den internen Promoter durch ein Reportergen unter der Kontrolle eines heterologen Promoters. So entstand der erste replikationsinkompetente PFV-basierte Vektor (Russell and Miller, 1996). Zur Verpackung des Vektorgenoms kam es dank der Koexpression von Proteinen auf Helferplasmiden, die das deletierte Env und Tas Protein

exprimierten. Darauf folgten weitere PFV-Vektoren, sowie SFV_{mac}-basierte Vektoren (Wu et al., 1998), in denen das ganze *env-tas*-Gen gegen eine Markergen-kassette ausgetauscht wurde (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998).

Da der Titer bei der Vektorproduktion noch nicht sehr hoch war und ein Helferplasmid benötigt wurde, ersetzte man den FV U3-Promoter durch einen stark exprimierenden CMV Promoter, der die Expression der Verpackungsplasmide (Gag, Pol, Env oder Gag-Pol) und des viralen Vektors antrieb (Fischer et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Mergia and Heinkelein, 2003; Schenk et al., 1999; Trobridge and Russell, 1998; Wu and Mergia, 1999). Eine separate Gag-, Pol- und Env-Expression von einzelnen Plasmiden garantieren eine hohe Expressionseffizienz der drei Proteine während der transienten Transfektion von Produktionszellen und eine geringere Wahrscheinlichkeit der Rekombination zwischen den überlappenden Sequenzen der drei Gene. Eine Expression des Gag- und Pol-Proteins von einer gemeinsamen *gag-pol* Genkassette ist zwar möglich, doch wird die mRNA dieses Vektors auch ins Partikel verpackt und konkurriert so mit der Vektor-RNA (Heinkelein et al., 2002a; Heinkelein et al., 2000a; Heinkelein et al., 1998; Rethwilm, 2007). Das zurzeit verfügbare verbesserte, CMV getriebene FV-Vektorsystem besteht aus drei Verpackungsplasmiden (Gag, Pol und Env), und dem viralen Vektor, der die 5' RU5-Sequenz, gefolgt von den CASI und CASII Sequenzen und die deletierte 3' U3-Region beinhaltet. Die Expressionkassette des Reportergens liegt hinter der CASII Region. Es wurden nur die Sequenzen der 3' U3-Region beibehalten, die für die reverse Transkription und Integration notwendig sind. Damit wird eine Tas-unabhängige Aktivierung des U3-Promoters durch zelluläre Transkriptionsfaktoren ausgeschlossen. (Heinkelein et al., 2002a; Park et al., 2002; Trobridge et al., 2002a). Eine nicht aktive LTR nach der Integration ist eine positive Eigenschaft der FV-Vektoren. Somit stellen FV-Vektoren eine Art natürlicher SIN-Vektoren (SIN self-inactivating vectors engl. für selbst inaktivierende Vektoren) dar.

Die Verpackungskapazität der FV-Vektoren ist im Vergleich zu anderen retroviralen Vektoren ziemlich groß (über 9kb). Da die Länge des FV-Provirus 13,24 kb beträgt (Schmidt et al., 1997), wurde schon ein heterologer Gentransfer von 9 kb erreicht (Heinkelein et al., 2002a; Rethwilm, 2007; Trobridge et al.,

2002b). Das Verpackungslimit von FV-Vektoren wurde jedoch noch nicht experimentell bestimmt (Rethwilm, 2007).

Das Integrationsmuster der FV-Vektoren unterscheidet sich von dem der γ -Retroviren und Lentiviren (Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). FV weisen eine geringere Präferenz auf, in transkribierte Gene oder in die Nähe von Promotoren zu integrieren (Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006). Ein neuer Testassay, welcher die Aktivierung eines Reportergens durch stromaufwärts liegende retrovirale Proviren untersucht, hat ergeben, dass FV-Vektoren im Vergleich zu gammaretroviralen, lentiviralen und SIN-MLV-Vektoren die niedrigste Wahrscheinlichkeit haben, andere Gene zu aktivieren. Dies ist von Bedeutung, da dadurch das Onkogenpotential von FV-Vektoren als niedrig eingestuft werden kann (Hendrie et al., 2008; Nienhuis et al., 2006).

In mehreren Studien konnte eine hohe Transduktionseffizienz von pluripotenten hämopoetischen Stammzellen verschiedener Spezies durch foamyvirale Vektoren gezeigt werden (Hirata et al., 1996; Josephson et al., 2002; Kiem et al., 2007; Leurs et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2001). NOD/SCID-Mäuse (non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency) zeigten nach einer Transplantation mit humanen CD34-positiven Zellen, welche zuvor mit FV- Vektor Überstand über Nacht kultiviert wurden, eine hohe Transgenexpression und wiesen ein myeloide und lymphoide Differenzierung auf. Dies beweist, dass die Transduktion von Stammzellen möglich ist (Josephson et al., 2004; Josephson et al., 2002; Si et al., 2008; Vassilopoulos et al., 2001).

Auch in einem Tiermodell bei LAD-(Leukocyte adhesion deficiency -Leukozyten-Adhäsionsdefizienz) Hunden konnte eine stabile Transgenexpression durch FV in den caninen Stammzellen nachgewiesen und dadurch auch eine Heilung der Hunde erzielt werden (Bauer et al., 2008; Kiem et al., 2007). LAD ist eine genetische Immundefizienz, verursacht durch eine Mutation in der β -2 Integrin-Genuntereinheit (CD18). Diese Mutation führt dazu, dass kein CD11-CD18-Adhäsionsfaktor an der Zelloberfläche der Leukozyten exprimiert wird. Leukozyten ohne CD18 adherieren nicht am entzündeten Endothel und wandern nicht zur entzündeten Stelle. Dies äußert sich als Immunschwäche, die letal ist (Anderson et al., 1985; Bauer et al., 2004; Malech and Hickstein, 2007). In der Studie von Bauer et al. ist es gelungen, mit FV-Vektoren eine Korrektur des mutierten Gens durchzuführen und dabei eine drei- bis vierfache Zahl an korrigierten Leukozyten

nachzuweisen als mit anderen retroviralen Vektoren (Bauer et al., 2006; Vassilopoulos and Rethwilm, 2008). Die gentherapierten Hunde zeigen keine Nebenwirkungen der Therapie und leben schon seit ca. drei Jahren ein normales Leben (Vassilopoulos and Rethwilm, 2008).

Foamyvirale Vektoren werden auch in einer vorklinischen Studie der Fanconi-Anämie beim Menschen eingesetzt. Fanconi-Anämie ist eine autosomale rezessive Erbkrankheit des DNA-Reparatursystems der Zelle (ca. 13 betroffene Gene). Neben verschiedenen anderen Symptomen versagt auch die Blutbildung (Kutler et al., 2003; Rosenberg et al., 2005). Si et al. konnten im murinen Modell mit Hilfe von foamyviralen Vektoren eine funktionelle Rekonstitution des FANCC-Gens in HSZs (humane Stammzellen) erzielen (Si et al., 2008; Vassilopoulos and Rethwilm, 2008). Es laufen auch vorklinische Studien, in denen FV Vektoren eingesetzt werden um genetische Defekte zu korrigieren, die zu β -Thalassämie oder CGD führen (Vassilopoulos and Rethwilm, 2008).

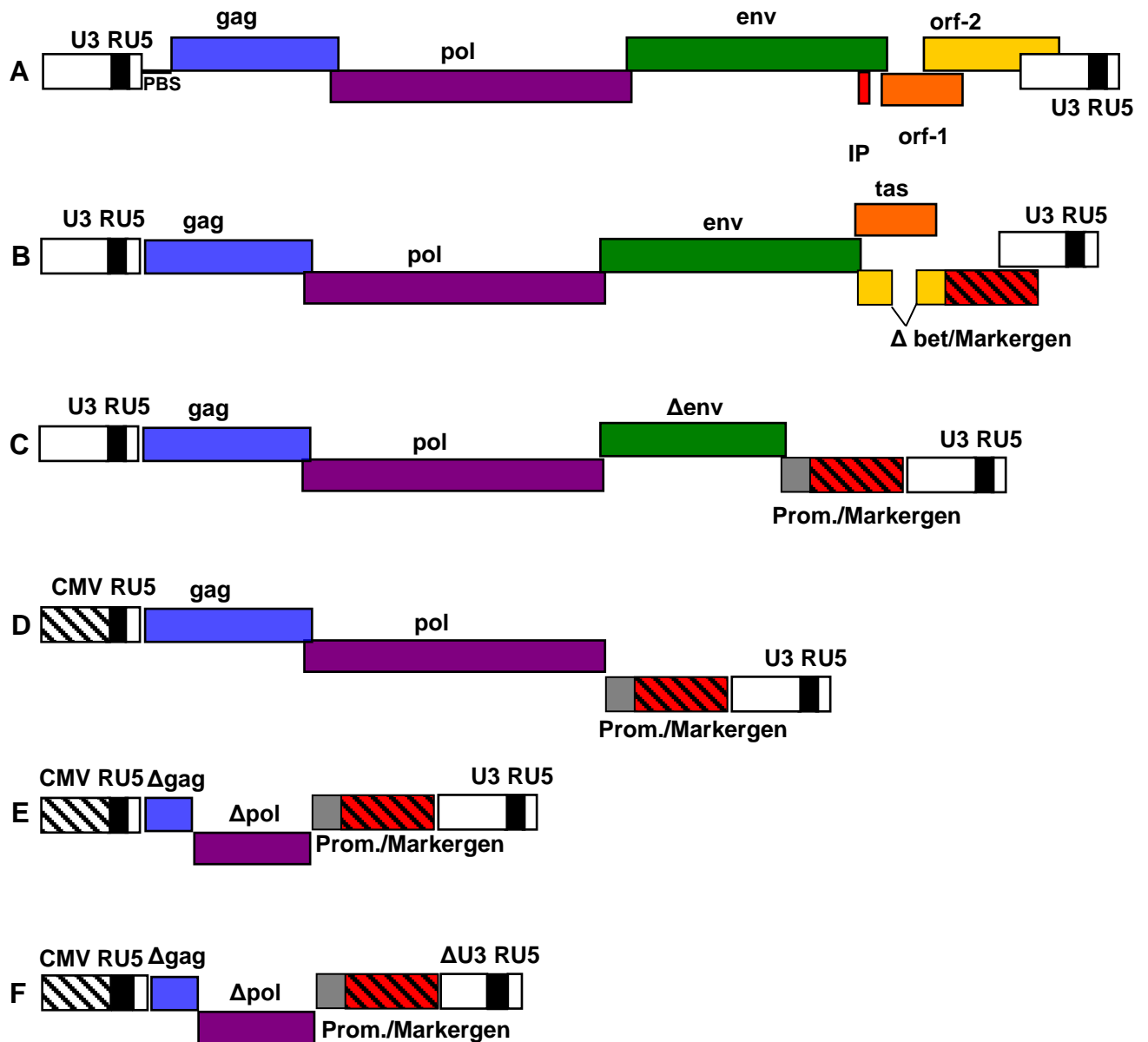


Abb. 8: Foamyvirale Vektoren

Schematische Darstellung der publizierten PFV Vektoren (modifiziert nach (Mergia and Heinkelein, 2003). **A.** Das Wildtyp-Provirusgenom von PFV. **B.** Replikationskompetenter PFV-Vektor mit partiell deletiertem *bet*-Gen (Schmidt and Rethwilm, 1995). **C.** Replikationsinkompetenter Vektor mit teilweise deletiertem *env* (Russell and Miller, 1996). **D.** PFV-Vektor, welcher nur die *gag*- und *pol*-Gene

enthält. Der 5'U3-Promoter der LTR wurde durch den CMV-Promoter ersetzt, Tasunabhängige Expression (Heinkelein et al., 1998; Trobridge and Russell, 1998). **E.** CMV-getriebener PFV-Vektor mit den essentiellen CASI- und CASII-Sequenzen (Heinkelein et al., 2002a; Park et al., 2002; Trobridge et al., 2002a) **F.** CMV-getriebener PFV-Vektor mit den essentiellen CASI und CASII Motiven und einer Deletion in der U3-Region der 3'LTR (Δ U3) (Heinkelein et al., 2002a)

1.5 Fragestellung

Foamyviren zeichnen viele Besonderheiten aus (siehe 1.2) wie z.B. die eigenständige Pol Expression, aber auch viele Eigenschaften, die diese Viren äußerst interessant für die gentherapeutische Vektorentwicklung machen (siehe 1.3-1.4).

In dieser Arbeit wurde anhand des PFV-Modells untersucht, ob die früher identifizierten PES (Pol-Enkapsidierungssequenzen) nicht nur notwendig, aber auch ausreichend für die Pol Inkorporation ins foamyvirale Partikel sind und ob das cPPT Element einen Einfluss auf die Replikation des Virus hat. Desweiteren wurden die lange CASII Sequenz verkürzt und Studien zur Fremdverpackung von verwandten Foamyviren durchgeführt, um die Verpackungskapazität und Sicherheit der zur Zeit vorhandenen foamyvirealen Vektoren zu verbessern.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden vorläufige Versuche der Expression von foamyvirealen Proteinen in Hefen getestet, um ein neues eukaryotisches Virusproduktionssystem zu entwickeln.

Material und Methoden

2 Material

2.1 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien von folgenden Herstellern verwendet: Applichem, MBI Fermentas, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma-Aldrich. Falls ein Produkt eines bestimmten Herstellers gezielt eingesetzt wurde, wird dies in den Methoden gesondert erwähnt.

2.2 Enzyme und Reaktionspuffer

CIAP (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)	MBI Fermentas
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
Pwo-Polymerase	Peqlab
Expand Long template PCR system	Roche
Restriktionsenzyme	NEB, MBI-Fermentas
Ribonuklease A	Roche
RQ1-DNase	Promega
SP6 RNA-Polymerase	MBI Fermentas
10x Transkriptionspuffer	MBI Fermentas
T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas

2.3 Antibiotika

	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100mg/ml	100µg/ml
Penicillin	100mg/ml	100µg/ml
Streptomycin	100mg/ml	100µg/ml
Zeocin	100mg/ml	100µg/ml

2.4 Verwendete Organismen

2.4.1 *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17 supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Invitrogen
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacproAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ M15]	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

2.4.2 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
L40- <i>ura3</i>	MATa, <i>ura3-52</i> , <i>Leu2-3112</i> , <i>his3</i> Δ 200, <i>trp1</i> Δ 1, <i>ade1</i> , <i>LYS2::</i> (<i>LexA</i> <i>op</i>)4- <i>HIS3</i> , <i>ura3::</i> (<i>LexA-op</i>)8- <i>lacZ</i>	Invitrogen
YPH 500	MATa, <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> ^{amber} , <i>ade2-101</i> ^{ochre} , <i>trp-1</i> Δ 63, <i>his3-</i> Δ 200, <i>leu2-Δ1</i>	Stratagene

2.4.3 Zelllinien

Stamm	Beschreibung	Referenz
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, die das SV40 große T-Antigen stabil exprimiert (Du Bridge et al., 1987)	(ATCC: CRL-11268)
HT1080	Humane Fibrosarkomazelllinie	(ATCC: CCL-121)
MSC	Mesenchymale Stammzellen	(Friedenstein et al., 1982; Noth et al., 2002)

2.5 Antikörper

Maus α PFV Gag:	Verdünnung
SGG1 Hybridomaüberstand (Heinkelein et al., 2002a)	1:10
Maus α PFV Integrase:	
3E11 Hybridomaüberstand (Imrich et al., 2000)	1:3
Maus α PFV Reverse Transkriptase:	
15E10 Hybridomaüberstand (Imrich et al., 2000)	1:3
Ziege α Maus Immunoglobuline/HRP (Dako)	1:2000

2.6 Nukleinsäuren

2.6.1 Mammaliervektoren

Vektorbezeichnung	Beschreibung
pMD9	PFV Vektor mit EGFP Marker (Heinkelein et al, 2002a)
pczHSRV2	Expressionsplasmid für PFV Provirus, CMV Promotor (Moebes et al, 1997)
pKP32	Auf pMD9 basierender PFV Vektor mit Deletionen in der CAS II Region.(Diese Arbeit)
pKP33	Auf pMD9 basierender PFV Vektor mit Deletionen in der CAS II Region. (Diese Arbeit)
pKP35	Auf pMD9 basierender PFV Vektor mit Deletionen in der CAS II Region. (Diese Arbeit)
pKP36	Auf pMD9 basierender PFV Vektor mit Deletionen in den CAS I und CAS II Regionen. (Diese Arbeit)
pTW01	Auf pKP33 basierender PFV Vektor mit cPPT. (Diese Arbeit)
pTW02	Auf pKP33 basierender PFV Vektor mit mutiertem cPPT. (Diese Arbeit)
pTW03	Auf pKP33 basierender PFV Vektor mit mutiertem cPPT. (Diese Arbeit)
pTW04	Auf pKP33 basierender PFV Vektor mit mutiertem cPPT.(Diese Arbeit)
pTW05	Auf pMD9 basierender Vektor mit CMV Promotor und mRFP statt EGFP.(Diese Arbeit)
pTW06	Auf pMD9 basierender Vektor mit CMV Promotor und tagRFP statt EGFP.(Diese Arbeit)

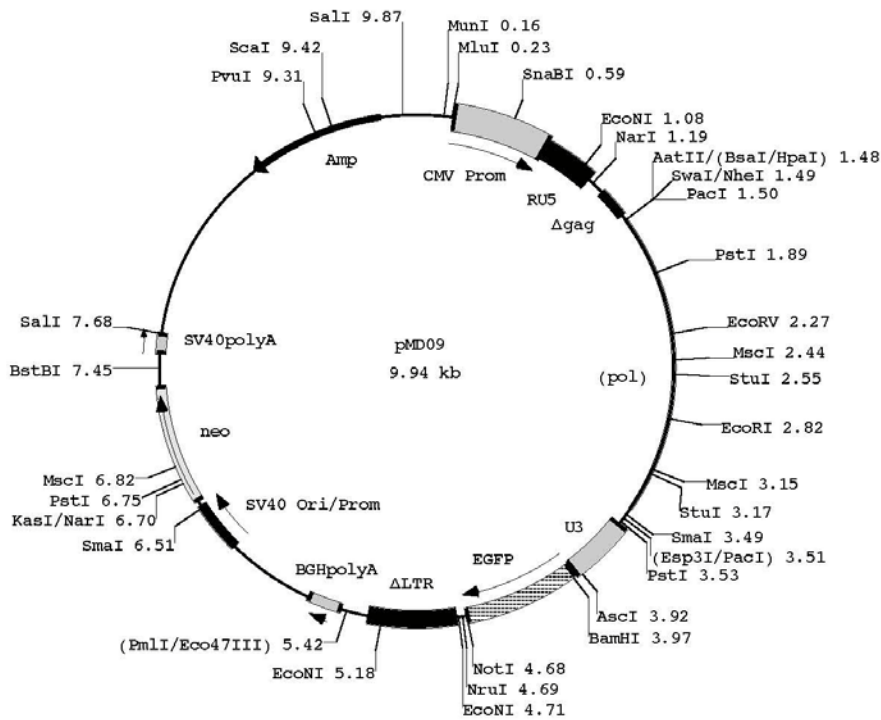
pClgag2	Expressionplasmid für PFV Gag, CMV Promotor (Heinkelein et al., 2002a)
pCpol2	Expressionplasmid für PFV Pol, CMV Promotor (Heinkelein et al., 1998)
pCenv1	Expressionplasmid für PFV Env, CMV Promotor (Fischer et al., 1998)
pcDNA3.1	Expression Vektor mit SV40 ori und CMV-Promotor/Enhancer mit Zeocin bzw. Neomycin Resistenz (Invitrogen)
pEGFPD	SFV _{mac} -Vektor mit EGFP Marker (A. Mergia, unpubliziert)
pClgag-1	Expressionplasmid für SFV _{mac} Gag, CMV Promotor (A. Mergia, unpubliziert)
pCpol	Expressionplasmid für SFV _{mac} Pol, CMV Promotor (A. Mergia, unpubliziert)
pCenv 3.5	Expressionplasmid für SFV _{mac} Env, CMV Promotor (A. Mergia, unpubliziert)

2.6.2 Hefevektoren

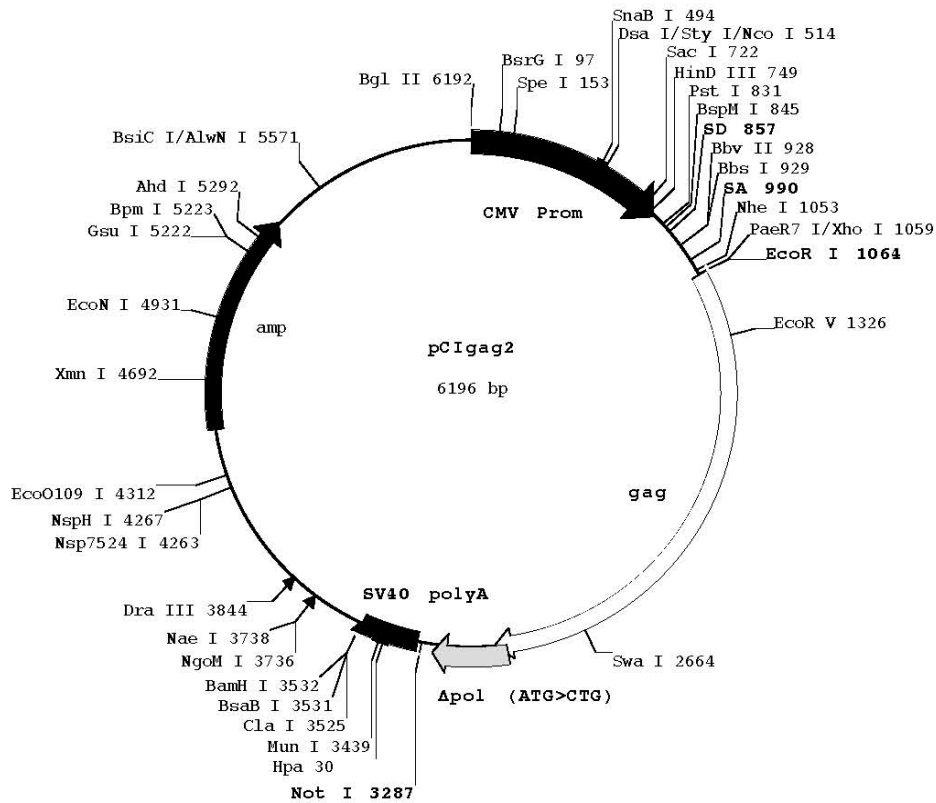
Vektorbezeichnung	Marker	Herkunft
pESC Trp	TRP1	Stratagene
pESC Leu	LEU2	Stratagene
pKT10	URA3	Sakuragi et al 2002
pTW07	URA3	Diese Arbeit - Gag Expression
pTW08	URA3	Diese Arbeit - Pol Expression
pTW09	URA3	Diese Arbeit - Env Expression
pTW10	LEU2	Diese Arbeit - Gag Expression

2.6.3 Vektorkarten

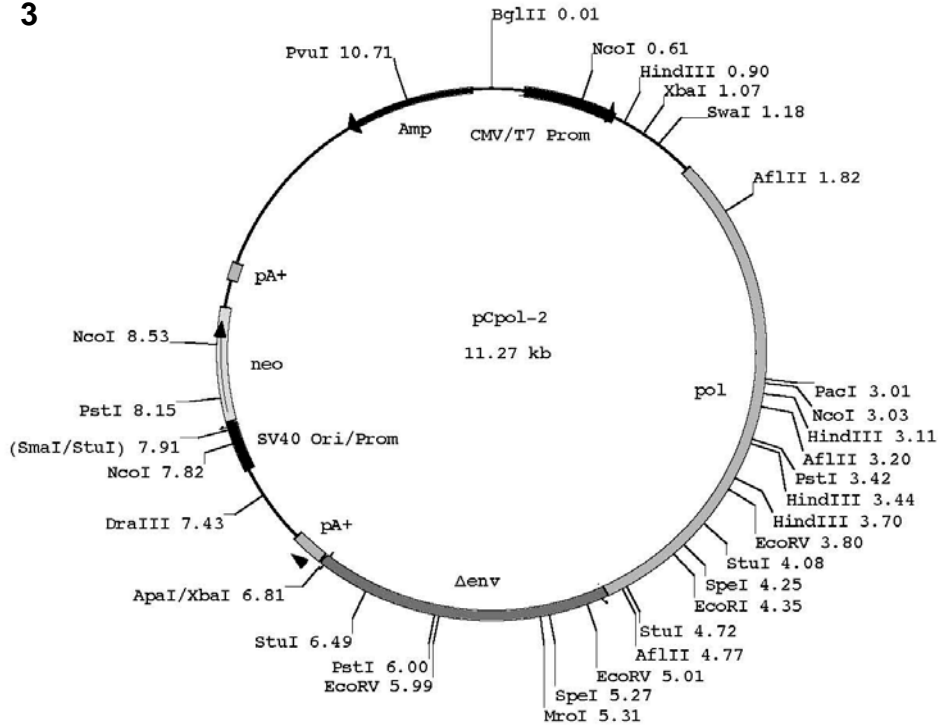
1



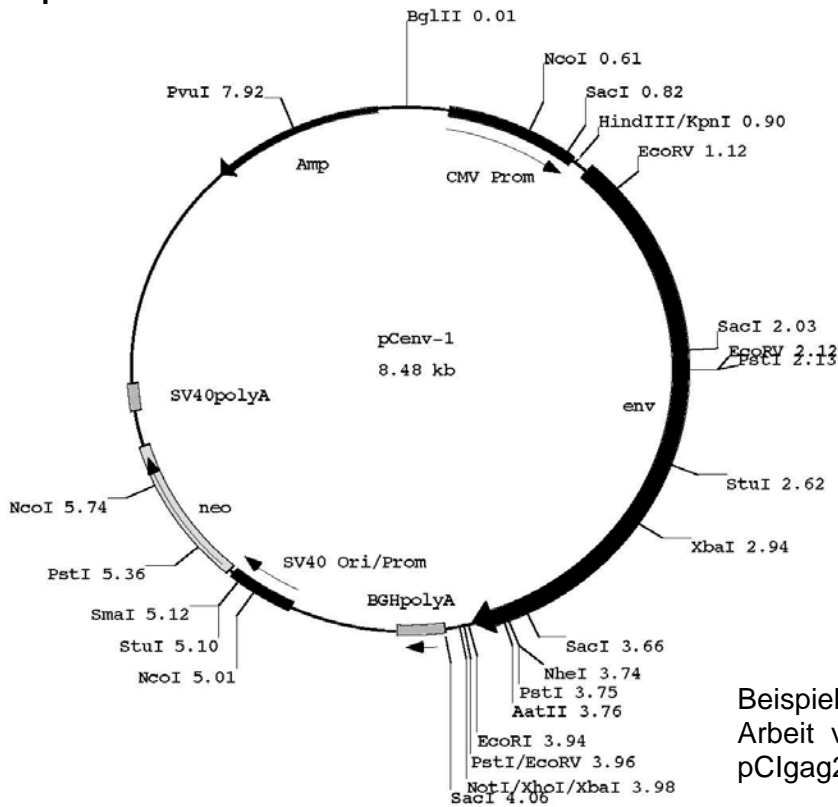
2



3



4



Beispiele der Vektoren die in dieser Arbeit verwendet worden. 1-pMD9, 2-pCgag2, 3-pCpol2, 4-pCenv1

2.6.4 Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
4129	CGGATAATCAATATACAAAATTCCATGACTTT	oligo 1 mit PESI für pKP36
4131	AAAGTCATGGAATTTTGTATATTGATTATCCGAGCT	oligo 2 mit PESI für pKP36
4333	TGCGAGGAGAGGG	oligo1 mit cPPT für pTW01 mit BsmBI Überhang
4334	CGCACCTCTCCT	oligo2 mit cPPT für pTW01 mit BsmBI Überhang
4335	TGCGACGAGCGCCG	oligo1 mit mutiertem cPPT für pTW02 mit BsmBI Überhang
4336	CGCACCGCGCTCGT	oligo2 mit mutiertem cPPT für pTW02 mit BsmBI Überhang
4337	TGTCGAGGAGCGCG	oligo1 mit mutiertem cPPT für pTW03 mit BsmBI Überhang
4338	CGCACGCGCTCCT	oligo2 mit mutiertem cPPT für pTW03 mit BsmBI Überhang

Material und Methoden

4339	TGCGTCCTCCCCT	oligo1 mit mutiertem cPPT für pTW04 mit BsmBI Überhang
4340	CGCAAGGGGAGGA	oligo2 mit mutiertem cPPT für pTW04 mit BsmBI Überhang
4404	TATAACCGGTATGGCCTCCTCCGAGGAC	Klonierungsprimer für pTW05 mit Agel Schnittstelle
4405	TATAGCGGCCGCTTAGGCCGCGGTGGAGTG	Klonierungsprimer für pTW05 mit NotI Schnittstelle
4406	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG	Klonierungsprimer für pTW06 bindet am CMV Promotor
4407	TATAGCGGCCGCTTAATTAAGTTTGTGCCCCAG	Klonierungsprimer für pTW06 mit NotI Schnittstelle
452	TTAATAATAAGAAAAAGCCTCTTA	pol Sequenzierung
1844	CCACCTTACTACCACTTTGGGG	pol Sequenzierung
1845	TTTTTAGCGCTAGTCAAGTGTATCTTGATTTGCAAATG	pol Sequenzierung
1846	TTTTTAGCGCTAGCAAGTTGTACAACAGGCAATAGG	pol Sequenzierung
1848	GCCGCCGGGATCACTC	EGFP Sequenzierung
1849	GGTGATTCACTCTGATCAAGGTGC	pol Sequenzierung

2.7 Kits

Big Dye ^R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Direct Protect TM Lysate RPA	Ambion
ECL TM Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Biosciences	
North2South ^R Chemiluminescent	
Hybridization & Detection Kit	Perbio/Pierce
NucleoBond ^R PC500	Macherey-Nagel
QIAquick PCR Purification Kit	
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen

2.8 Größen-/Längenstandards

Nukleinsäurelängenstandards

λ -HindIII Marker	eigene Herstellung
λ -PstI Marker	eigene Herstellung

Proteingrößenstandards

PageRuler TM	Fermentas
-------------------------	-----------

2.9 Sonstige Materialien

Plastikmaterial	Costar, Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Roth
Sterilfilter (0,22 μ m, 0,45 μ m)	Schleicher & Schuell
Blot Filterpapier	Schleicher & Schuell
Hybond TM -ECL TM Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences
Röntgenfilme X-ray Retina XBD	Fotochemische Werke GmbH
BrightStar TM -Plus Nylonmembran	Ambion
Polyallomer Ultrazentrifugentubes	Beckmann

3 Methoden

3.1 DNA Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die Amplifizierung von größeren Mengen spezifischer DNA Sequenzen. Die Reaktion besteht aus drei sich wiederholenden Schritten: Denaturierung, Hybridisierung bzw. Oligonukleotidbindung und einem Elongationsschritt. Im Denaturierungsschritt wird die DNA-Matrize durch hohe Temperatur (95°C) in einzelsträngige DNA umgewandelt. Das ermöglicht den zweiten Schritt, in dem die Oligonukleotide (Primer) an die Matrize binden. Voraussetzung für diesen Schritt sind eine Temperaturabsenkung. Diese Temperatur hängt ab vom Schmelzpunkt der jeweils eingesetzten Primer und dem Grad der Komplementarität der Primer zur Matrize, die amplifiziert werden soll. Nachdem der Primer an die Matrizen-DNA gebunden hat, folgt der nächste Schritt die Elongation, eine thermostabile Polymerase z.B Pwo-Polymerase (optimale Temperatur 68°C) verwendet das 3´Ende des Primers, wodurch die Synthese der Zielsequenz einleitet wird. Durch mehrmalige Wiederholungen dieser Schritte (20-30 mal) kommt es zu einer exponentiellen Vervielfachung der Zielsequenz. Modifikationen an den Primern erlauben es, Änderungen in die synthetisierte Sequenz, wie z.B. Mutationen oder das Einfügen von Enzymschnittstellen, die die Zielsequenz flankieren, was weiteres Klonieren mit dem Amplifikat ermöglicht, einzufügen.

Nach der PCR Reaktion wurde das Amplifikat gemäß der Angaben des Herstellers durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt.

Standardmäßiger PCR Ansatz

200 pg Plasmid DNA
20 pmol sense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)
20 pmol antisense Primer (10 pmol/µl Stammlösung)
5 µl 10 x Pwo Puffer Komplett (mit MgCl₂)
1 µl dNTPs (10 mM)
2 µl Pwo-Polymerase (1U/µl)
Ad 50 µl Aqua_{dest}

PCR Programm

Denaturierung der Matrize-DNA	95°C / 4 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	95°C / 30 sec	
Hybridisierung	55°C-64°C / 1 min	
Elongation	68°C / 1 min pro 500 Basenpaare	
Finale Elongation	68°C / 10min	

3.1.2 Sequenzierung von DNA

MgCl₂-Puffer

200 mM TRIS-HCl pH 9,0
5 mM MgCl₂
autoklaviert

Reaktionsansatz

0,5 µg DNA
3,3 pmol Primer
1 µl 5x MgCl₂-Puffer
1 µl Big-Dye Mix
Ad 5 µl Aqua_{dest}

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode von F. Sanger. Das Grundprinzip der Sequenzierung ist das gleiche wie bei der PCR, auch hier dient DNA als Matrize. Der Reaktionsansatz enthält außer der DNA-Matrize nur einen komplementären Primer, eine Polymerase, alle vier Desoxynukleotide sowie eine geringe Menge Didesoxynukleotide, die jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Den Didesoxynukleotiden fehlt die 3'OH

Gruppe, kommt es also zum Einbau eines Didesoxynukleotides, kann der DNA-Strang nicht mehr verlängert werden und es findet ein Kettenabbruch des syntetisierten Stranges statt. Da der Einbau zufällig erfolgt, erhält man am Ende ein Gemisch aus verschiedenen langen DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Länge jeweils um eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Base unterscheiden. Durch die verschiedenen Farbstoffe lässt sich mit Hilfe einer spezieller Apparatur (z.B. ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer) die basengenaue DNA Sequenz bestimmen. In dieser Arbeit wurde zum Sequenzieren das Big Dye^R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet.

Thermocyclerprogramm

Deanturierung	95°C / 20 sec	}	25 Zyklen
Hybridisierung	50°C / 15sec		
Elongation	60°C / 4 min		

Nach der Synthese der DNA-Einzelstränge erfolgte die Aufreinigung und Sequenzierung in der diagnostischen Abteilung unseres Institutes mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

3.1.3 DNA-Agarosegelelektrophorese

Puffer und Lösungen:

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

2 M TRIS

1 M Eisessig

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

Agarosegele:

Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden Gele mit Konzentrationen zwischen 0,8 % bis 2 % Agarose hergestellt

Bromphenolblau-Lösung für Agarose-Gel-Elektrophorese:

0,25 % Natriumsalz-Bromphenolblau (BPB)

30 % Glycerin (steril) in A.dest.

Ethidiumbromid (EB):

0,1 µg/ml Gel

Die DNA-Agarosegelelektrophorese dient sowohl der Trennung als auch der Analyse von DNA-Fragmenten. Aufgrund der negativen Ladung der DNA ist es möglich, die DNA-Fragmente im Agarosegel, an dem elektrische Spannung anliegt, der Größe nach aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgt nach dem Molekulargewicht der DNA, die während der Elektrophorese Richtung Anode wandert. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2 %ige Agarosegele verwendet, die 1µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die DNA-Proben wurden mit 6x Bromphenolblaupuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 20-95 V erfolgte die elektrophoretische Trennung. Durch das in der DNA interkaliertes Ethidiumbromid wurde der DNA/Ethidiumbromid-Komplex im UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction kits. Dafür wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter schwachen UV-Licht (354 nm) sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Danach erfolgte die Isolierung der DNA aus der Agarose nach Angaben des Herstellers.

3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen meist palindromische spezifische Sequenzen des DNA-Doppelstranges und spalten diese genau an dieser Stelle oder teils versetzt. So entstehen glatte oder überhängende DNA-Enden. Aufgrund ihrer Sequenzspezifität werden Restriktionsendonukleasen analytisch zur Überprüfung von DNA und Plasmiden anhand der entstehenden Bandenmuster und präoperativ für weitere Klonierungen verwendet.

Reaktionsansatz:	analytisch	präparativ
DNA	1 µg	5 - 10 µg
10x Puffer	2 µl	5 µl
Enzym	5 U	20 U
Aqua dest. steril	ad 20 µl	ad 50 µl

Die entsprechenden Puffer wie auch Enzymmenge, Inkubations-Temperatur und Zeit (1h bis Übernacht) wurden gemäß der Herstellerangaben eingesetzt.

3.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation eines liniarisierten Plasmids zu verhindern, wurden seine 5'Enden mit Hilfe des „calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) Enzym dephosphoryliert. Dies verhindert die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen den beiden Plasmidenden. Nach dem Restriktionsverdau wurde 1 µl CIAP (10 U/µl) in den Ansatz beigefügt und 1h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 5 mM) und Erhitzung des Ansatzes auf 75°C für 10 Minuten.

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'Hydroxyende eines DNA-Fragments und dem 5'Phosphatende des zweiten Fragments kann man DNA miteinander verknüpfen. Diese Reaktion wird durch eine ATP abhängige Ligase katalysiert. Die T4-DNA Ligase ist in der Lage sowohl glatte, wie auch kohäsive Enden miteinander zu verbinden. Im Ligationsansatz wurden immer gleichartige DNA Überhänge verwendet (entweder glatte oder identisch kohäsiv). Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1 zu 3.

Ligationsansatz:

T4 DNA-Ligasepuffer	2 μ l
DNA	100–500 ng
T4 DNA-Ligase	1,0 μ l (5 Weiss Units)
Aqua dest. steril	ad 20 μ l

Der Ligationsansatz wurde entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C inkubiert.

3.1.8 Verdau von 3'-Überhängen mittels T4 Polymerase

Neben seiner 5'→3' Polymeraseaktivität besitzt die T4-DNA-Polymerase auch eine 3'→5' Exonukleaseaktivität und kann deshalb auch für die Glättung von 3'-Überhängen eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden 1 U des Enzyms zusammen mit 0,1 mM dNTP-Mix, 1xReaktionspuffer und 1 – 2 μ g DNA für 20 min bei 11°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erwärmung auf 70°C für 10 min inaktiviert und die DNA über ein Agarosegel gereinigt.

3.1.9 Hybridisierung und Einfügung von Oligonukleotiden

10x Hybridisierungspuffer

1 M NaCl

0,1 M TRIS (pH 7,8)

1 mM EDTA (pH 8)

Einzelstrang-Oligonukleotide lassen sich, wenn sie komplementär zueinander sind, zu kurzen Doppelstrang-Oligonukleotiden zusammenfügen. Somit lassen sich für eine Klonierung nötige Restriktionsschnittstellen oder kurze Sequenzen in ein Plasmid einführen. Zunächst wurde folgender Ansatz mit nicht-kinasierten Oligonukleotiden angesetzt.

10 µl Oligonukleotid 1 (100 pmol/µl)

10 µl Oligonukleotid 2 (100 pmol/µl)

5µl 10 x Hybridisierungspuffer

ad 50 µl Aqua_{dest}

Dieser Reaktionsansatz wurde bei 95°C für 5 min inkubiert und anschließend über Nacht im ausgeschalteten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden die hybridisierten Oligonukleotide sofort in einer Ligation eingesetzt, oder bei -20°C gelagert.

3.1.10 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Transformationspuffer I

30 mM Kaliumacetat

100 mM RbCl₂

10 mM CaCl₂

50 mM MnCl₂

15% Glycerin

Mit 10% Essigsäure pH 5,8 einstellen.

Transformationspuffer II

10 mM MOPS

100 mM RbCl₂

75 mM CaCl₂

15% Glycerin

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

Kompetente Bakterien besitzen die Fähigkeit, Plasmid DNA aufzunehmen. Durch eine chemische Behandlung werden *E. coli* Bakterien kompetent gemacht. Von einer Übernachtskultur eines ausgewählten Stammes, wird 1 ml der Kultur in 100 ml LB Medium überführt und bei 37°C unter Schütteln (180rpm) bis zu einer Dichte

OD₆₀₀ 0,2-0,3 inkubiert. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde die Bakterienkultur bei 4°C und 2500 rpm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 40 ml Transformationspuffer I resuspendiert und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 4 ml Transformationspuffer II aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert, zu je 300 µl aliquotiert und in flüssigen Stickstoff weggefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.1.11 Transformation kompetenter Bakterien

Lösungen:

LB-Medium (flüssig), autoklaviert

GIBCO BRL® LB Broth Base (Lennox L Broth Base), 20 g/l
Glucose,
Natriumchlorid,
Ampicillin 100 µg/ml

LB-Medium (fest), autoklaviert:

GIBCO BRL® LB Broth Base (Lennox L Broth Base), 20 g/l
Agar, 20 g/l
Glucose, 1 g/l
Natriumchlorid, 5 g/l
Ampicillin 100 µg/ml

SOC-Medium:

95 ml LB-Medium
1 ml 1 M MgCl₂
1 ml 1 M MgSO₄
2 ml 1 M Glucose
0,2 µm sterilfiltriert

Unter Transformation wird in der Molekularbiologie das Einbringen von DNA in Bakterien oder Hefezellen verstanden. In diesem Fall war es das Ziel, die eingebrachte Plasmid-DNA in den Bakterien zu multiplizieren und in großen Mengen anschließend wieder zu isolieren. Dazu wurden chemisch kompetente *E.coli*-Stämme einem Hitzeschock ausgesetzt, der die Bakterien befähigte, die Plasmid-DNA aufzunehmen.

Zu 100 µl frisch aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen wurde 10 µl des Ligationsansatzes pipettiert, für 30 min auf Eis inkubiert, ungefähr 60 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend wieder für 3 min auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden dann 300 µl SOC-Medium zugesetzt, und es folgte eine Inkubationszeit von 45 - 60 min bei 37°C. Abschließend wurden die Bakterien bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugiert, in ca. 100 µl Überstand resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurden.

3.1.12 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels der TENS-Methode

Lösungen:

TENS-Lösung:	10 mM TRIS-HCl pH 8,0
	1 mM EDTA pH 8,0
	0,1 N NaOH
	1,0 % SDS
TE-Puffer:	10 mM TRIS-HCl pH 8,0
	0,5 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A

Die Bakterien wurden in 2 ml 1 x LB-Flüssigmedium (mit Antibiotikum) über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml dieser Übernachtskultur bei 14000 rpm abzentrifugiert und das Sediment in 300µl TENS-Lösung

resuspendiert. Nach mehrmaligen Mischen wurden dem Ansatz 150 µl Natriumazetat (pH 5,2) hinzugefügt, erneut mehrmals gemischt und anschließend für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, mit 300 µl Isopropanol präzipitiert und für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit je 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, bei 37°C 20 min getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

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

Für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Platte in 200 ml 1 x LB-Medium, welches mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt wurde, angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die gesamte Übernachtskultur bei 5000 rpm 15 min lang abzentrifugiert. Die Plasmid-Gewinnung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500* von Macherey-Nagel. In diesem Fall erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) über eine Anionenaustauschsäule. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 200-300 µl Aqua_{dest} aufgenommen. Die DNA wurde anschließend vermessen und mit Aqua_{dest} auf eine Konzentration von 1 µg/µl DNA eingestellt.

3.1.14 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der präparierten DNA erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm im Photometer der Firma Eppendorf. Das Verhältnis der beiden Werte 260/280 gibt Auskunft über die Reinheit der Probe. Der Wert sollte zwischen 1,7 bis 2 liegen

Ein Wert unter 1,7 deutet das auf Kontaminationen durch Proteine, liegt der Wert über 2, dann ist die Probe wahrscheinlich mit RNA kontaminiert.

Die zu vermessende DNA wurde in Aqua_{dest} im Verhältnis 1:100 verdünnt. Als Referenzprobe wurde Aqua_{dest} verwendet. Die Konzentration der DNA wie auch der Reinheitsgrad (RNA und/oder Protein Verunreinigungen) konnte man direkt am Gerät ablesen. Danach wurde die Probe entsprechend mit Aqua_{dest} verdünnt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

3.1.15 Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA

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

Der Ablauf der Extraktion sieht dabei folgendermaßen aus:

- Zugabe von einem Volumen Phenol, vortexen.
- 3 min zentrifugieren (14000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), vortexen.
- 3 min zentrifugieren (14000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- Zugabe von einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), vortexen.
- 3 min zentrifugieren (14000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.

Durch eine anschließende Alkoholfällung wurde die DNA präzipitiert, um eventuelle Phenolreste aus der Lösung zu entfernen.

Alkohol-Präzipitation

- Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2-5,4)
 - Zugabe von 6/10 Volumen Isopropanol
 - Mischen und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
 - 15 min Zentrifugation (13000 rpm)
 - Dekantierung des Überstandes
 - Zugabe von 1 ml 70 %igem Ethanol
 - Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
 - Zentrifugation für 15 min (13000 rpm) und Absaugen des Überstands
- Danach wurde das Sediment ca. 15 min bei 37°C getrocknet und in 20 µl sterilem Aqua_{dest.} aufgenommen.

3.2 RNA-Methoden

3.2.1 Herstellung einer RNA-Sonde

In vitro-Transkription

linearisierte Sonden DNA	1 µl (1-2 µg)
10x Transkriptionspuffer	1 µl
RNase Inhibitor	20 U
Biotin labeling Mix (Roche)	1 µl
RNase freies Aqua bidest.	6 µl
SP6 RNA-Polymerase	0,5 µl

Zur Detektion von partikelassoziierter RNA wurde eine biotinylierte RNA-Sonde hergestellt. Dafür wurde ein ca. 200 bp langes Fragment des *EGFP* Gens in einen Vektor unter transkriptioneller Kontrolle des SP6 Promotors kloniert. Durch *in vitro* Transkription wurde die RNA Sonde synthetisiert, wobei die Markierung durch den Einbau biotinylierter dUTPs (*Biotin labeling Mix* von Roche) erfolgte. Nach der Synthese wurde die Sonde mit Ethanol gefällt und anschließend in 50 µl Lysispuffer (*Direct Protect Lysate RPA Kit* von Ambion) aufgenommen und bei - 80 °C gelagert.

3.2.2 Ribonuklease Protektions Assay *Direct Protect Lysate RPA* *Kit* von Ambion

Hybridisierung

Viruspartikel in Lysispuffer	15-20 μ l
1:75 – 1:100 verdünnte Sonde	5-10 μ l
Lysispuffer (<i>Direct Protect Lysate RPA Kit</i>)	ad 50 μ l

Fäll Mix

1M Ammoniumacetat
250 ng/ μ l Glykogen

Polyacrylamidgel

5% PAGE	35 ml
Acryl-Bisacrylamid (19:1)	5 ml
10% APS	300 μ l
TEMED	20 μ l

5x TBE Puffer

450 mM TRIS base
450 mM Borsäure
10 mM EDTA pH 8,0

5% PAGE

100 g Harnstoff
40 ml 5x TBE
62,5 ml Aqua_{dest}

Im Hybridisierungsschritt bindet die RNA Sonde an die Virus RNA, eine Bindung an die DNA ist ausgeschlossen, da unter diesen Versuchsbedingungen die DNA nicht denaturiert wird (Angaben des Herstellers Ambion). Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 37 °C. Am nächsten Tag erfolgte ein RNase Verdau der nicht gebundenen RNA. Gebundene RNA ist doppelsträngig und deshalb vor dem Verdau mit RNase geschützt. Danach wurde die RNA gefällt, auf ein 5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 180-200 V ca. 2-3 Stunden lang aufgetrennt. Danach wurden die Proben auf eine Nylonmembran (BrightStarTM-Plus) bei 280 mA transferiert. Um die RNA an die Membran zu binden, wurde sie mit der Membran mittels UV (*cross linking*; 120 mJoule) vernetzt. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem *North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit* (Pierce/Perbio). Hierfür wurde die Membran zuerst in 30 ml Blockierungspuffer für 15 min bei RT geschwenkt. Danach wurden 100 μ l Strep-

HRP Konjugat dazugegeben, gefolgt von einer weiteren 15 minütigen Inkubation bei RT. Danach wurde die Membran 4 mal 5 min mit 40 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend in einer neuen Schale mit 30 ml Equilibrierungspuffer 5 min bei RT geschwenkt. Die Visualisierung fand mit Hilfe eines Gemisch aus *Luminol/Enhancer Solution* und der *Stable Peroxidase Solution* und eines Röntgenfilms statt.

3.3 Hefekultur

Die Hefen wurden entweder in YPAD Medium oder in Selektionsmedium bei 30°C kultiviert. Die Flüssigkultivierung dauerte über Nacht; die Hefepetten wurden zwischen 3 bis 7 Tagen bei 30°C inkubiert.

Selektionsmedium mit Dextrose oder Galactose

Ansatz für 1l:

6,7g Hefe Nitrogenbase Medium ohne Aminosäuren

20g Dextrose (SD Medium) oder 20g Galactose (SG Medium)

1,3g Aminosäure „Drop out Mix“ entweder ohne Uracil, Tryptophan oder Leucin

bei Platten 30g Bacto Agar

15 Minuten autoklavieren bei 121°C

Drop out Mix für Selektionsmedium

Aminosäure	Menge (g) im „drop out“	Endkonzentration (mg/l)
Adenin Sulphat	2,5	40
L-Argenin (HCl)	1,2	20
L-Aspartatsäure	6	100
L-Glutamatsäure	6	100
L-Histidin	1,2	20
L-Leucin	3,6	60
L-Lysin	1,8	30
L-Methionin	1,2	20
L Phenylalanin	3	50
L Serin	22,5	375
L-Threonin	12	200
L-Thryptophan	2,4	40
L-Tyrosin	1,8	30
L-Valin	9	150
Uracil	1,2	20

3.3.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

LTE Puffer:

- 0.1 M LiOAc
- 10 mM TRIS-HCl (pH 7.5)
- 1 mM EDTA

Für 10 Transformationsansätze, wurde eine Übernachtskultur des Hefestammes 1 zu 20 bis zu einer $OD_{600}=0,25$ in 50ml YPD Medium verdünnt. Danach wurde die Hefekultur bei 30°C unter Schütteln bis zu einer $OD_{600} =1$ kultiviert (ca. 4-5 h). Anschließend wurden die Hefezellen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10ml LTE Puffer resuspendiert. Es folgte eine zweite Zentrifugation (5 min, 1500 rpm). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 0,5ml LTE Puffer aufgenommen und je 50µl in Eppendorftubes aliquotiert. Die Zellen wurden meistens sofort zur Transformation verwendet oder bei 4°C bis zu 3 Tagen gelagert.

3.3.2 Transformation von Hefezellen

Transformations Mix

- 40% Polyethylen glycol 3350 (PEG 3350)
- 0,1 M LiOAc
- 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 1 mM EDTA

Zu den 50µl kompetenter Zellen wurden 1-2µg Plasmid DNA und 300µl Transformations Mix dazu gegeben und gemischt. Danach folgte eine Inkubation bei 30°C für 30 Minuten und ein Hitzeschock bei 42°C für 15 Minuten. Nach dieser Behandlung wurden 100 µl der Zellen auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Zellkulturmedien:

HT1080:

DMEM: GIBCO™ Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, Natriumpyruvat,
4500 mg/l Glucose und Pyridoxin
10% Fötale Rinderserum (FBS)
0,03% Glutamat
10 µg/ml PenicillinG
10 µg/ml Streptomycin

293T:

MEM: Hausmedium (9,6 g/l Invitrogen #41500-083, 2,2 g/l NaHCO₃)
10% Fötale Rinderserum (FBS)
0,03% Glutamat
10 µg/ml PenicillinG
10 µg/ml Streptomycin

MSC: DMEM/Ham's F-12 + von PAA

10% Fötale Rinderserum (FBS)
0,03% Glutamat
10 µg/ml PenicillinG
10 µg/ml Streptomycin

ATV:

137 mM NaCl
5,4 mM KCl
5 mM D-Glucose
70 mM NaHCO₃
500 mg/ml Trypsin

Einfrüermedium:

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
90 % Fötale Rinderserum (FBS)

Die adhärenenten Zellen (293T, MSC und HT1080) wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 25 cm² oder 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Die Zellkultur wurde zweimal wöchentlich passagiert. Zum Passagieren wurde zunächst der Mediumüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit ATV gespült, anschließend wurden die Zellen mit ATV abgelöst und mit dem entsprechenden Medium 1:10- bis 1:20-fach verdünnt.

3.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden die Zellkultur erst mit ATV abgelöst und bei 1000 rpm 10 min lang pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in ca. 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und nach 1-3 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Beim Auftauen von Zellen wurden die Zellen schnell bei 37°C aufgetaut und in 10 ml vorgelegtes kaltes Medium überführt. Es war darauf zu achten, dass der Auftauungsprozess schnell verläuft, da DMSO beim Auftauen sehr toxisch für die Zellen ist. Darauf folgte eine 10 min Zentrifugation 1000 rpm bei 4°C, der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in einer kleinen Zellkulturflasche wie oben beschrieben kultiviert.

3.4.3 Transfektion von Säugerzellen mit Polyethylenimin (PEI)

Lösungen:

Polyethylenimin (PEI) Stocklösung:

100mg/ml PEI (Polyscience)

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

Natriumbutyrat (50 x):

500 mM Na-Butyrat in PBS gelöst

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

Bei der Transfektion werden fremde Nukleinsäuren (z.B. Plasmide) von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Verschiedene Reagenzien erlauben auf unterschiedliche Weisen das Einschleusen von fremder Nukleinsäure. Es handelte sich hierbei immer um transiente Transfektionen, da die in den eukaryotischen Zellen eingebrachte Fremd-DNA im Laufe der Zellteilungen verloren geht.

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

Ein Tag vor der Transfektion wurden die 293T in 6 bzw. 10 cm Zellkulturplatten ausgesät (siehe Tab. 3.). Am nächsten Tag wurde der Transfektionansatz aus DNA, PEI und Medium ohne Zusätze angesetzt und 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt. Danach wurde der Transfektionansatz auf die Zellen vorsichtig aufgetropft.

Am nächsten Morgen nach der Transfektion wurde dem Medium 10 mM Natriumbutyrat für 6 – 8 h zugesetzt, anschließend erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zugabe von Natriumbutyrat erfolgte aus dem Grund, da die verwendeten Konstrukte einen CMV-Promotor enthielten, dessen Genexpression durch Natriumbutyrat stimuliert werden kann (Soneoka et al. 1995). Die Aufarbeitung des Überstandes und der Zellysate erfolgte 48 h nach Transfektion.

Tab. 3. Transfektionansätze

	6cm Zellkulturplatte	10cm Zellkulturplatte
Ausgesäte Zellzahl (293T)	2 x 10 ⁶	6 x 10 ⁶
eingesetzte DNA-Menge	6 µg	16 µg
DNA-Gesamtansatz mit Medium	250 µl	1000 µl
Eingesetzte PEI-Menge	18 µl	45 µl
PEI-Gesamtansatz mit Medium	250 µl	1000 µl
neues Medium auf den Zellen	2,5 ml	4 ml

3.4.4 Herstellung von Zelllysaten

Lösungen:

RIPA-Puffer:

- 20 mM TRIS, pH 7,4
- 0,3 M NaCl
- 1 % Na-Desoxycholat
- 1 % Triton X-100
- 0,1 % SDS

2 x Proteinprobenpuffer (PPP) für Proteingele:

- 4 % SDS
- 25 % Glycerin
- 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 0,01 % Bromphenolblau
- 10 % β-Mercaptoethanol

Zur Überprüfung, ob eine Genexpression der Plasmide in den transfizierten Zellen stattfand, wurden die transfizierten Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. 1 ml kalter RIPA-Puffer (4°C) wurde nach dem Waschen der Zellen mit PBS direkt auf die dicht bewachsenen Zellkulturplatten gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 10-20 min und dem mehrmaligen Schwenken der Platten wurde das visköse Zelllysate

abgenommen und in einen Qiashredder der Firma Qiagen überführt. Es folgte eine Zentrifugation von 2 min bei 14000 rpm. Das auf diese Weise von der chromosomalen DNA getrennte Lysat wurde für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in einem 1:1 Verhältnis mit 2 x PPP gemischt und für 5 min bei 95°C gekocht. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

3.5 Proteinbiochemischen Methoden

3.5.1 SDS-Polyacrylamidgel-Ektrophorese (SDS-PAGE)

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

Tricingel-Puffer:

3 M TRIS

0,3 % SDS

einstellen des pH-Wertes auf pH 8,45 mit konzentrierter Salzsäure

Trenngel (8 %) (20 ml):

6 ml Aqua_{dest}

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

1 Anteil Bisacrylamid)

6,6 ml Tricingel-Puffer

2,2 ml Glycerin

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

0,02 ml TEMED

Sammelgel (4 %) (20 ml):

12,3 ml A. dest.

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

5,0 ml Tricingel-Puffer

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

0,02 ml TEMED

Kathodenpuffer (5 x):

0,5 M TRIS (pH 8,25)

0,5 M Tricin

0,5 % SDS

Anodenpuffer (10 x):

2,0 M TRIS

einstellen des pH-Wertes auf pH 8,9

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche denaturierende Elektrophorese in vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gelen verwendet. Hierbei werden alle Proteine durch SDS und β -Merkaptoethanol denaturiert und der dabei entstehende SDS/Proteinkomplex negativ geladen. Das Acrylamid polymerisiert durch APS abgegebene freie Radikale, die von TEMED stabilisiert werden. Die Quervernetzung findet durch die Polymerisierung von Bisacrylamid statt (Ossipow *et al.*, 1993).

In dieser Arbeit wurde hierzu ein 8 % Trenngel mit einem 4 % Sammelgel überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte in einem Zweikammersystem: die obere Kammer der Gelapparatur wurde mit 1x Kathodenpuffer, die untere mit 1x Anodenpuffer gefüllt. Die Sammeltaschen wurden mit 1x Kathodenpuffer gespült, bevor die Proben und 8 μ l PageRuler Marker (Fermentas) als Größenstandard aufgetragen wurden. Die Proteine wurden ÜN bei 25-50 mA aufgetrennt.

3.5.2 Western Blot

Lösungen für den Western Blot

10 x Blotpuffer:

0.025 M TRIS

0.192 M Glycin

5 % (v/v) Methanol (frisch zugeben)

Waschpuffer, pH 7,5:

0.25 % (v/v) Tween20

in PBS

Blocklösung, pH 7,5:

5 % Trockenmilch

in PBS

ECL-LösungA:

- 2,5 mM Luminol
- 400 μ M p-Cumarsäure
- in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5, mit 1 % DMSO)

ECL-LösungB:

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

Im Western Blot werden, elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter, z.B. Nylon oder Nitrocellulose übertragen und immobilisiert. Die auf der Membran transferierten Proteine können dann mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Der Primärantikörper ist gegen das gesuchte Protein gerichtet, der Sekundärantikörper bindet hingegen den ersten Antikörper. Der Nachweis dieser Bindung wird über ein an den Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym, z.B. eine Alkalische Phosphatase oder Peroxidase nachgewiesen. Bei Gebrauch von peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern wurden zur Detektion zwei ECL-Lösungen verwendet. Das durch die Peroxidase oxidiertes Luminol, emittiert Licht, welches eine Schwarzfärbung auf dem Röntgenfilm nach Entwicklung hinterlässt.

In dieser Arbeit wurde das „semidry“-Verfahren zum Blotten genutzt. Vor dem Aufbau des Blots wurden die Nitrocellulosemembran (HYBOND™ ECL™; Amersham Biosciences) und die Whatmanfilterpapiere 10 min in Western Blot-Puffer eingeweicht. Anschließend wurden 3 Lagen Whatmanfilterpapier, die Membran darauf das Trenngel und erneut 2 Lagen Whatmanfilterpapier luftblasenfrei auf die Anodenplatte gestapelt. Darauf wurde die Kathodenplatte gesetzt und 90 min bei 150 mA geblottet. In dieser Zeit wurden die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Nach dem Blotten, wurde die ganze Apparatur auseinander gebaut und die Membran für 30 min in 5% Milchpulver/PBS (Blocklösung) inkubiert. Dieser Schritt dient dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Nach dem „Blockierungsschritt“ wurde die Membran 1 h bei RT oder länger bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubiert (Verdünnungen siehe 2.5). Um nicht gebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal jeweils 5 min mit

Waschpuffer gewaschen. Der 1:1000 in Blocklösung verdünnte Sekundärantikörper wurde ebenfalls 1 Std. bei RT mit der Membran inkubiert, anschließend folgten drei Waschrunde je 10 min. Für die nachfolgende ECL-Reaktion wurden die Lösungen A und B 1:1 gemischt und für 2 min auf die Membran aufgetragen. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit abgenommen und die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Oxidation von Luminol wurde durch Exposition eines Röntgenfilmes oder mit Hilfe einer Kamera über verschiedenen Zeiten dokumentiert.

3.6 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

FACS-Puffer:

- 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA)
- 0,02 % Natriumazid
- in PBS

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine genaue Charakterisierung von Zellsuspensionen. Die Zellen können nach spezifischen Eigenschaften aufgeteilt werden wie z.B. Markergenexpression, Größe und Granularität. Während die Zellen durch eine dünne Kapillare am Laserstrahl vorbei geleitet werden, detektiert das Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton & Dickinson) das Emissionsspektrum. So können die Zellen nach ihren Merkmalen sortiert und gezählt werden. Diesem Zweck dienen als Parameter der *Forward Scatter* (FSC = Vorwärtsstreulicht) und der *Side Scatter* (SSC = Seitwärtsstreulicht). Der FSC nimmt die Beugung des Lichts auf, die durch die Größe der Zellen bestimmt wird. Dagegen wird der SSC durch die Brechung des Lichts bestimmt, was Rückschlüsse auf die Granularität der Zellen zulässt.

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit für den Nachweis der Expression des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) sowie des *monomeric red fluorescent protein* (mRFP) verwendet. Diese Proteine, welche bei der Anregung durch einen Laserstrahl grün bzw. rot fluoreszieren, sind als Markergene weit verbreitet. Sie wurden in retrovirale Vektoren als Marker eingefügt und dienen der

Bestimmung der Transduktions-Effizienz. Zur Messung wurden die transduzierten Zellen zuerst mit ATV gewaschen und abgelöst. Danach wurden sie in FACS-Rörchen mit 3 ml vorgelegtem FACS-Puffer überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente wurden abhängig von der Größe in 100-300 µl FACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Danach erfolgte die Messung am Durchflusszytometer und die Auswertung der Ergebnisse mit dem *CellQuest* Programm (Becton & Dickinson).

3.7 Retrovirales Vektorsystem

Zur Gewinnung von infektiösen Viruspartikeln, die nur eine Replikationsrunde durchlaufen können, wurde das 4-Vektorsystem verwendet. 293T Zellen wurden mit vier CMV-Promotor getriebenen Plasmiden transfiziert. Drei Expressionsplasmide kodierten jeweils das FV Gag, Pol und Env Protein und das vierte eine verpackbare RNA als Vektor, die zusätzlich unter einem separaten Promotor das Markergen EGFP kodierte, welches eine Infektionsanalyse *via* Durchflusszytometrie ermöglichte (Heinkelein et al., 2002a).

PFV- Vektorsystem

Das PFV-Vektorsystem bestand aus den Verpackungsplasmiden pClgag2 + pCpol2 + pCenv1 und dem Vektor pMD9, pTW01-05 oder pKP32-36

SFV_{mac}-Vektorsystem

Das SFV_{mac}-Vektorsystem bestand aus den Verpackungsplasmiden pClgag-1 + pCipol + pClenv 3.5 und dem Vektors pEGFPD

3.7.1 Herstellung virushaltiger Überstände

Nach erfolgter Transfektion von 293T Zellen mit den Plasmid-DNAs wurden zellfreie Virusüberstände geerntet. Dazu wurde das virusenthaltende Medium mit

einer sterilen Spritze abgenommen und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Die Virusüberstände wurden sofort analysiert bzw. auf Zielzellen gegeben oder aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt.

3.7.2 Infektion von Zielzellen mit Virusüberstand

2×10^4 HT1080 wurden in 12 well Platten einen Tag vor Infektion eingesät und wurden dann mit verschiedenen Verdünnungen des Virusüberstandes infiziert. Nach 48 h erfolgte die FACS Analyse, wodurch die Transduktionsrate bestimmt wurde.

2 x Probenpuffer für Western Blot:

- 4 % SDS
- 25 % Glycerin
- 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 0,01 % Bromphenolblau
- 10 % β-Mercaptoethanol

Nach der Ernte des Überstandes wurde dieser vorsichtig in Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Zentrifugenröhrchen 38,5 ml, Beckmann) auf ein 6 ml 20 % Saccharosekissen aufgetragen. Die Röhrchen wurden dann für 3 h bei 25000 rpm und 4°C zentrifugiert (Surespin 630 Rotor, Sorvall). Nach dem Zentrifugenlauf wurde der flüssiger Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das unsichtbare Viruspellet entweder für die proteinbiochemische Analyse in PBS mit Probenpuffer (1:1) aufgenommen und anschließend 5 min bei 95 °C gekocht oder für die RNA-Analyse in Lysis Puffer (Direct Protect™ Lysate RPA zur RNA Analyse) aufgenommen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei – 80°C.

4 Ergebnisse

4.1 Verkürzung der CASII Region

4.1.1 Das Testsystem

Im Gegensatz zu anderen Retroviren, die das Pol-Protein als Gag-Pol-Fusionsprotein exprimieren, synthetisieren Foamyviren ihr Pol-Vorläuferprotein unabhängig von Gag von einer eigenen gespleißten mRNA (Bodem et al., 1996; Enssle et al., 1996; Jordan et al., 1996; Yu et al., 1996a). Bei Orthoretroviren ist das Pol Protein an das Gag Protein fusioniert, dadurch wird es automatisch während der Kapsidbildung mitverpackt. Da dies bei FV nicht möglich ist, stellt sich die Frage, wie das Pol-Protein ohne die Hilfe des Kapsidproteins ins foamyvirale Partikel gelangt. Heinkelein et al., 2002b zeigten, dass ohne (prä)-genomische RNA kein Pol im foamyviralen Partikel detektierbar ist. Die Sequenzen, welche auf RNA-Ebene für einen effizienten FV-Vektortransfer benötigt werden, sind die *cis*-aktiven Sequenzen CASI und CASII (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998). CASI (645 bp) befindet sich in der 5'-Region der (prä)-genomischen RNA und überlappt ca. 200 bp mit dem *gag*-ORF. CASII (ca. 2000 bp) befindet sich am 3'-Ende des *pol*-Gens (Heinkelein et al., 1998; Russell et al., 2001; Trobridge et al., 2002a). Diese *cis*-aktiven Sequenzen enthalten die Pol-Enkapsidierungssequenzen (PESI und PESII). PESI umfasst 28 bp, welche stromaufwärts der Primerbindungsstelle (PBS) liegen, PESII liegt am 3'-Ende des *pol*-Gens und beinhaltet etwa 1 kb der CASII (Peters et al., 2005).

Um zu testen, ob die PESI- und PESII- Sequenzen für die Pol-Inkorporation und den foamyviralen Vektortransfer ausreichend sind, wurden verschiedene Plasmide kloniert und im bereits bekannten 4-Vektorsystem getestet (Abb. 9 unten) (Heinkelein et al., 2002b). Weiterhin sollte untersucht werden, ob man die bereits identifizierte CASII-Sequenz hinsichtlich der Pol-Verpackung weiter einengen kann.

Das 4-Plasmidsystem bestand aus den drei Verpackungsplasmiden, von denen jeweils Gag (pClgag2) (Heinkelein et al., 2002b), Pol (pCpol2) (Heinkelein et al., 1998) und Env (pCenv1) (Fischer et al., 1998) exprimiert wurden. Das vierte Plasmid kodierte die verpackbare RNA (pMD9) (Heinkelein et al., 2002a) bzw. Derivate dieses Vektors (pKP- und pTW-Vektoren). 293T-Zellen wurden mit den drei Verpackungsplasmiden und jeweils einem Virusvektor kotransfiziert und die Zelllysate, sowie über ein Sucrose-Kissen aufgereinigte Viruspartikel im Western Blot auf Gag- und Pol-Expression untersucht. Der RNA-Gehalt der Partikel wurde in einem RNase-Protektions-Assay dargestellt und die Infektiosität der jeweiligen Vektorpartikel durch Infektion von HT1080-Zielzellen und nachfolgender FACS-Analyse getestet.

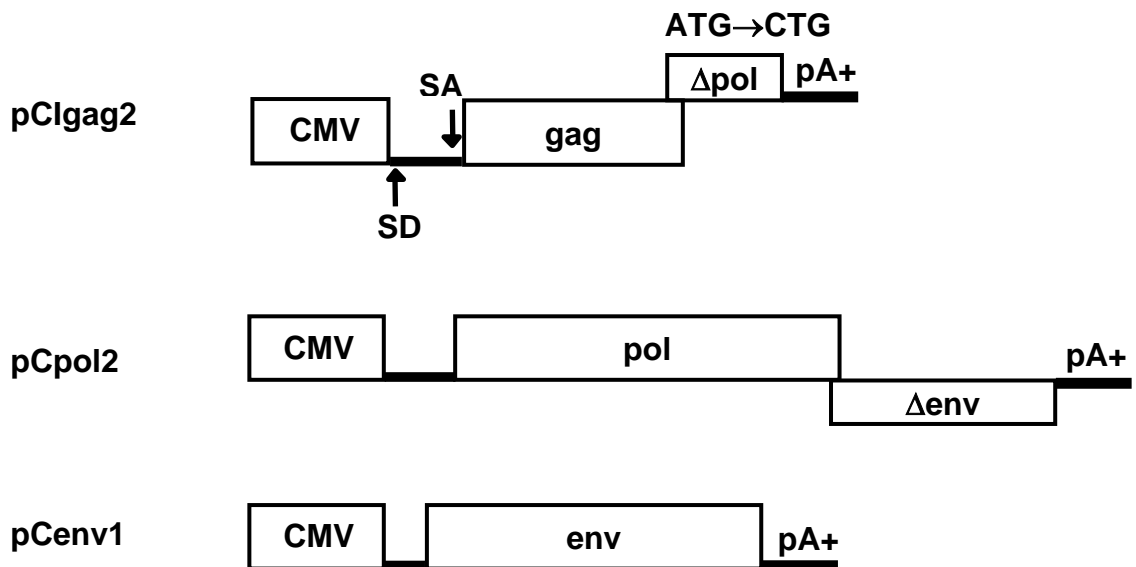


Abb. 9: PFV-Verpackungsplasmide

CMV - Cytomegalievirus-Promotor/Enhancer; SD - Spleißdonor; SA - Spleißakzeptor; gag - Kapsidgen; Δpol - teilweise deletiertes Polymerasegen; pA+ - Polyadenylierungssignal; Δenv - teilweise deletiertes Hüllproteingen (Heinkelein et al., 2002a).

4.1.2 Einengung der CASII Region

Alle Konstrukte dieser Arbeit basieren auf dem pMD9-Vektor. Dieser kodiert das verpackbare FV-Vektorgenom. Der Vektor enthält hinter dem CMV-Enhancer/Promotor die *cis*-aktiven Sequenzen CASI und CASII, die für einen effizienten Vektortransfer erforderlich sind (Heinkelein et al., 1998). Das ATG des *gag*-Gens wurde in ein CTG mutiert, welchem ein STOP-Kodon folgt. Dieses wurde eingeführt um keine Gag Expression vom pMD9 Vektor zu erhalten. Der U3-Promotor des *Spleen focus forming Virus* (SFFV) kontrolliert die Expression des *Enhanced green fluorescent Proteins* (EGFP). Die 3'-LTR von PFV enthält eine deletierte U3-Region; Der 3' LTR-Promotor wurde so deletiert, dass die Proteinexpression von diesem Vektor nur durch den internen SFFV-U3-Promotor vermittelt wurde. Alle für die Integration in das Wirtsgenom wichtigen Elemente blieben erhalten.

Um die Fähigkeit einer verkürzten CASII-Region zur Pol-Verpackung zu testen, wurde diese zunächst weiter deletiert. Die Vektoren pKP32 und pKP33 besitzen Deletionen im 3'-Bereich von CASII. Beide Vektoren enthalten das halbierte PESII, Deletion der Basen 5347-5902 (Angaben basierend auf dem PFV Transkriptionsstart) und unterscheiden sich darin, dass bei pKP33 (Δ 4662-4977) die interne Deletion größer ist. In pKP35 wurde das 3'-Ende der PESII noch weiter deletiert, jedoch keine internen Deletionen eingefügt (siehe Abb.10 unten; Klonierungsstrategie siehe Anhang).

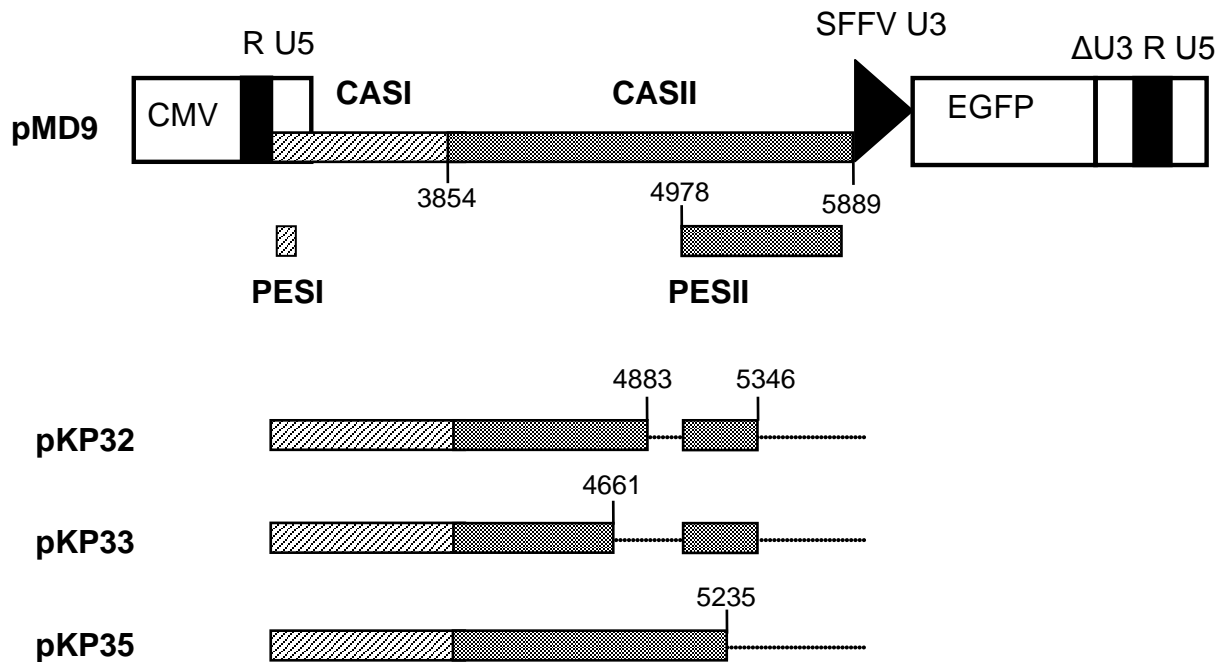


Abb. 10: Vektoren mit Deletionen in der CASII-Region

CMV – Cytomegalievirus-Promotor/Enhancer; CASI/CASII - *cis*-aktive Sequenz I/II; SFFV U3 – U3-Region des *Spleen focus forming Virus*; EGFP - *Enhanced green fluorescent Protein*; PESI/PESII - Polymerase-Enkapsidierungssequenz I/II;

Die Western Blot-Analyse der Lysate von mit pKP32 und pKP33 transfizierten 293T-Zellen und der Partikel zeigte eine gleichmäßige Gag- und Pol-Expression (siehe Abb.11). Als Positivkontrolle diente der pMD9-Vektor. In allen drei Fällen konnte man das Pol-Vorläuferprotein (127 kDa) und die beiden nach Proteolyse entstandenen Untereinheiten detektieren. Das Molekulargewicht der Protease-Untereinheit (PR) mit der Reverse Transkriptase (RT) betrug 85 kDa, das der Integrase (IN) 40 kDa. Da die Protease verpackt wurde, konnte auch die Spaltung von Gag in seine zwei Untereinheiten (71 kDa und 68 kDa) beobachtet werden. Als Negativkontrolle wurden 293T Zellen mit einem leeren pcDNA 3.1-Vektor transfiziert. Die Negativkontrolle der Partikelpräparation bestand aus einer Probe, bei welcher 293T-Zellen mit pMD9 und den Gag- und Pol-Expressionsplasmiden, jedoch nicht mit dem Env-Plasmid kotransfiziert wurden. In diesem Ansatz konnten keine Partikel detektiert werden, weil ohne Hüllprotein keine

Ergebnisse

Auscleusung von FV-Kapsiden stattfindet (Baldwin and Linial, 1998; Fischer et al., 1998). Bei Transfektion der Zellen mit pKP35 konnte zwar in den Zelllysaten Gag und das Pol-Vorläuferprotein (127 kDa) nachgewiesen werden, jedoch kam es nicht zur Proteolyse von Pol. Das Gag-Protein wurde ebenfalls nicht gespalten und in den Partikeln konnte kein Pol detektiert werden. Für Gag konnte nur die 71 kDa-Bande nachgewiesen werden.

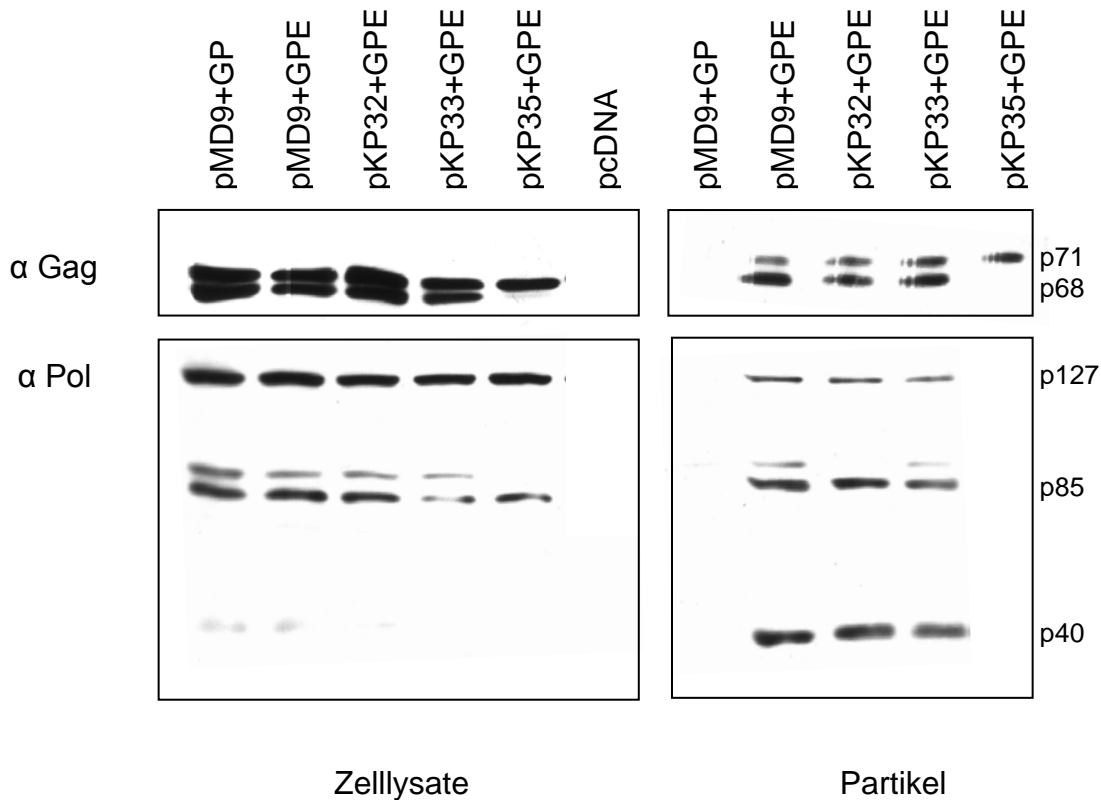


Abb. 11: Repräsentatives Beispiel eines Western Blot, der Zelllysate und Partikelpräparation aus transfizierten 293T-Zellen,

GP = pClgag2 + pCpol2; GPE = pClgag2 + pCpol2 + pCenv1; Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper wurde in beiden Fällen α Maus HRP-konjugierter Antikörper aus der Ziege verwendet (n = 3).

Um ausschließen zu können, dass die Abwesenheit von Pol in den Partikeln (pKP35), auf das Fehlen von RNA zurückzuführen ist, wurde vom gleichen Versuch ein RNase Protektions-Assay durchgeführt. Die Sonde hierfür bestand aus einer 222 bp langen RNA, welche einen Bereich des EGFP-Gens bindet. Der relative RNA-Gehalt der Partikel wurde ermittelt, indem die unverdünnte Probe der pMD9-Partikel gleich 100% gesetzt wurde und mit Hilfe des Computerprogrammes ImageJ die Intensitäten der verschiedenen Proben dazu ins Verhältnis gesetzt wurden. Es zeigte sich, dass alle pKP-Vektoren etwa gleich viel RNA inkorporieren (Abb.12).

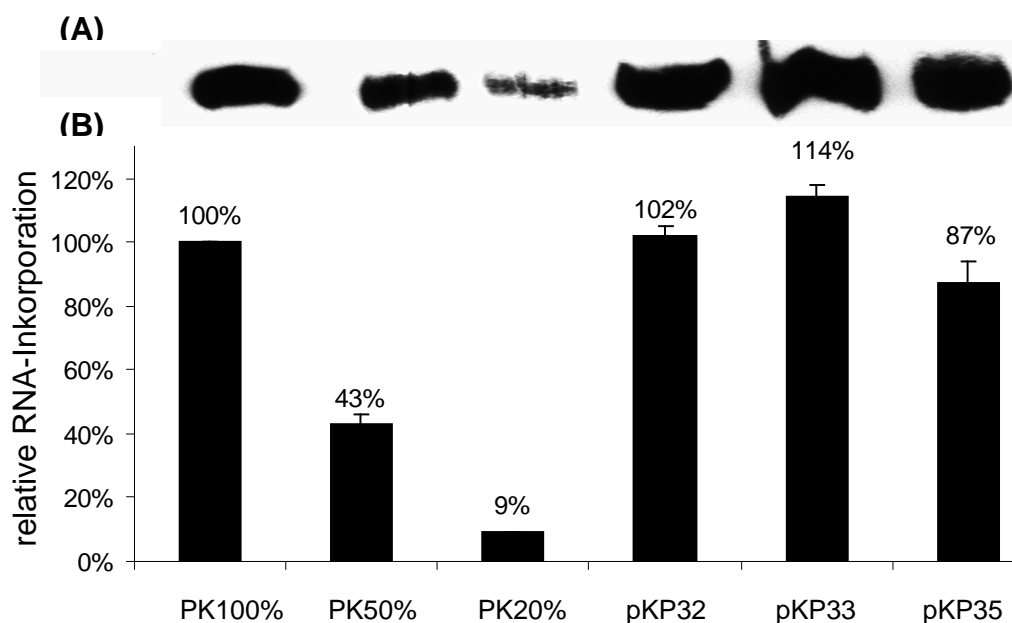


Abb. 12: RNase-Protektions-Assay (RPA) und relative partikelassoziierte RNA-Inkorporation in den verschiedenen Vektorüberständen.

(A) repräsentatives Beispiel einer RPA; (B) statistische Auswertung der Ergebnisse aus 3 Versuchen. Die Konzentration der Positivkontrolle (PK; pMD9-Vektor) wurde gleich 100% gesetzt, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Daten zeigen, dass es möglich ist, die PESII weiter zu verkürzen (pKP32-pKP33). Deletiert man ca. 100 bp dieser verkürzten PESII, kommt es zu einem Verlust der Pol-Inkorporation (pKP35), obwohl die RNA-Inkorporation im Vergleich zu pMD9 und pKP33 nur minimal geringer ist.

4.1.3 Test auf Pol Inkorporation vermittelt durch die PESI und die verkürzte PESII

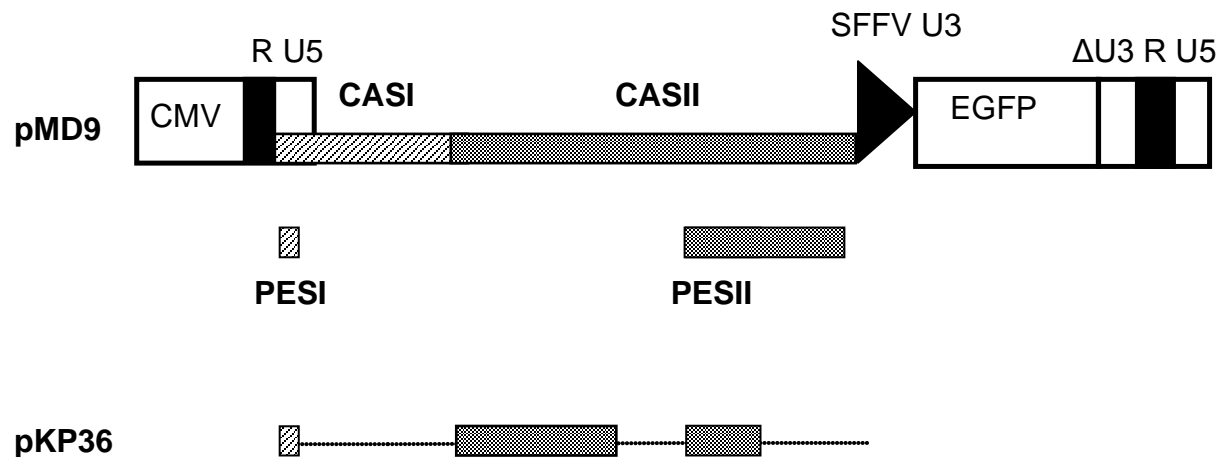


Abb. 13: Vektor mit Deletionen in den CASI- und CASII-Regionen

CMV – Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; CASI/CASII – *cis*-aktive Sequenz I/II; SFFV U3 - U3-Region des *Spleen focus forming Virus*; EGFP - *Enhanced green fluorescent Protein*; PESI/PESII - Polymerase-Enkapsidierungssequenz I/II;

Da pKP33 seine Funktionalität in Bezug auf die Pol- und RNA-Inkorporation nicht verloren hat, stellte sich die Frage, ob die gekürzte PESII zusammen mit der PESI (Peters et al., 2005) ausreichend für die Pol-Verpackung ist. Der für diesen Versuch verwendete Vektor pKP36 war bezüglich seiner CASII-Sequenz identisch zu pKP33, besaß aus der CASI-Region jedoch nur das PESI-Fragment (siehe Abb.13).

Auch mit diesem Vektor wurden 293T Zellen zusammen mit den drei Verpackungsplasmiden (pC1gag2 + pCpol2 + pCenv1) transfiziert, und die Zelllysate und Partikel wurden auf Gag und Pol Expression wie oben beschrieben analysiert.

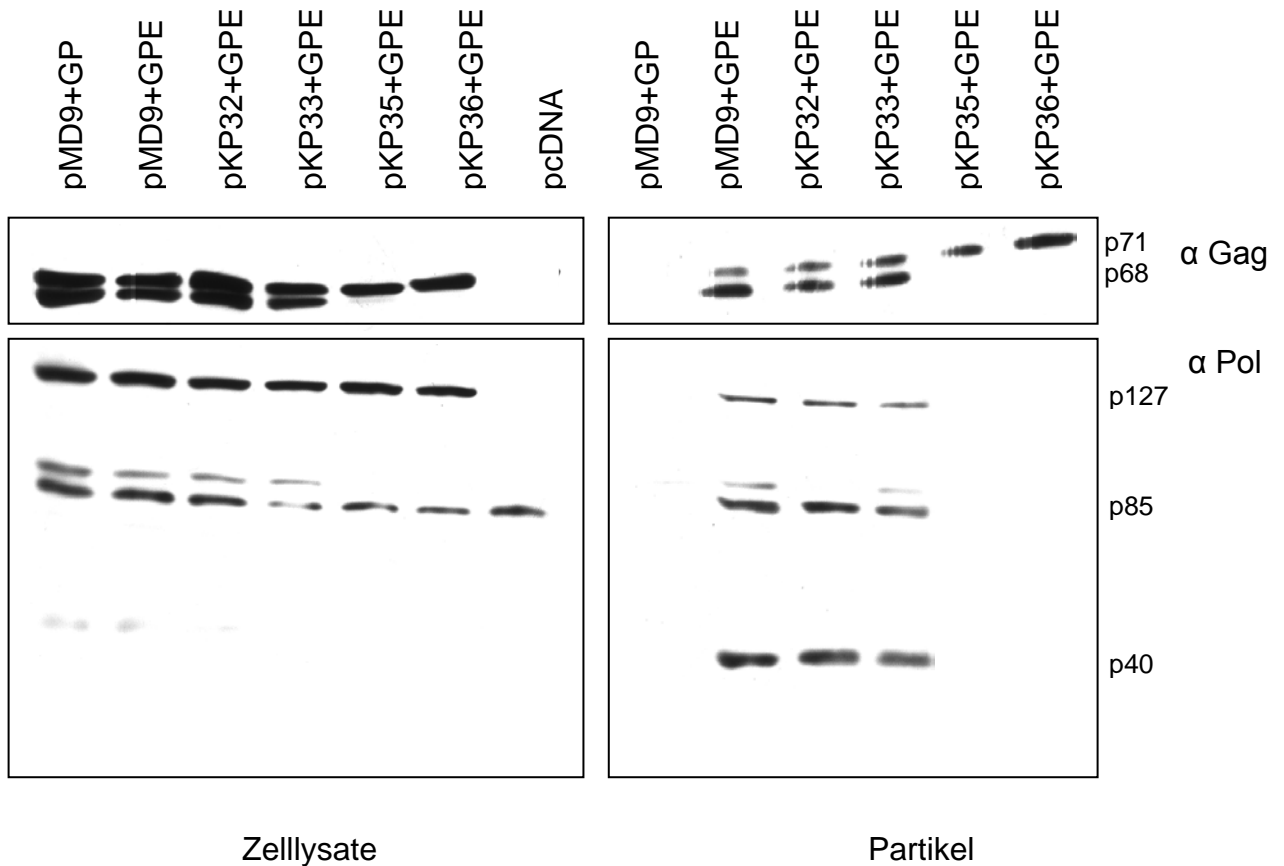


Abb. 14: Western Blot der Gag- und Pol-Proteine in 293T-Zelllysaten und Partikelpräparationen

GP = pClgag2 + pCpol2; GPE = pClgag2 + pCpol2 + pCenv1; Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper wurde in beiden Fällen α Maus HRP-konjugierter Antikörper aus der Ziege verwendet (n=3 Versuche).

Im Western Blot zeigte sich in Zellen, die mit dem pKP36 Vektor transfiziert worden waren keine Proteaseaktivität, da die Proteolyse der Gag- und Pol-Vorläuferproteine nicht stattfand. Weiterhin konnte, wie schon bei pKP35, kein partikelassoziiertes Pol nachgewiesen werden (Abb.14). Es folgte die Bestimmung des RNA-Gehalts der viralen Partikel mittels RPA. Auch hier diente pMD9 als Positivkontrolle, dessen inkorporierte RNA gleich 100% gesetzt wurde. Es zeigte

sich, dass der pKP36-Vektor nicht nur unfähig war, Pol zu verpacken, sondern auch seine RNA-Inkorporation (9%) im Vergleich zu den restlichen Vektoren (87-114%) sehr stark und signifikant reduziert war (Abb. 15).

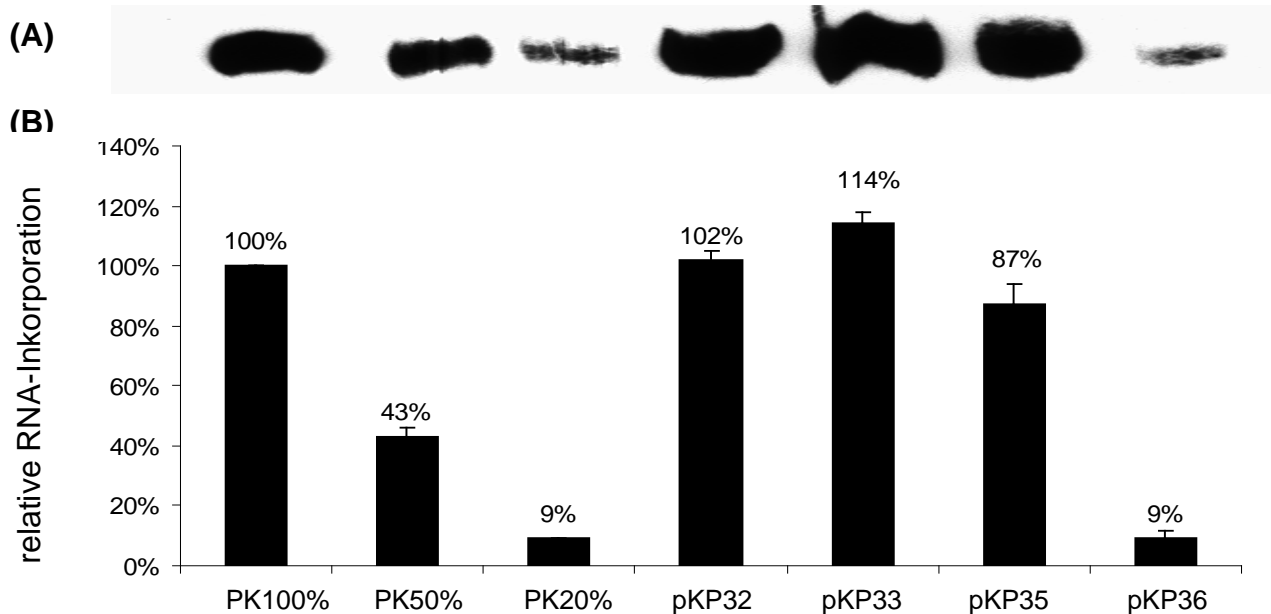


Abb. 15: RPA und relative partikelassoziierte RNA-Inkorporation in den verschiedenen Vektorüberständen im Vergleich mit pKP36.

(A) Beispiel einer RPA und (B) die statistische Auswertung (n=3 Versuche); Die PK (pMD9) wurde gleich 100% gesetzt, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler da.

Das Ergebnis zeigt, dass die PESI nicht ausreichend für die Pol-Inkorporation ist und weitere Sequenzen von CASI benötigt werden, um RNA und Pol-Protein ins FV-Partikel verpacken zu können. Voraussetzung für eine Verpackung ist außerdem das Vorhandensein der entsprechenden CASII-Sequenzen im Vektor (wie z.B. in pKP33).

4.1.4 Transduktionsrate der pKP-Vektoren

Die Vektorvirusüberstände der mit den oben beschriebenen Vektoren transfizierten Zellen wurden auch auf ihre Infektiosität getestet, indem HT1080-Fibroblastenzellen mit 100 µl Virusüberstand infiziert und die Transduktions-effizienz nach 48 h mittels FACS-Analyse gemessen wurde. Die Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte aus drei Versuchen. Als Referenzvektor wurde pMD9 eingesetzt. Die Negativkontrolle bestand aus Virusüberstand von Zellen, die mit allen Plasmiden außer dem Env-Plasmid transfiziert wurden.

Die Abb.16 zeigt, dass die beiden Konstrukte, die keine Pol-Inkorporation zeigten (pKP35, pKP36), auch keine Infektiosität aufwiesen. Für den pKP33-Vektor betrug die Transduktionrate 66,2%, was einem Verlust von gut 20% im Vergleich zu pMD9 (85,9%) entsprach. Auch die Transduktionsrate von pKP32 war mit 64% ca. um ein Viertel niedriger als die von pMD9 (Abb. 16).

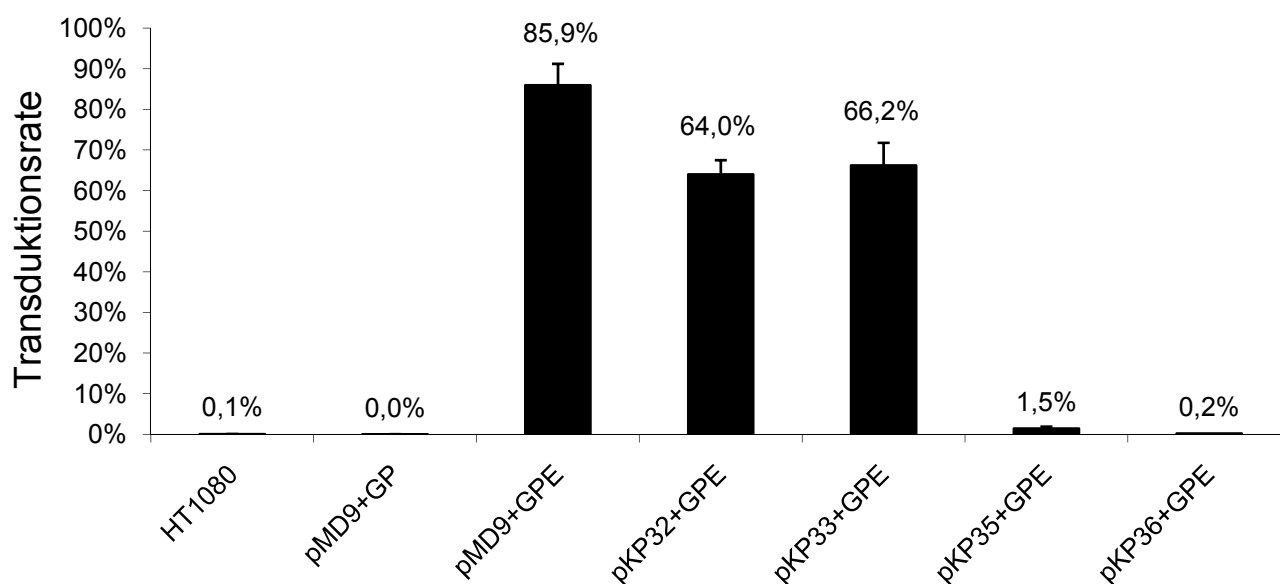


Abb. 16: Transduktionsrate der pKP-Vektoren auf HT1080 Zellen.

Gemessen wurde die EGFP-Fluoreszenz der Zellen, die mit Virusüberstand der jeweiligen Vektoren transduziert wurden. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus 3 Versuchen, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. GPE = Gag + Pol + Env.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine weitere Eingrenzung sowohl der CASII-Region, als auch der PESII ohne einen Verlust der Pol-Expression und RNA-Inkorporation möglich ist (Vektoren pKP32 und pKP33). Die entsprechenden Deletionen im CASII-Bereich haben jedoch einen Einfluss auf die Infektiosität der Viren. Die Transduktionsrate verringert sich im Vergleich zu pMD9 um ca. 25%. Die Deletion der PESII von ursprünglich auf 900 bp auf ca. 300 bp verursacht einen kompletten Verlust der Fähigkeit zur Pol-Inkorporation, obwohl die RNA-Verpackung nur um ca. 13% niedriger ist als bei pMD9. Die PESI-Sequenz ist trotz Vorhandensein der CASII-Sequenz nicht ausreichend für die Verpackung des Pol-Proteins bzw. der RNA ins Partikel. Das heisst, PESI und II (letztere in verkürzter Form) sind zwar erforderlich für eine Pol-Verpackung aber nicht ausreichend.

4.1.5 Einfügung des cPPT in den pKP33 Vektor

Der Fähigkeit des pKP33-Vektors, Pol und RNA zu inkorporieren, war nicht schlechter als beim Referenzvektor pMD9, im Gegensatz zu seiner Transduktionseffizienz, die erheblich verringert war (Abb. 16). Um zu testen, ob auch diese wieder erhöht werden kann, wurden die pTW-Vektoren kloniert. Ausgehend vom Vektor pKP33 besitzen sie zusätzlich eine kurze Oligonukleotidsequenz, bestehend aus dem zentralen Polypurinktrakt (cPPT) bzw. Modifizierungen desselben (Abb. 17).

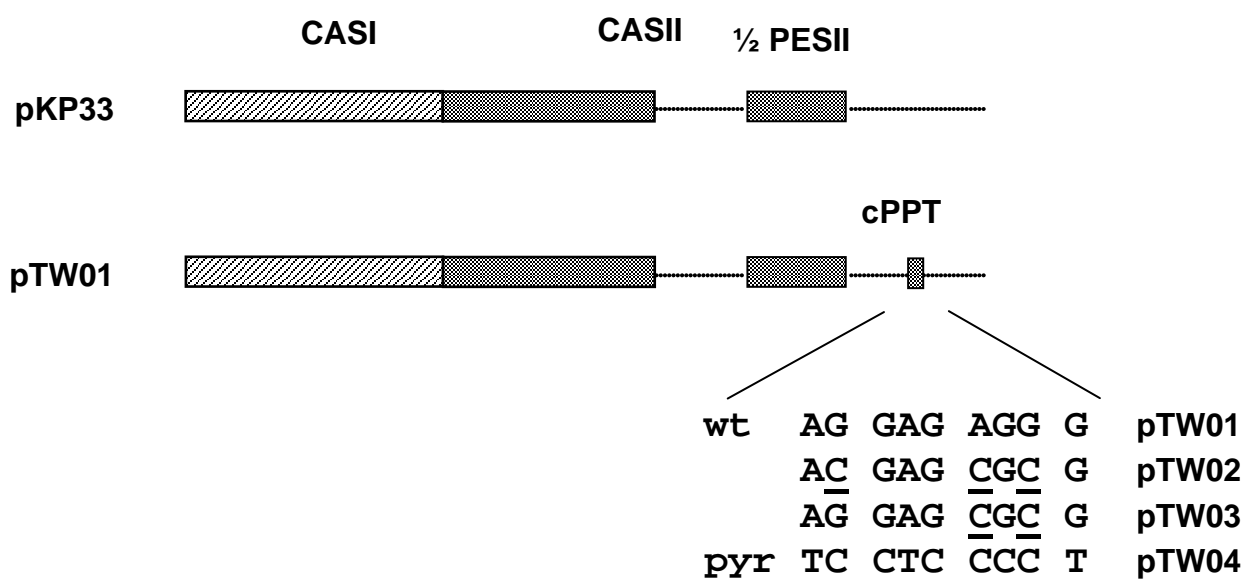


Abb. 17: Darstellung der pTW-Vektoren

CASI/CASII - *cis*-aktive Sequenzen I/II; PESII - Polymerase Enkapsidierungssequenzen II; cPPT - Zentraler Polypurintrakt; wt - Wildtyp-Sequenz; pyr - Pyrimidine

Der cPPT ist eine von vier purinreichen Sequenzen die im 3'-Bereich des wt PFV *pol*-Gens enthalten sind. Die Sequenz dieses cPPT ist identisch mit der Sequenz des 3'PPT, welcher stromaufwärts der 3'LTR liegt. Er besteht aus einer Folge von 9 Adenosin- und Guanosinresten, die für die Initiation der Plusstrang-DNA-Synthese wichtig sind. Darüber hinaus ist die Sequenz des cPPT in allen Foamyvirus-Spezies streng konserviert, was auf eine grundlegende Bedeutung für das Virus hinweist (Kupiec et al., 1988; Peters et al., 2008; Tobaly-Tapiero et al., 1991). Peters et al., 2008 konnten die Wichtigkeit dieses cPPT für die virale Replikation und den FV Vektortransfer hervorheben. Aus diesem Grunde wurde dieses Element in die Vektoren pTW01, pTW02, pTW03 und pTW04 eingesetzt. Der Vektor pTW01 enthält die Wildtypsequenz des cPPT. pTW02 und pTW03 enthalten den cPPT mit Austausch einiger Purine gegen Pyrimidine und pTW04 enthält anstatt der Purine nur Pyrimidine (siehe Abb.17). 293T Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für Gag, Pol und Env (pCgag2 + pCpol2 + pCenv1) und dem jeweiligen pTW-Vektor kotransfiziert. Es folgte eine Western Blot-Analyse der Pol- und Gag-Expression in den Zelllysaten und in den aufgereinigten Partikeln.

Alle pTW-Vektoren zeigten eine gleichmäßige zelluläre und partikelassoziierte Gag-Expression, die vergleichbar zu pMD9 und pKP33 war. Die Prozessierung der Pol-Proteine erfolgte in allen Ansätzen, die Inkorporation von Pol in die Viruspartikel war jedoch bei den Vektoren mit mutiertem cPPT (pTW02, pTW03, pTW04) etwas geringer als bei pMD9 und pKP33. Auch die RNA-Verpackung dieser Vektoren war erheblich schlechter als bei pMD9, aber vergleichbar mit pKP33. Interessant war die Beobachtung, dass pTW01 genauso viel RNA in die Partikel inkorporierte wie pMD9, etwa 22% mehr als pKP33.

Ergebnisse

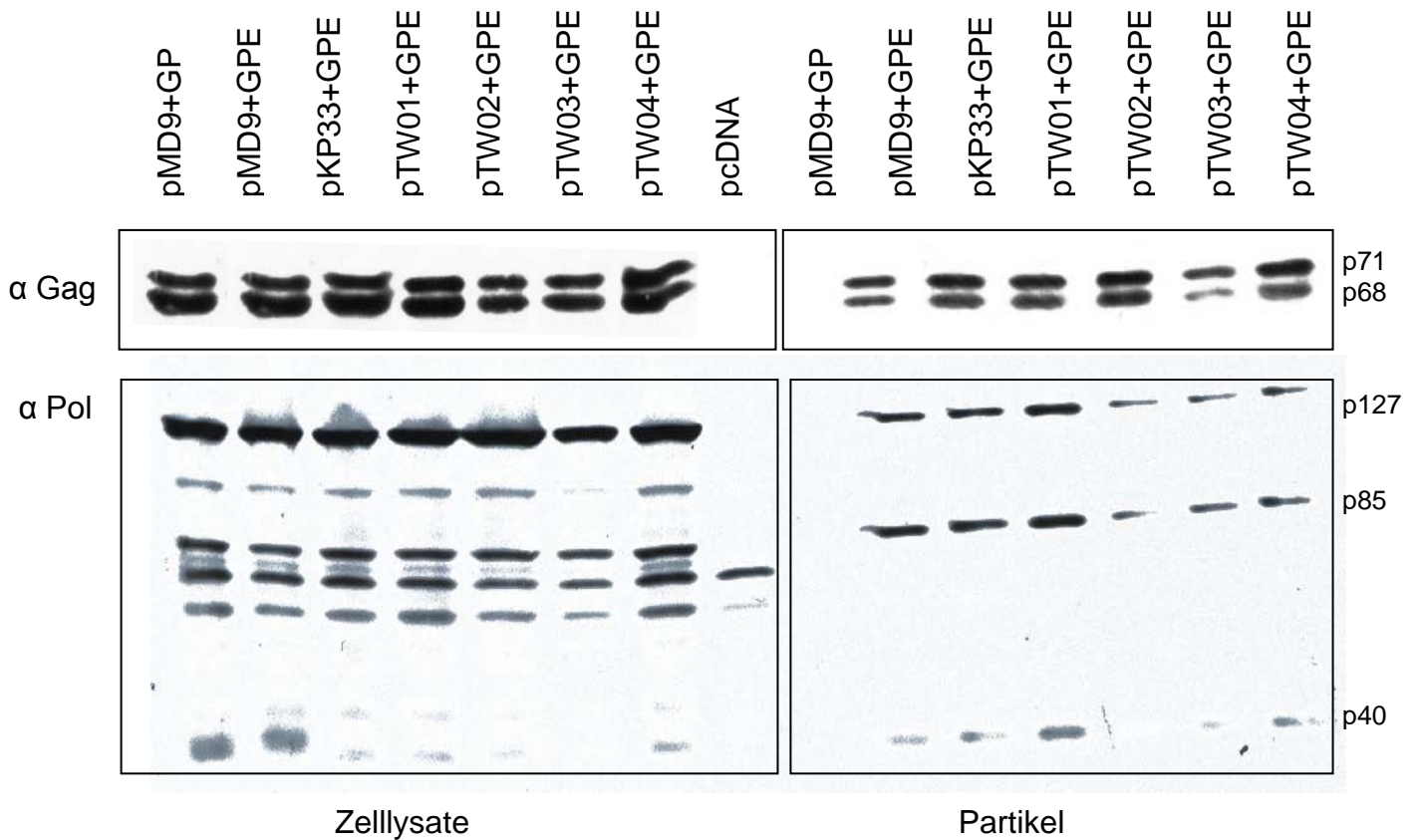


Abb. 18: Repräsentativer Western Blot der Gag- und Pol-Expression in Zelllysaten und Partikelpräparation zum Vergleich der pTW-Vektoren.

GP= pClgag2 + pCpol2; GPE= pClgag2 + pCpol2 + pCenv1; Gag-Proteine wurden mit dem primären monoklonalen Antikörper SGG1 und Pol-Proteine mit den primären monoklonalen Antikörpern 15E10 und 3E11 detektiert. Als sekundärer Antikörper wurde in beiden Fällen α Maus HRP konjugierter Antikörper aus der Ziege verwendet (n=3).

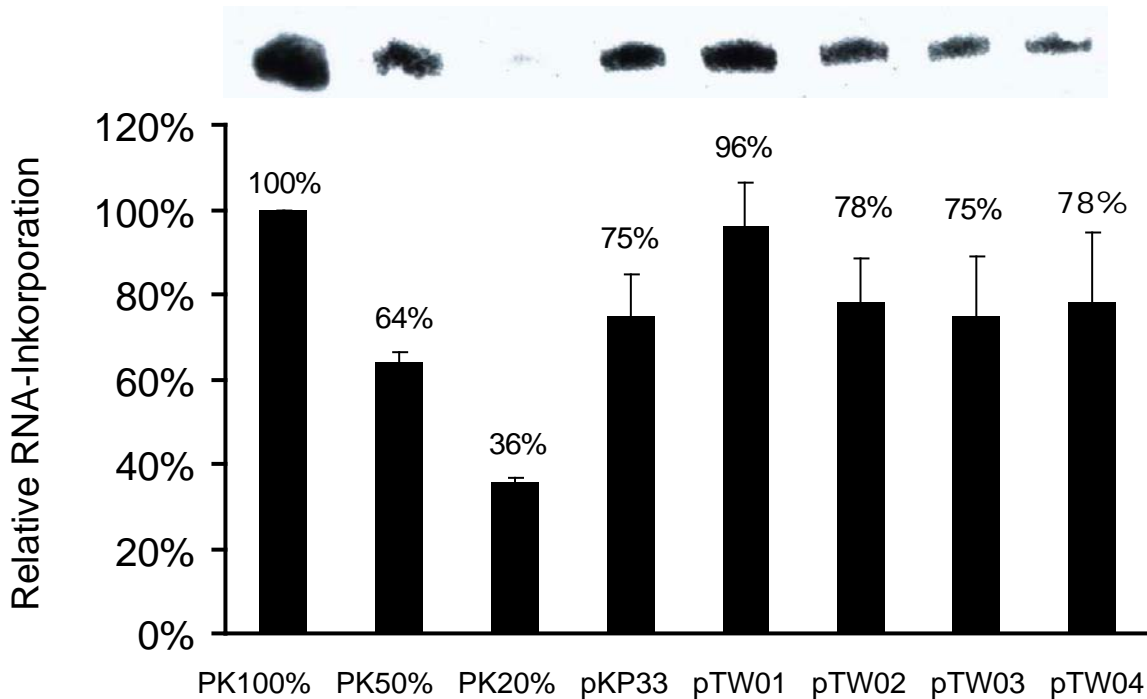


Abb. 19: RNase Protektions Assay (RPA) und relative Partikelassoziierte RNA Inkorporation der pTW Vektoren im Vergleich zu pKP33

Beispiel einer RPA und statistische Auswertung (n=3); Die PK (pMD9) wurde gleich 100% gesetzt, die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar.

Die FACS-Analyse zur Überprüfung und zum Vergleich der Transduktionseffizienzen der jeweiligen pTW-Vektoren auf HT1080 Fibroblastenzellen zeigte für pKP33 im Vergleich zu pMD9 eine Erniedrigung um ca. 23%. Im Gegensatz dazu war die Infektiosität des Überstandes der pTW01-Transfektion ähnlich zu der von pMD9. Der Überstand der Transfektionen mit pTW02 und pTW04 zeigte im Vergleich zu pKP33 halb so gute Infektion der Zielzellen, im Vergleich zu pMD9 sogar eine dreifach schlechtere. Die Transduktionsrate von pTW03 lag hingegen bei 60%, was der Rate von pKP33 ähnelte (siehe Abb. 20).

Ergebnisse

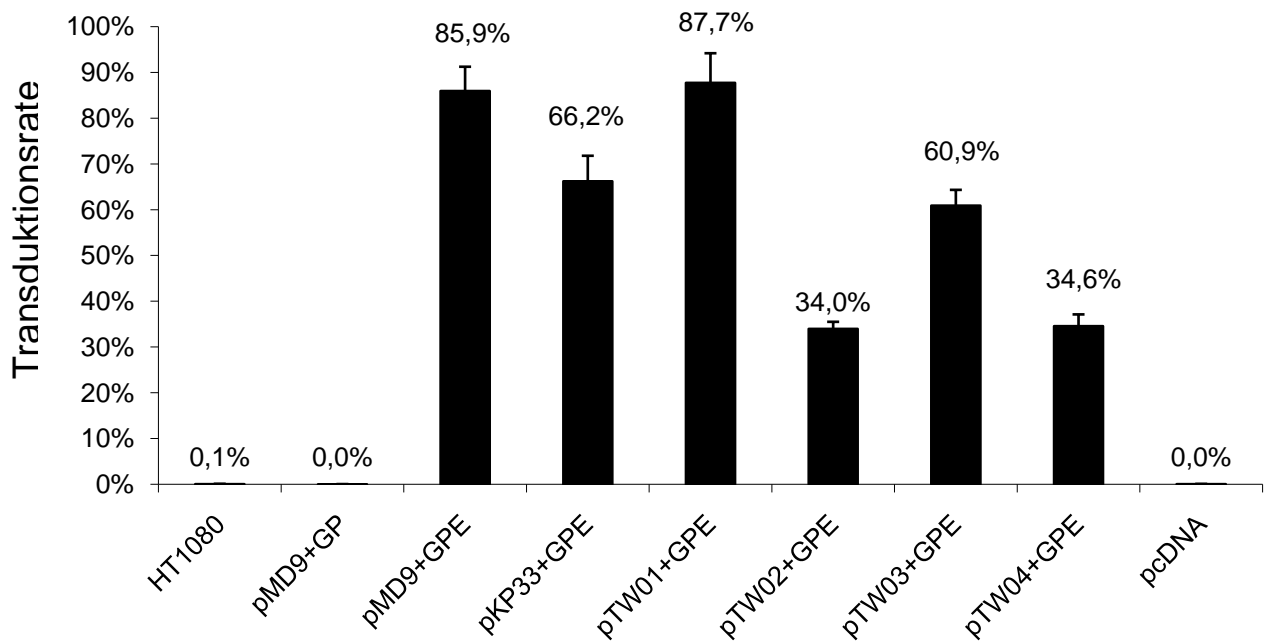


Abb. 20: Transduktionsrate der pTW Vektoren auf HT1080 Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler. GPE = Gag + Pol + Env.

4.1.6 Transduktionsrate von pTW01 auf Mesenchymalen Stammzellen (MSC)

Da der Vektor pTW01 eine hohe Transduktionseffizienz zeigte, die dem Referenzvektor pMD9 glich, wurden zusätzlich humane mesenchymale Stammzellen mit Vektorüberstand infiziert. Die Fähigkeit primäre MSC zu infizieren, ermöglicht den Einsatz dieses foamyviralen Vektors in der Gentherapie z.B. bei der Rheumatoide Arthritis. Die FACS-Analyse ergab ein ähnliches Ergebnis wie die Infektion von Fibroblastenzellen. Abb. 21 zeigt, dass der Überstand des Transfektionsansatzes von pTW01 MSCs mit einer ähnlichen Effizienz transduziert wie der von pMD9 (56% bzw. 60%). Der Überstand von pKP33 hingegen zeigte mit 46% eine niedrigere Transduktionsrate als pTW01.

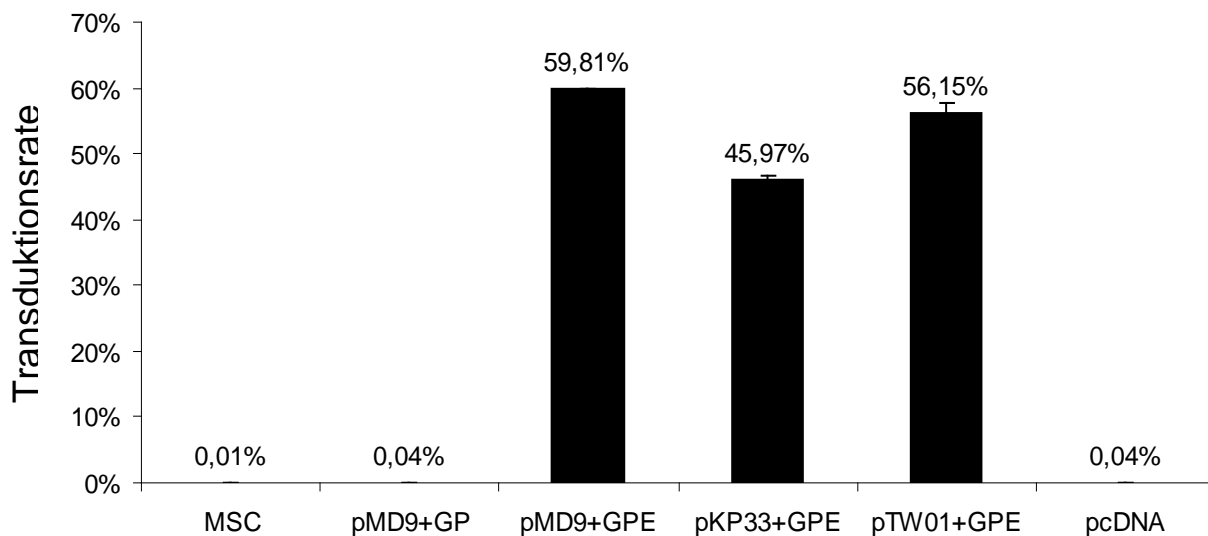


Abb. 21: FACS-Analyse der Transduktionsrate der pTW-Vektoren auf Mesenchymalen Stammzellen (MSC). Dargestellt ist der Durchschnittswert aus 3 unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. GP= Gag + Pol; GPE= Gag + Pol + Env.

4.2 Heterologe Verpackung der deletierten PFV CASII Vektoren mit SFV_{mac} Proteinen

Für HIV-1-Gag wurde gezeigt, dass es imstande ist auch andere ungespleißte lentivirale mRNAs zu verpacken. Beispielsweise kann HIV-1-Gag HIV-2- (Kaye and Lever, 1998), SIV- (Rizvi and Panganiban, 1993; White et al., 1999), und FIV-RNAs verpacken (Browning et al., 2001). Für FIV wurde beschrieben, dass sein Gag-Pol-Fusionsprotein die mRNA von HIV-1 cross-verpackt (Browning et al., 2001). SIV-Gag-Pol kann sowohl HIV-1- (White et al., 1999), als auch HIV-2-mRNA verpacken (Strappe et al., 2005). Auch für Foamyviren konnte eine heterologe Verpackung von PFV-Genom mit SFV_{mac}-Verpackungsplasmiden (und umgekehrt) gezeigt werden (Gärtner et al., 2009). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob SFV_{mac}-Gag, -Pol und -Env-Expressionsplasmide (pClgag-1, pClpol, pClenv3.5) imstande sind, RNA der neu konstruierten pKP- und pTW-Vektoren zu verpacken und ob diese produzierten Vektorpartikel infektiös sind. Dafür wurden 293T-Zellen mit den beschriebenen PFV-Vektoren und den SFV_{mac}-Verpackungsplasmiden kotransfiziert. Der Virusüberstand wurde nach 48 Stunden geerntet und Fibroblasten mit dem Überstand transduziert. Danach folgte die FACS-Analyse der EGFP-positiven Zellen. Als Positivkontrolle des SFV_{mac}-Systems wurde das Plasmid EGFPD (kodierte für die verpackbare SFV_{mac}-RNA mit EGFP-Markerprotein unter der Kontrolle eines CMV-Promotors) mit den SFV_{mac}-Verpackungsplasmiden verpackt.

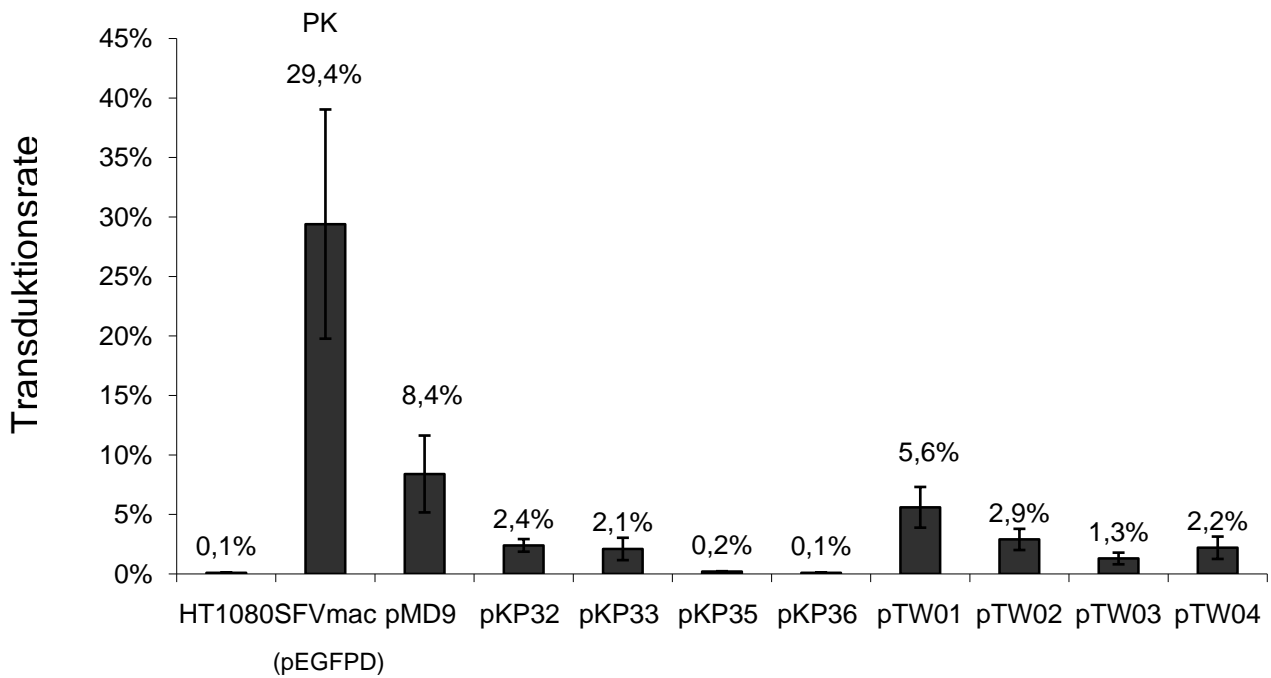


Abb. 22: FACS-Analyse der Transduktionsrate der pKP- und pTW-Vektoren, die nach Kotransfektion von 293T-Zellen mit SFV_{mac} Verpackungsplasmiden (Gag+Pol+Env) produziert wurden auf HT1080 Zellen. Dargestellt ist der Durchschnittswert aus 3 unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. SFV_{mac} - Simian Foamy Virus des Makaken.

Alle Vektoren bis auf pKP35 und pKP36 bildeten infektiöse Partikel (siehe Abb. 22), allerdings war die Transduktionsrate der Vektoren um ca. 70% bis 95 % schlechter als mit den PFV-Verpackungsplasmiden. Die Zahlen sind in Tab. 4. dargestellt.

Tab. 4. Vergleich der Transduktionsrate der pKP und pTW Vektoren mit PFV- und SFV_{mac} Verpackungsplasmiden.

	PFV Verpackungsplasmide	SFV_{mac} Verpackungsplasmide
HT1080	0,1%	0,1%
pEGFPD	-	29,4%
pMD9	85,9%	8,4%
pKP32	64%	2,4%
pKP33	66,2%	2,1%
pKP35	1,5%	0,2%
pKP36	0,2%	0,1%
pTW01	87,7%	5,6%
pTW02	34%	2,9%
pTW03	60,9%	1,3%
pTW04	34,6%	2,2%

Die Transduktionseffizienz der PFV-Vektoren verpackt mit heterologen SFV_{mac}-Verpackungsplasmiden ist deutlich niedriger, als dies bei der Verpackung mit homologen PFV-Expressionsplasmiden der Fall war. Unterschiede zwischen den Transduktionsraten der einzelnen Vektoren sind jedoch zu beobachten. Die Raten des pMD9 und pTW01 Vektors sind am höchsten für PFV- (pMD9 85,9%; pTW01 87,7%) und SFV_{mac} Proteine (pMD9 8,4%; pTW01 5,6%).

Dieser Versuch zeigt, dass ein Cross-packaging der neu konstruierten PFV-Vektoren auch mit den heterologen Expressionsplasmiden möglich ist, jedoch in äußerst geringem Maße.

4.2.1 Doppelverpackung von PFV und SFV_{mac}

Nachdem gezeigt werden konnte, dass FV-Verpackungsplasmide heterologe RNA verpacken können, stellte sich die Frage, ob das homologe Genom bei der Verpackung bevorzugt wird (z.B. PFV-Vektor von PFV-Proteinen in Anwesenheit von SFV_{mac}-Vektor) oder ob gleichzeitig das heterologe Genom inkorporiert wird (z.B. SFV_{mac}-Vektor von PFV-Proteinen in Anwesenheit von PFV-Vektor).

Für diesen Versuch wurden die Vektoren pTW05 und pTW06 kloniert, die beide jeweils ein Rot-fluoreszierendes Protein (RFP) exprimierten. pTW05 kodierte das mRFP- und pTW06 das tagRFP-Markerprotein (siehe Abb. 23). Der Unterschied zwischen diesen zwei Markerproteinen ist, dass tagRFP im Vergleich zu mRFP, ein helleres rot kodiert (Merzlyak et al., 2007). Beide Vektoren leiten sich von dem früher beschriebenen pMD9-Vektor ab. Der Unterschied zu pMD9 besteht darin, dass pTW05 und pTW06 statt des EGFP- ein RFP-Markergen kodieren, dessen Expression unter Kontrolle eines CMV-Promotors steht. Dieser Promotor wurde gewählt, da das EGFP-Markergen von SFV_{mac} ebenfalls unter der Kontrolle dieses Promotors stand und somit die Intensität der Expression der unterschiedlichen Fluoreszenzproteine vergleichbar war.

pEGFPD

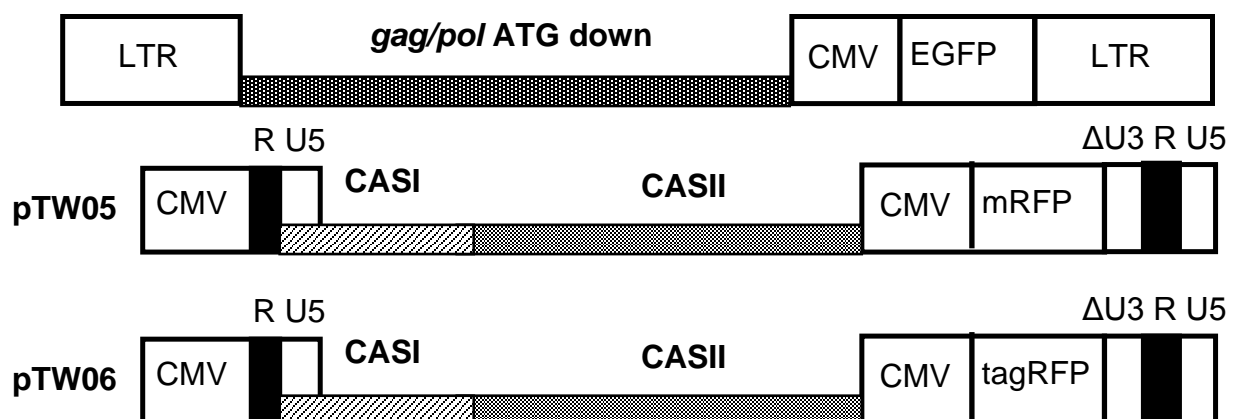


Abb. 23: pEGFPD Vektor (abgeleitet von SFV_{mac}) & pTW05, pTW06-Vektoren (abgeleitet von PFV) LTR- long terminal repeat; CMV - Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; CASI/CASII - *cis*-aktive Sequenz I/II; mRFP - monomeres rotfluoreszierendes Protein; tagRFP - tag rotfluoreszierendes Protein.

Ergebnisse

Wie oben beschrieben, wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert, um die Viruspartikel zu produzieren. Es wurden folgende Plasmidkombinationen eingesetzt: (i) PFV-Expressionsplasmide für Gag, Pol und Env (pClgag2, pCpol2 und pCenv1) in Kombination mit homologem PFV-Vektor (pTW05 oder pTW06), (ii) SFV_{mac}-Expressionsplasmide für Gag, Pol und Env (pClgag-1, pCpol und pCenv 3.5) in Kombination mit homologem SFV_{mac}-Vektor (pEGFPD). (iii) PFV-Expressionplasmide mit heterologen und homologen Vektoren (pEGFPD und pTW05 oder pTW06) und (iv) SFV_{mac}-Expressionsplasmide mit heterologen und homologen Vektoren (pTW05 oder pTW06 und pEGFPD). Der Virusüberstand wurde in einer 1:10-Verdünnung auf HT1080-Zellen gegeben. Nach 48 Stunden erfolgte die FACS-Analyse der EGFP- und RFP-positiven Zellen.

Tab. 5. Kombinationen der Vektoren in den Transfektionsansätzen für die Doppelverpackung.

	PFV-Proteine	SFV _{mac} -Proteine	pTW05	pTW06	pEGFPD	pcDNA
pTW05+PFV	+		+			+
pTW06+PFV	+			+		+
pEGFPD+SFV _{mac}		+			+	+
pTW05+pEGFPD+PFV	+		+		+	
pTW06+pEGFPD+PFV	+			+	+	
pTW05+pEGFPD+SFV _{mac}		+	+		+	
pTW06+pEGFPD+SFV _{mac}		+		+	+	
pcDNA						+

Ergebnisse

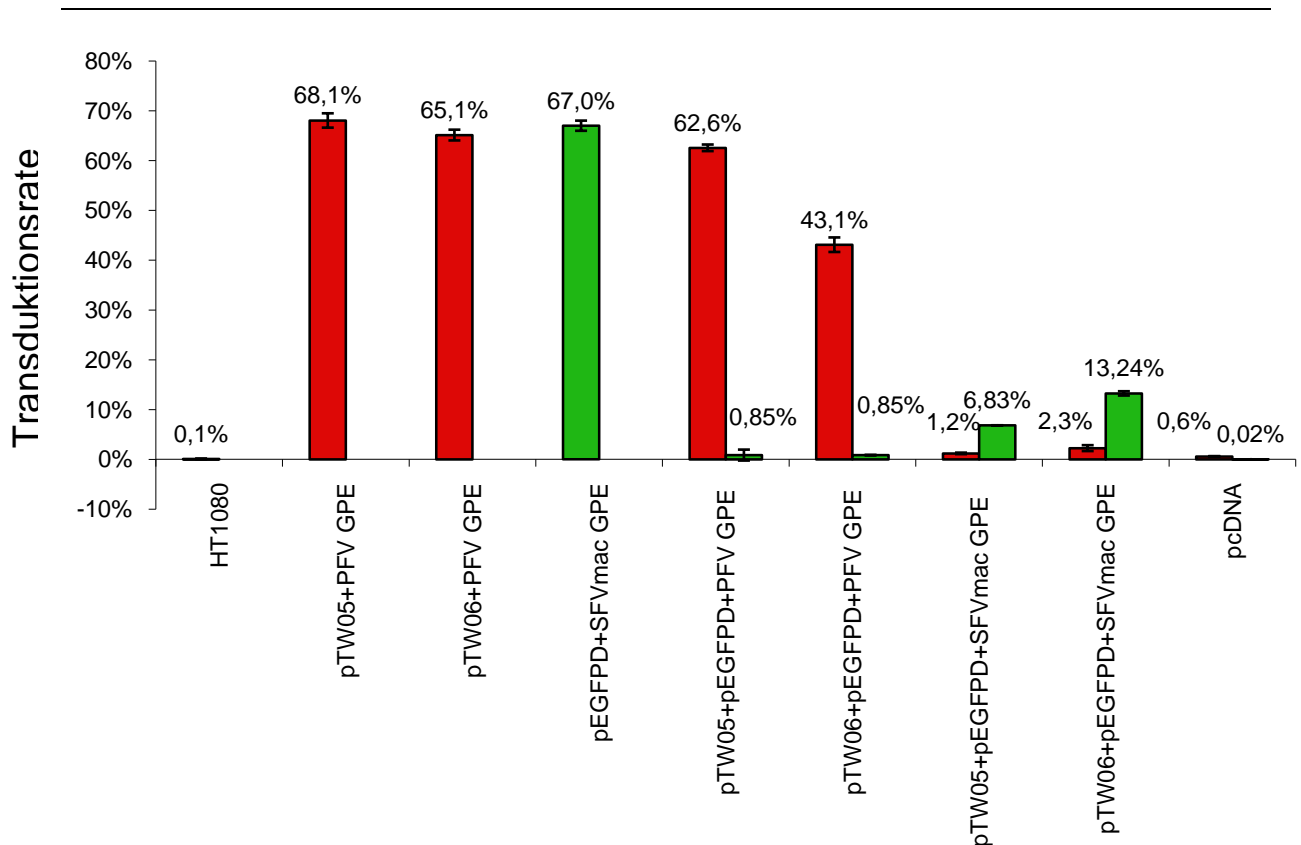


Abb. 24: FACS-Analyse von HT1080- Zielzellen nach Transduktion mit Vektorviren die durch die Doppelverpackung von PFV- und SFV_{mac}-Vektoren mit PFV- bzw. SFV_{mac}-Verpackungsplasmiden entstanden sind.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. GPE = Gag + Pol + Env (pC1gag2 + pCpol2 + pCenv1).

Bei der Infektion von HT1080-Zielzellen mit einer 1:10-Verdünnung der Überstände zeigten homologe PFV-Partikel eine Transduktionsrate von 68,1% (pTW05) bzw. 65,1% (pTW06). Für homologe SFV_{mac}-Partikel betrug die Transduktionsrate 67% (pEGFPD). Bei der Doppelverpackung waren die Gesamt-Transduktionsraten immer niedriger als bei der Einzelverpackung der Vektoren. Bei Kotransfektion von pTW05 mit dem SFV_{mac}-Vektor pEGFPD und den PFV-Expressionsplasmiden zeigte sich für pTW05 eine Transduktionsrate von 62,6%, für pEGFPD eine Rate von 0,85%. Ähnliche war das Ergebnis bei pTW06. Dessen Rate lag bei 43,1%, die des kotransfizierten pEGFPD bei 0,85%. Im Falle der Kotransfektion der SFV_{mac}-Verpackungsplasmide mit SFV_{mac}- und PFV-Vektoren zeigte sich für den SFV_{mac}-Vektor eine Transduktionsrate von 6,83% bei

gleichzeitiger Verpackung von pTW05, bzw. eine Rate von 13,24% bei gleichzeitiger Verpackung von pTW06. Die Transduktionseffizienz der PFV-Vektoren kotransfiziert mit SFV_{mac}-Vektor und SFV_{mac}-Proteinen waren sehr niedrig und lagen zwischen 1-2 %. pcDNA und nicht-transduzierte HT1080-Fibroblastenzellen dienten in diesem Versuchansatz als Negativkontrolle.

Vergleichbare Ergebnisse, erhielt man wenn statt HT1080 - HeLa-Zellen mit Foamyvirus-Vektorüberstand infiziert wurden (Abb. 24). Die Transduktionsrate der Einzelverpackung betrug jeweils 18,1% für pTW05, 9,9% für pTW06 und 43,5% für pEGFPD. Bei Doppelverpackung mit PFV-Proteinen zeigte der pTW05-Vektor eine Transduktionseffizienz von 18,7%, was vergleichbar ist mit der Einzelverpackungseffizienz. Die Effizienz des SFV_{mac}-Vektors in Kombination mit dem pTW Vektoren war sehr gering, da sie unter einem Prozent lag. Analog dazu zeigten die PFV-Vektoren ebenfalls Transduktionsraten von unter einem Prozent, wenn die pTW-Vektoren mit SFV_{mac}-Proteinen verpackt wurden. Die Transduktionseffizienz von pEGFPD betrug hier 2,8%, wenn zusätzlich der PFV Vektor kotransfiziert wurde (für pTW05) bzw. 5,6% bei Kotransfektion mit dem pTW06 Vektor.

Ergebnisse

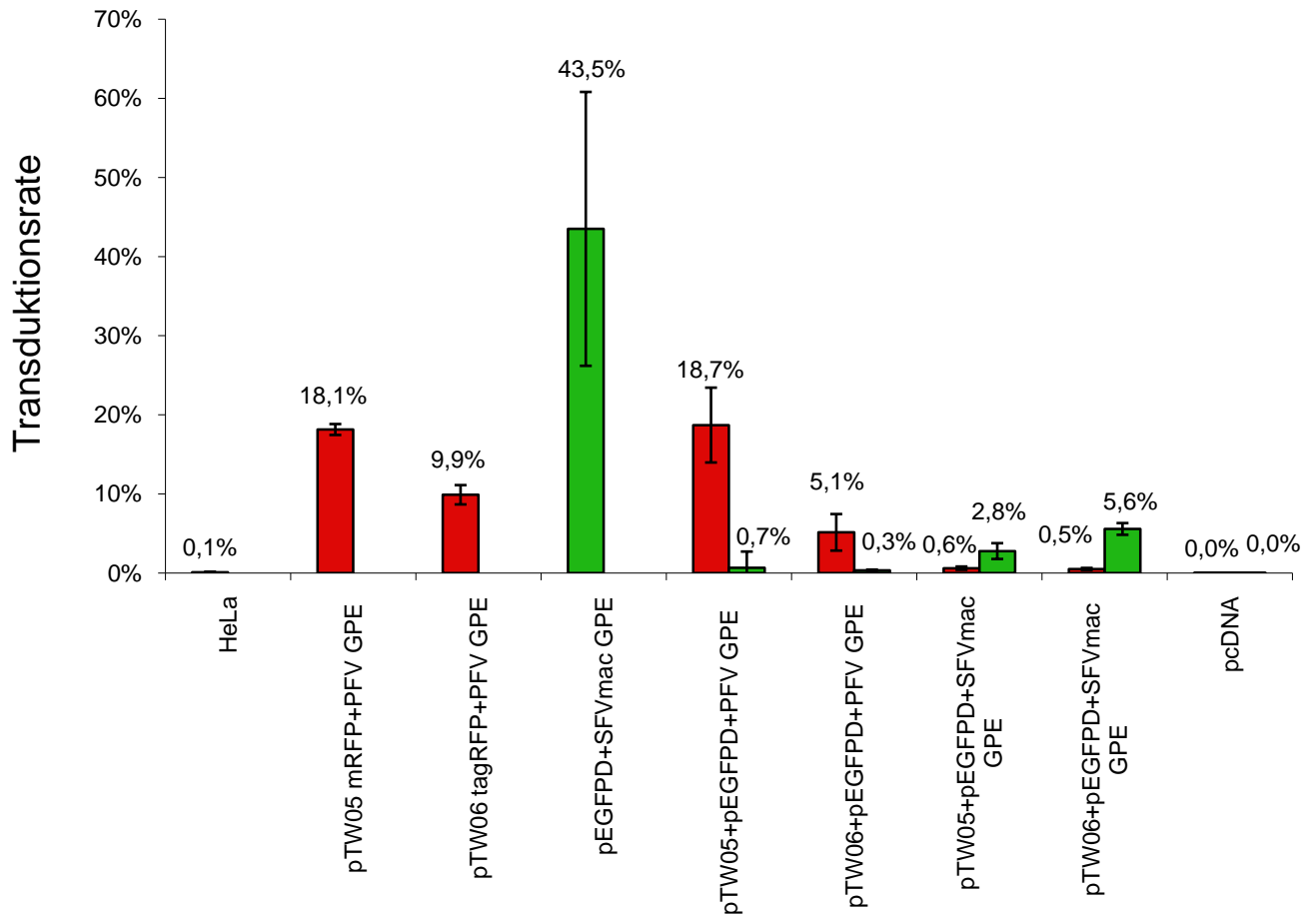


Abb. 25: FACS-Analyse von HeLa-Zielzellen nach Transfektion mit Vektorviren, die durch die Doppelverpackung von PFV- und SFV_{mac}-Vektoren mit PFV- bzw. SFV_{mac}-Verpackungsplasmiden entstanden sind.

HeLa Zellen wurden mit Virusüberstand transduziert. Dargestellt ist der Durchschnittswert aus 3 unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. GPE = Gag + Pol + Env

Wenn in einer virusproduzierenden Zelle zwei verschiedene Virusgenome transkribiert werden, kann es sowohl zur Bildung von homologen (PFV-Proteine + PFV-Genom), als auch heterologen (PFV-Proteine + SFV_{mac}-Genom) Viruspartikeln kommen. Bei Kotransfektion von zwei verwandten Genomen war die Anzahl der entstandenen homologen Viruspartikel im Vergleich zur Einzelverpackung im Fall von PFV um ca. ein Drittel und bei SFV_{mac} über 2/3 niedriger (Infektion von HT1080-Zellen). Bei der Infektion von HeLa-Zellen war der Rückgang von PFV-Partikeln in der Doppelverpackung im Vergleich zur Einzelverpackung sehr gering. Die Anzahl der SFV_{mac}-Partikel hingegen war in der

Doppelverpackung um ungefähr das Achtfache niedriger als in der Einzelverpackung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass homologe Genomverpackung bevorzugt wird. Das artfremde Genom scheint einen negativen Einfluss auf die Verpackung des homologen Genoms zu haben, was vor allem bei den Transfektionsansätzen mit SFV_{mac}-Proteinen zusammen mit dem SFV_{mac}- und PFV-Genom deutlich war.

4.3 Expression der foamyviralen Gag, Pol und Env Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*

Als eine Alternative zur der bisher angewandeten foamyviralen Vektorvirusproduktion in humanen Zelllinien, wurde getestet ob eine Expression foamyviraler Proteine auch in einem einfacheren eukaryotischen System möglich ist, nämlich in Hefen (*S. cerevisiae*). Die drei foamyviralen Proteine Gag, Pol und Env wurden in drei unterschiedliche Hefeexpressionsvektoren kloniert (pKT10Ura, pESCLEu und pESCTrp) um zukünftig eine gleichzeitige Expression von den drein viralen Proteinen (Gag,Pol,Env) in einer Hefezelle durch Selktionsdruck (Leu, Ura und Trp) zu ermöglichen. Nicht alle Konstrukte zeigten eine Expression der viralen Proteine. Die Konstrukte welche eine Expression aufwiesen sind in Tab. 6. dargestellt.

Alle Vektoren enthalten einen 2μ origin, welcher eine autonome Replikation der Plasmide in Hefezellen ermöglicht. Zusätzlich enthält jedes Plasmid einen Hefeselektionsmarker wie *URA3* in pKT10, *LEU2* in pESCLEu und *TRP1* in pESCTrp. Die foamyviralen Proteine wurden hinter einem *GAL1* Promotor (pESC Vektoren) oder einem GAP Promoter (pKT10) eingefügt. Anschließend wurde ein Hefestamm (YPH 500 oder L40-*ura3*) mit diesen Konstrukten transformiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen. Die Expression der foamyviralen Proteine wurde mittels Western Blot untersucht.

Tab. 6. Hefekonstrukte, die Expression der foamyviralen Proteine zeigten

Ausgangsplasmid	Plasmidname	Foamyvirales Protein
pKT10	pTW07	Gag
pKT10	pTW08	Pol
pKT10	pTW09	Env
pESCLEu	pTW10	Gag

Die Expression des Gag Proteins konnte für das pTW07 wie auch pTW10 Konstrukt gezeigt werden. Die Expression des Gag Proteins in pTW10 ist im Vergleich zu pTW07 transformierten Hefezellen sehr schwach. Als Positivkontrolle diente ein Zelllysate aus den Gag, Pol, Env transfizierten 293T Zellen, in dem eine Gag - Doppelbande detektiert wurde. Im Falle des Lysates aus Hefezellen, die mit pTW07 bzw. pTW10 transformiert waren, wurde nur eine Bande nachgewiesen, da nur Gag exprimiert wurde (siehe Abb. 26).

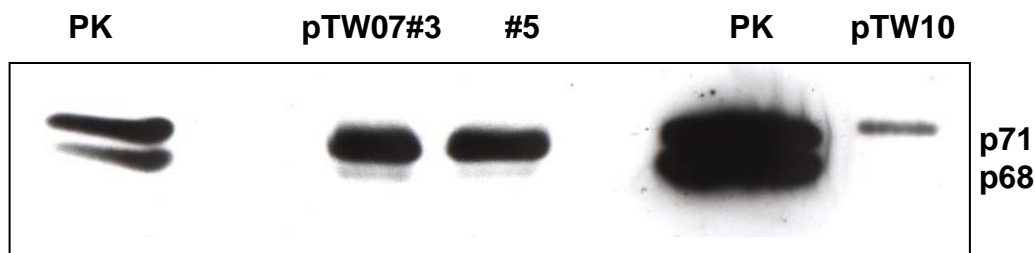


Abb. 26: Gag Western Blot, Expression des foamyviralen Gag Proteins in Hefen.

PK - Positivkontrolle; pTW07 und pTW10 - Gag Hefeexpressionskonstrukt, #3 und #5 – zwei Klone.

Die Expression des Pol Proteins konnte nur für das Konstrukt pTW08 gezeigt werden (siehe Abb. 27). Die Expression des Pol Proteins in den pESC Vektoren konnte nicht detektiert werden. Auch im Falle des Env Proteins konnte nur eine Expression im pKT10 Kontext nachgewiesen werden (siehe Abb. 28).

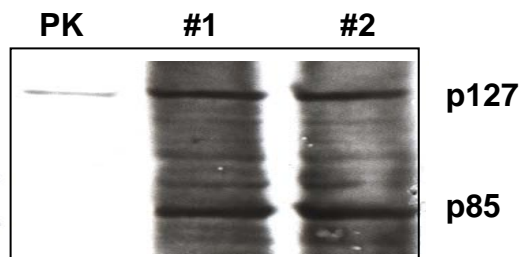


Abb. 27: Pol Western Blot, Expression des foamyviralen Pol Proteins in Hefen.

PK – Positivkontrolle; pTW08 – Pol Hefeexpressionskonstrukt, #1 und #2 zwei Klone.

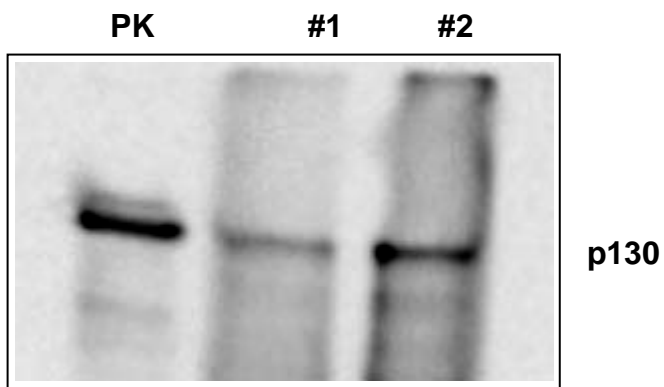


Abb. 28: Env Western Blot, Expression des foamyviralen Env Proteins in Hefen.

PK – Positivkontrolle; pTW09 – Env Hefeexpressionskonstrukt.

Als bester Hefeexpressionsvektor erwies sich der pKT10 Vektor, da alle drei foamyviralen Proteine in diesem Vektor exprimiert werden konnten.

5 Diskussion

Foamyviren zeichnen sich durch viele Eigenschaften aus, die relevant für die Entwicklung und den Einsatz foamyviraler Vektoren für die Gentherapie sind. Sie sind aphanogen (Falcone et al., 2003; Hooks and Gibbs, 1975; Schweizer et al., 1997), besitzen einen breiten Zelltropismus und haben das größte Genom unter den Retroviren (über 13kb), was eine große Verpackungskapazität im Vergleich zu anderen Retroviren gewährleistet. Das infektiöse Genom von FV ist DNA (stabiler als RNA), da die reverse Transkription schon in der virusproduzierenden Zelle stattfindet (Heneine et al., 2003; Hill et al., 1999; Mergia et al., 1996; Moebes et al., 1997; Rethwilm, 2007; Roy et al., 2003; Russell and Miller, 1996; Yu et al., 1996c; Yu et al., 1999).

Retrovirale Vektorsysteme bestehen aus zwei Elementen. Das erste ist der eigentliche Vektor, der die *cis*-aktiven Sequenzen beinhaltet. Diese sind notwendig für die Dimerisierung und Verpackung der genomischen RNA, die reverse Transkription, die Integration des Provirus und die Expression des Transgens. Das zweite Element ist eine Verpackungszelllinie, die *in trans* die viralen Proteine Gag, Pol und Env produziert (Heinkelein et al., 2002a; Miller, 1992). In den FV-Systemen werden statt der Verpackungszelllinie einzelne Verpackungsplasmide eingesetzt, da es bisher nicht gelungen ist, eine stabile Verpackungszelllinie für FV zu entwickeln (Mergia and Heinkelein, 2003; Rethwilm, 2007).

FV-Vektoren beinhalten zwei *cis*-aktive Sequenzen (CAS/II), die für einen effektiven Vektortransfer benötigt werden (Erlwein et al., 1998; Heinkelein et al., 1998; Wu et al., 1998). Diese CAS-Elemente befinden sich im 5'-Bereich der (prä)-genomischen RNA und umfassen ein paar hundert Basenpaare des *gag*-Leserahmen sowie den 3'-Bereich des *pol*-Gens (Heinkelein et al., 2002a; Heinkelein et al., 1998; Russell et al., 2001; Trobridge et al., 2002a). Zusammen beträgt die Länge der CAS-Elemente mehr als 2,5 kb. In den CAS sind auch die zwei Sequenzen enthalten, welche für die Pol-Verpackung notwendig sind (Polenkapsidierungssequenzen; PES). PESI befindet sich ca. 28 nt stromaufwärts der PBS, PESII liegt im 3'-Bereich des *pol*-Gens (umfasst ca. 1000 nt). Deletiert man die PES, wird kein Pol-Protein ins FV-Partikel inkorporiert. In dieser Arbeit

wurde untersucht, ob die PESI/II alleine ausreichend für die Pol-Inkorporation sind und ob der zentrale Polypurintrakt (cPPT) einen Einfluss auf die Pol-Verpackung bzw. Vektortransferrate hat. Desweiteren wurden Deletionen der relativ langen CASII (ca. 2 kb) durchgeführt, um die Verpackungskapazität und Sicherheit des bisher vorhandenen PFV-Vektors (pMD9; Heinkelein et al., 2002a) für die Gentherapie zu verbessern.

5.1 Deletionen der CASII-Region und der Einfluss auf den Vektortransfer

Obwohl Erlwein et al., 1998 postulieren, dass nur ca. 700 nt der CASII ausreichend für einen effizienten FV-Vektortransfer sind, enthalten die beiden am häufigsten verwendeten FV-Vektoren pMD9 (Heinkelein et al., 2002a) und p $\Delta\Phi$ (Trobridge et al., 2002a) die gesamte CASII-Region von ca. 2 kb. Eine Deletion der kompletten CASII-Region führt zu einem Verlust der Infektiosität der Partikel, und die RNA-Inkorporation ins Partikel ist um mindesten 80% reduziert (Heinkelein et al., 1998; Peters et al., 2005). Die CASII-Region von PFV kann in zwei Elemente mit unterschiedlichen Funktionen aufgeteilt werden. Das 5'-Element ist wichtig für die RNA-Inkorporation bzw. Stabilität der RNA. Das 3'-Element spielt eine Rolle bei der Pol-Inkorporation (Peters et al., 2005). Auch bei SFV_{mac} wurden zwei *cis*-aktive Sequenzen in der *pol*-Region beobachtet, welche in einem Abstand von 1,5 kb liegen und für einen effizienten Vektortransfer notwendig sind. Allerdings ist ihre genaue Funktion noch nicht geklärt (Park et al., 2002; Peters et al., 2005).

Deletionen des 3'-Bereichs der PFV CASII-Region zeigen keinen Verlust der Pol- und RNA-Inkorporation in den Partikeln, größere Deletionen des 5'-Bereichs als die bereits publizierten (Peters et al., 2005) hingegen resultierten in Partikeln ohne RNA. Deshalb wurde in den Konstrukten pKP32, pKP33 und pKP35 (siehe Abb. 10) der 5'-Bereich der CASII-Region intakt gelassen (die ersten 805 nt), dafür der 3' Bereich weiter verkürzt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bisher publizierte PESII (1003 nt) 3'-seitig ohne den Verlust von Pol- und RNA-Inkorporation weiter auf 370 nt (pKP33) verkürzt werden kann. Die Verkürzung um weitere 110 nt stromaufwärts

(pKP35; siehe Abb. 10) führte dazu, dass kein Pol mehr ins Partikel verpackt wurde und die Verpackung der RNA um ca. 20% reduziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die 370 nt der 3'-CASII essentiell für die Pol-Inkorporation sind. Jedoch zeigten die Vektoren, welche die erwähnten 370 nt (pKP32-33) noch enthielten, im Vergleich zu pMD9 einen Verlust der Infektiosität um 20%.

5.2 PESI und PESII sind nicht ausreichend für die Pol Verpackung

Für gentherapeutische Vektoren ist es erwünscht, dass sie so wenige virale Sequenzen wie möglich enthalten. Aus diesem Grund wurde der Vektor pKP36 kloniert, der lediglich die von Peters et al. (2005) identifizierten PESI und II enthält, welche wichtig für die Pol-Verpackung sind. Außerdem enthält dieser Vektor das 5'-Fragment der CASII (insgesamt ca. 1000 nt), welches für die RNA-Inkorporation ins Partikel notwendig ist (siehe Abb.13). Die Western Blot-Analyse zeigte, dass nach Partikelproduktion mit diesem Vektor kein partikelassoziiertes Pol-Protein detektiert und dadurch auch keine Prozessierung des Gag-Proteins beobachtet werden konnte. Weiterhin fand im Falle von pKP36 auch keine Verpackung der RNA ins Partikel statt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PESI und PESII essentiell aber nicht ausreichend für die Pol-Verpackung und damit für einen stabilen Vektortransfer sind.

Der genaue Mechanismus der Pol-Inkorporation ins FV-Partikel ist noch nicht geklärt. In früheren Arbeiten von Heinkelein et al. (2002b) und Peters et al. (2005), wird ein Model beschrieben, in dem Pol erst mit der RNA interagiert und über diesen Komplex ins FV-Partikel gelangt. Eine neuere Publikation von Lee und Linial (2008), weist dagegen auf die Rolle des Gag-Proteins bei der Pol-Verpackung hin. In der ersten Studie wurde gezeigt, dass ohne RNA kein Pol ins FV-Partikel inkorporiert werden kann (Heinkelein et al., 2002b). Deswegen wurde über die Rolle der RNA als Brückenmolekül zwischen Gag und Pol spekuliert. Die Ergebnisse von Peters et al. (2005) unterstützen diese Vermutung durch die Identifizierung der PESI und PESII.

Ein ähnlicher Mechanismus der Pol-Enkapsidierung wurde bereits bei Hepadnaviren beschrieben. Diese Viren sind hepatotrope DNA-Viren, die gewisse

Ähnlichkeiten zu den Retroviren aufweisen. Während ihres Replikationszyklus kommt es zur reversen Transkription des Genoms, die ähnlich wie bei den FV zu einem späten Zeitpunkt des Replikationszyklus in der Produzentenzelle stattfindet (Nassal, 2008; Nassal and Schaller, 1993, 1996). Durch eine spezifische Interaktion der (prä)-genomischen RNA mit der reversen Transkriptase (P-Protein) gelangen diese beiden Komponenten ins hepadnavirale Kapsid (Junker-Niepmann et al., 1990; Knaus and Nassal, 1993; Pollack and Ganem, 1993). Am 5'-Ende der (prä)-genomischen RNA befindet sich das *cis*-aktive Verpackungssignal ϵ , welches eine Sekundärstruktur in Form von Auswölbung-und-Schleife- (bulge-and-loop) bildet, und an die das P-Protein zusammen mit zellulären Chaperonen (Hsp90) bindet (Beck and Nassal, 2007; Hu and Seeger, 1996; Pollack and Ganem, 1993). Beim Hepatitis B-Virus ist das P-Protein für die Verpackung der genomischen RNA ins Partikel und die Initiation des Zusammenbaus des Kapsid verantwortlich (Nassal, 2008; Nassal and Schaller, 1996). Bei FV hingegen laufen diese beiden Prozesse (Partikel-Zusammenbau und RNA Verpackung) unabhängig vom Pol-Protein ab (Baldwin and Linial, 1998).

Die Rolle der RNA als Brückenmolekül zwischen Gag und Pol (Peters et al., 2005) schließt nicht aus, dass Gag-Pol-Interaktionen notwendig für die RNA-Bindung sind (Lee and Linial, 2008). Lee und Linial, 2008 unterstreichen, dass FV im Gegensatz zu Orthoretroviren keine Cys-His-Motive im Gag-Protein enthalten, welche bei den Orthoretroviren eine wichtige Rolle während der reversen Transkription und RNA-Verpackung, sowie beim Partikel-Aufbau und der Infektiosität spielen (Goff, 2001). Das FV-Gag enthält dafür im C-Terminus Glycin-Argenin-reiche Sequenzen (GR-Boxen), die mehrere Funktionen erfüllen (siehe Einleitung 1.2.4.1). Eine Verkürzung des C-Terminus von Gag durch Einführung von Terminationssignalen kurz vor den GR-Boxen beeinflusst die RNA- und Pol-Verpackung. Diese Mutanten zeichneten sich weiterhin durch eine geringere Pol-Expression aus (Stenbak and Linial, 2004). Präzise Deletionen und Mutationen der GR-Box I hatten zwar keinen Einfluss auf die Pol-Expression, zeigten aber andererseits keine Pol-Verpackung ins Partikel, obwohl RNA im Kapsid nachweisbar ist (Lee and Linial, 2008). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Gag zuerst an Pol bindet und dieser Komplex danach an die RNA gekoppelt wird. Gag würde demnach also als Brückenprotein zwischen RNA und Pol auf dem Weg ins Partikel fungieren. Erstaunlich ist jedoch, dass alle GRI-Mutanten eine

Prozessierung des Gag-Proteins im Partikel-assoziierten Western Blot zeigen. Sowohl das Konstrukt pKP36 aus dieser Arbeit, welches nur die PESI und PESII enthält, als auch das Konstrukt mit der weit deletierten 3' CASII-Sequenz (pKP35) zeigte keine Spaltung des Gag-Proteins im zellulären und partikelassoziierten Western Blot auf. Allerdings wird eine große Menge an Gag- und Pol-Protein exprimiert (siehe Abb. 11 und 14), was durch die getrennte Expression der Viruskomponenten im Vier-Plasmidsystem erklärbar ist, wobei es unter Kontrolle des CMV-Promotors zu einer Überexpression der Proteine im Vergleich zum Wildtypvirus kommt.

Diese Ergebnisse widersprechen also der Hypothese, dass Gag erst an Pol und anschließend an die RNA bindet. Wäre dies der Fall, würde es zur einer Spaltung von Gag kommen, ohne dass RNA vorhanden ist. Eine Spaltung durch zelluläre Proteasen ist auch auszuschließen, da keine Gag Spaltung im Western Blot der Zelllysate z.B. des pKP35 und pKP36 Vektors zusehen war (siehe Abb.14). Womöglich ist die RNA notwendig, um Gag an Pol zu binden oder um den entstehenden Gag-Pol-Komplex zu stabilisieren. Der genaue Mechanismus der Pol-Inkorporation ist somit immer noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielen auch zelluläre Faktoren außer der viralen RNA und dem Gag-Protein in der Verpackung des foamyviralen Pol ins Partikel eine Rolle. Diese sollten in Zukunft noch weiter untersucht werden.

5.3 Die Rolle des cPPT beim Vektortransfer

Lentiviren wie z.B. HIV-1 oder FIV (Whitwam et al., 2001), enthalten zusätzlich zum 3'PPT im Leserahmen der Integrase einen zentralen Polypurintrakt (cPPT) welcher als zweiter Initiationsstart für die (+)DNA-Strang-Synthese dient (Charneau et al., 1992; Hungnes et al., 1992). Mutationen im cPPT haben einen negativen Einfluss auf die Replikation des Virus, was bedeutet, dass er wichtig für eine normale reverse Transkription des viralen Genoms ist (Charneau et al., 1992; Guyader et al., 1987; Hungnes et al., 1992). Mehrere Studien berichten von einer Erhöhung der Vektortransduktionsrate bei Lentiviren durch Einfügen des cPPT vor allem bei HIV-1-RT-Mutanten oder in Zellen mit einer limitierten dNTP-

Konzentration (Arhel et al., 2006; De Rijck et al., 2005; Skasko and Kim, 2008; Van Maele et al., 2003). Der Grund für die Verbesserung ist jedoch umstritten.

In der Mitte des FV-Genoms befinden sich vier Motive mit purinreichen Sequenzen (Kupiec et al., 1988; Peters et al., 2008). Das letzte dieser purinreichen Motive ist der oben beschriebene cPPT und absolut identisch mit dem 3'-Polypurintrakt in der FV-RNA (siehe Abb. 30). Diese Sequenz-Übereinstimmung ist in allen bekannten und sequenzierten FV-Spezies streng konserviert, was die Rolle dieses Motivs weiter unterstreicht (Peters et al., 2008). FV-Vektoren, in denen der cPPT mutiert ist, zeigen keine signifikante Unterschiede in der Gag und Pol Verpackung im Vergleich zum Wildtypvirus, allerdings ist ihre Infektiosität um einiges niedriger als die des unmutierten Virus (Peters et al., 2008).

Da in den Konstrukten pKP32 und pKP33 der cPPT deletiert wurde und diese Konstrukte eine niedrigere Transduktionseffizienz als der Kontrollvektor pMD9 aufwiesen (Reduktion um ca. 20%), wurde im Vektor pTW01 das cPPT Element eingefügt, um zu testen ob dieses Vorgehen zu einer Erhöhung der Infektiosität führte. Die Vektoren pTW02, pTW03 und pTW04 enthielten Oligonukleotide mit unterschiedlichen Mutationen dieser cPPT-Sequenz. pTW01 zeigte eine Transduktionseffizienz, die vergleichbar mit der des Kontrollvektors pMD9 war. Im Gegensatz dazu war die Infektiosität der Vektoren pTW02, pTW03 und pTW04 niedriger als die von dem Ausgangsvektor pKP33, was auf die Rolle des cPPT bei der Erhöhung des Vektortransfers hinweist (siehe Abb. 20). pTW02, pTW03 und pTW04 zeigten im Vergleich mit dem pKP33-Vektor sogar eine Reduktion der RNA- und Pol-Inkorporation (siehe Abb. 18-20).

FV-Vektoren besitzen die Eigenschaft, sich selten teilende Zellen wie z.B. hämatopoetische Stammzellen (HSZ) zu infizieren (Gharwan et al., 2007; Kiem et al., 2007; Rethwilm, 2007; Wiktorowicz et al., 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Vektor pTW01 die Fähigkeit besitzt, MSC mit hoher Effizienz von ca. 50% zu transduzieren (siehe Abb. 21). Vielleicht ermöglicht der cPPT den Eintritt des FV-Genoms in die Wirts-DNA dieser Zellen (Peters et al., 2008). Für lentivirale Vektoren wurde gezeigt, dass das Einfügen des cPPT zur Erhöhung des Titers führt (Follenzi et al., 2000). Park and Kay (2001) zeigten in *in vivo*-Versuchen an ruhenden Hepatozyten, dass bei Anwesenheit des cPPT im HIV-1 basierten Vektor die Replikation des Virus unabhängig vom Zellzyklus war und somit die Transduktion von ruhenden Zellen durch lentivirale Vektoren

erleichterte. Der Mechanismus dieser Titererhöhung ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings ist für FV-Vektoren die Anwesenheit des cPPT-Elements notwendig, um eine volle Funktionalität des FV-Vektors zu gewährleisten.

5.4 Verbesserter FV Vektor im Vergleich zu pMD9

In der Abb. 29 und 30 ist der verkürzte FV Vektor pTW01 dargestellt. Der Aufbau des pTW01 Vektors ist wie folgt:

1. Die gesamte 645 nt lange CASI Region (Heinkelein et al., 1998; Peters et al., 2005), welche die für die Pol-Inkorporation (PESI) und RNA-Verpackung wichtige Elemente enthält.
2. Ein ca. 800nt langes Fragment der 5'-CASII-Sequenz, welches ebenfalls wichtig für die RNA-Inkorporation ins FV-Partikel ist (Peters et al., 2005).
3. Darauf folgt die gekürzte PESII, ca. 350 nt, die essentiell für die Pol-Verpackung ist.
4. Am Ende folgen die 9 nt des cPPT, die zusammen mit den anderen Elementen eine mit dem pMD9 Vektor vergleichbare Infektiosität der Vektorpartikel ermöglichen (Wiktorowicz et al., 2009).

Im Gegensatz zu pMD9 beinhaltet pTW01 ca. 850 nt weniger an viraler genetischen Informationen, was zur Erhöhung der Verpackungskapazität und Sicherheit des Vektors beiträgt und trotzdem keinen Einfluss auf die Funktionalität des Vektorstransfers hat. Eine weitere Eingrenzung der CASI-Region könnte zur Entwicklung eines noch weiter fortgeschrittenen Vektors führen.

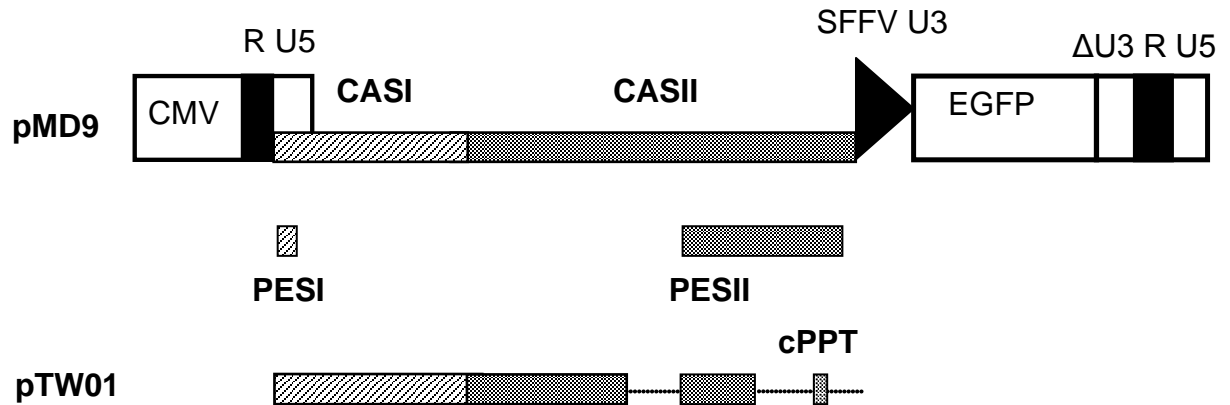


Abb. 29: Vektor pTW01 im Vergleich mit dem Vektor pMD9

CMV – Cytomegalievirus Promotor/Enhancer; CASI/CASII - cis-aktive Sequenz I/II; SFFV U3- U3-Region des Spleen Focus Forming Virus; EGFP - Enhanced Green Fluorescent Protein; PESI/PESII - Polymerase-Enkapsidierungssequenz I/II.

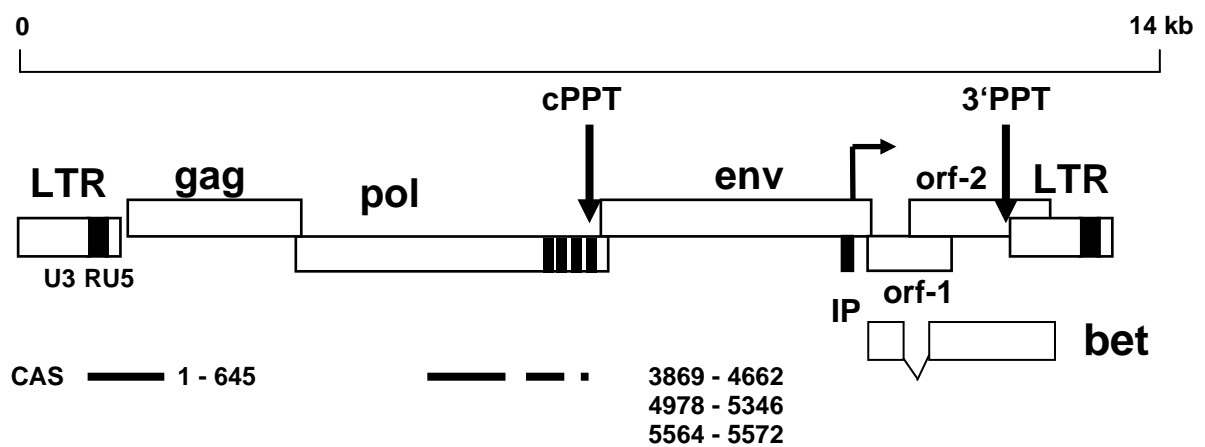


Abb. 30: PFV-Genom mit eingezeichneten Regionen die in pTW01 enthalten und für den Vektortransfer notwendig sind.

LTR - long terminal repeat; U3, R, U5 - Teile der LTR; gag - Leserahmen für das gag Gen; pol - Leserahmen für das pol Gen; env - Leserahmen für das env Gen; cPPT - zentraler Polypurintrakt; IP - interner Promoter; orf-1 - open reading frame - 1; orf-2 - open reading frame-2; 3' PPT - 3' Polypurintrakt; bet - Leserahmen für das Bet Protein; CAS - cis-aktive Sequenz.

5.5 Verpackung des Genoms verwandter Foamyviren (PFV und SFV_{mac})

Wie schon Gärtner et al. (2009) zeigen konnten, ist es möglich, das Genom verwandter Foamyvirus-Spezies mit den jeweils heterologen Proteinen zu verpacken (Crosspackaging). Dies bedeutet zum Beispiel, dass das Genom des Prototypischen Foamyvirus (PFV) mit Verpackungsplasmiden des Simian Foamyvirus eines Rhesusmakaken (SFV_{mac}) infektiöse Partikel bildet. Diese heterologen Viruspartikel aus PFV-Genom und SFV_{mac}-Proteinen sind imstande, humane Zielzellen (HT1080 und HeLa) zu infizieren.

5.5.1 Verpackung der deletierten PFV CASII Vektoren durch SFV_{mac} Proteine

In dieser Arbeit wurde getestet, ob die SFV_{mac}-Proteine auch in der Lage sind, die Vektoren pKP32, pKP33, pKP35, pKP36, pTW01, pTW02, pTW03 und pTW04 zu verpacken und infektiöse Partikel zu bilden. Wie die Ergebnisse in 3.2 zeigen, ist solch ein Crosspackaging möglich. Die Transduktionseffizienz dieser heterologen Viruspartikel ist um ca. das 10-fache niedriger als bei den homologen PFV-Proteinen (siehe Tab. 4.). Die Unterschiede in der Transduktionseffizienz zwischen den verschiedenen pKP und pTW Vektoren in den heterologen Partikeln sind nicht so markant wie bei der Verpackung mit den homologen PFV-Proteinen. Aber auch hier zeigte der Vektor pTW01 im Vergleich zu den anderen Konstrukten die beste Transduktionseffizienz (5,6%). Im Unterschied zur Verpackung mit PFV-Proteinen (pMD9: 84,9%; pTW01: 87,7%) zeigte pTW01 mit SFV_{mac}-Proteinen jedoch nicht die gleiche Transduktionseffizienz wie pMD9 (8,4%).

Die niedrige Transduktionseffizienz der pKP- und pTW-Vektoren bei Verpackung mit SFV_{mac} Proteinen liegt wahrscheinlich an Sequenzunterschiede zwischen den beiden Foamyviren. PFV ist ein Foamyvirusisolat des Schimpansen, SFV_{mac} stammt dagegen aus einem Rhesusmakaken. Obwohl Sequenzanalysen ergeben haben, dass beide Foamyviren eine relativ hohe Verwandtschaft aufweisen

(Sequenzhomologie auf DNA-Ebene zwischen 50% und 80%; Herchenröder et al. (1994) könnte es sein, dass die Sequenzen, welche für den Vektortransfer notwendig sind, doch zu viele Unterschiede beinhalten. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die heterologe RNA zwar ordnungsgemäß verpackt wird aber aus ungeklärten Gründen nicht funktionsfähig ist. Somit würde kein infektiöses Virus entstehen. In dem hier gezeigten Versuch wurde nur die Transduktionsrate der Viren auf Zielzellen gemessen, damit wurden die nicht funktionsfähigen Viruschimären allerdings nicht erfasst. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse, dass eine geringgradige heterologe Verpackung der PFV Vektoren mit SFV_{mac} Proteinen möglich ist.

Heterologe Verpackung von genomischer RNA wurde bereits für andere Retroviren beschrieben (Browning et al., 2001; Strappe et al., 2005). HIV-1-Proteine sind in der Lage, HIV-2-RNA zu verpacken (Kaye and Lever, 1998). Die Transduktionseffizienz ist, wie im Falle der Foamyviren, niedriger als mit den homologen Proteinen. Diese Fähigkeit zur heterologen Verpackung ist jedoch nicht beidseitig, da HIV-2-Proteine keine HIV-1-RNA inkorporieren können (Kaye and Lever, 1998). Der Einbau von HIV-1-RNA ins Partikel ist auch sowohl durch SIV-, als auch FIV-Gag-Pol-Proteine möglich (Browning et al., 2001; Rizvi and Panganiban, 1993; Strappe et al., 2005). Solch eine virusartfremde Verpackung wurde auch für SNV (Spleen Necrosis Virus) beschrieben, welches MLV-RNA inkorporieren kann (Certo et al., 1998). In allen diesen Fällen zeigten diese heterologen Viren jedoch einen sehr niedrigen Vektortransfer (Strappe et al., 2005).

5.5.2 Verpackung eines fremden Genoms ist äußerst selten

Nachdem gezeigt worden ist, dass SFV_{mac}-Proteine imstande sind, PFV-Vektoren zu verpacken, wurde getestet, ob es eine Bevorzugung einer der beiden RNAs bei der Partikelbildung gibt, wenn zwei verschiedene genomische RNAs in der Zelle vorhanden sind. Obwohl in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass SFV_{mac}-Proteine PFV-RNA verpacken und PFV-Proteine den SFV_{mac}-Vektor inkorporieren (Gärtner et al., 2009), konnte in dieser Arbeit in der Anwesenheit von beiden

Vektoren (PFV und SFV_{mac}) keine Verpackung des SFV_{mac}-Vektors durch PFV-Proteine (Transduktionseffizienz unter 1%) nachgewiesen werden (siehe Abb. 24 und 25). Es fand nur eine homologe Verpackung der Vektoren (PFV-Vektor durch PFV-Proteine) in Anwesenheit beider Genome (PFV- und SFV_{mac}) statt.

Der PFV-Vektor pTW06 zeigte im Vergleich zur Rate der homologen Verpackung (65,1%) eine Senkung der Transduktionrate um ca. ein Drittel auf 43,1%. Diese Senkung der Transduktionsrate wurde für den Vektor pTW05 nicht, beobachtet. pTW05 zeigte in beiden Fällen, also in Anwesenheit von homologen oder heterologen Proteinen, eine konstante Transduktionseffizienz von ca. 65%. Interessant waren die Ergebnisse der Verpackung der PFV- und SFV_{mac}-Vektoren durch die SFV_{mac}-Proteine. Bei homologer Verpackung zeigte der SFV_{mac}-Vektor eine Transduktionsrate von 67%. Wurden jedoch PFV- und SFV_{mac}-Vektoren koverpackt, fiel die Transduktionsrate der homologen SFV_{mac}-Partikel auf 13,2% bei Anwesenheit des pTW06 Vektors bzw. um ein 10-faches auf 6,83% (pTW05). Die Transduktionsraten der PFV-Vektoren im Falle einer Verpackung mit SFV_{mac}-Proteinen und Anwesenheit des SFV_{mac} Vektors betrug nur 1-2%.

Die oben beschriebenen Ergebnisse sind durch Infektion von HT1080-Zielzellen ermittelt worden. Der gleiche Versuch wurde auch auf HeLa-Zellen durchgeführt, wobei gleiche Verhältnisse der Transduktionseffizienz der verschiedenen Vektorkombinationen erzielt wurden. Die Transduktionrate von HeLa-Zielzellen viel im Allgemeinen jedoch niedriger aus als auf HT1080 (siehe Abb. 25).

Die Untersuchung der Doppelverpackung ist von Bedeutung, da es während der Reversen Transkription bei einer Koverpackung zweier unterschiedlicher Virusgenome zur Rekombination und so zur Bildung eines rekombinanten Virus kommen kann. Experimente mit HIV haben gezeigt, dass HIV-1- und HIV-2-RNA gemeinsam in ein virales Partikel verpackt werden konnten (Kaye and Lever, 1998). Rekombination zwischen den beiden Genomen findet zu ca. 1,4% statt, wenn eine Zelle mit beiden Viren infiziert ist. Allerdings sind die meisten heterologen Viren replikationsinkompetent (Motomura et al., 2008). Phylogenetische Studien des Simianen Immunodefizienzvirus haben jedoch gezeigt, dass solche seltenen Rekombination in der Vergangenheit stattgefunden haben (Bailes et al., 2003).

Da die Sequenzhomologie auf Nukleinsäureebene zwischen dem Prototypischen Foamyvirus und dem Rhesusmakaken Foamyvirus 50-80% beträgt (Herchenröder

et al., 1994) und somit höher ist als für HIV-1 und HIV-2 (45-50%) (Motomura et al., 2008), erhöht sich das Risiko einer Rekombination.

Die Ergebnisse der Doppelverpackung zeigen aber, dass die Transduktionseffizienz in Anwesenheit zweier heterologer Genome viel niedriger ausfällt als im Falle einer Einzelverpackung. Diese niedrige Transduktionsrate, verringert die Möglichkeit der Rekombination zwischen den zwei heterologen Viren. Der Grund für diesen niedrigen Vektortransfer bei der Doppelverpackung könnte daran liegen, dass vorwiegend nicht-infektiöse genomische RNA verpackt wird oder, dass es zwischen den beiden unterschiedlichen RNAs zu Interaktionen kommt, die die Verpackung ins Partikel erschweren oder sogar verhindern. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass beide RNAs ins Partikel verpackt werden, dadurch jedoch die reverse Transkription oder die Integration ins Wirtsgenom blockiert wird und die Viren dadurch nicht replizieren können.

Studien an SIV und HIV-2 zeigten, dass die SIV- bzw. HIV-2-Proteine genauso viel homologe wie heterologe RNA (z.B. HIV-1) verpacken, der Vektortransfer aber sehr gering ist (Strappe et al., 2005).

Im Doppelverpackungsversuch von PFV und SFV_{mac} wurde die Infektiosität nur mittels FACS analysiert. Es wäre interessant zu überprüfen, ob die gleiche Menge homologer und heterologer RNA in die Partikel verpackt wird. Die FACS-Analyse misst nur den tatsächlichen Vektortransfer, das heißt, es werden nur die replikationsfähigen Viren erfasst. Sie gibt keine Antwort darauf, ob eine Doppelverpackung zwischen PFV und SFV_{mac} ein seltenes Ereignis ist oder nur eine geringe Anzahl der entstanden Viren replikationsfähig ist.

5.6 Studien zur Produktion foamyviraler Partikel in Hefezellen

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Replikation verschiedener Viren in Hefen als eukaryotischem Wirt stattfinden kann. Zum Beispiel zeigte sich nach Transfektion von Hefezellen mit genomischer RNA des Flock House Virus die wiederholte Replikation und Transkription des viralen Genoms. Ähnliches wurde für das Bromo Mosaik Virus und das Humane (HPV) und Bovine (BPV) Papillomavirus beobachtet (Angeletti, 2005; Janda and Ahlquist, 1993; Price et al., 1996). Das Vesiculare Stomatitis Virus (VSV) ist in der Lage Hefesphäroplasten (Hefezellen die keine Zellwand besitzen) zu infizieren. Das bedeutet, Adsorption und Penetration, frühe Stadien des viralen Replikationszyklus, können in Hefezellen stattfinden (Makarow, 1985; Makarow et al., 1987). Der Ablauf späterer Stadien des viralen Replikationszyklus in Hefen wurde z.B. für das Hepatitis B Virus oder das Bromo Mosaik Virus beschrieben. Exprimiert man deren Strukturproteine, führt dies zur Bildung viraler Partikel (Krol et al., 1999; Valenzuela et al., 1982). Auch retrovirale Proteine können in Hefen gebildet werden. Eine neuere Studie zeigt, dass nach Expression des HIV-1 Gag-Proteins in Hefen VLPs von der Zellmembran der Hefesphäroplasten knospen (Sakuragi et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde die Expression foamyviraler Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei foamyviralen Proteine (Gag, Pol und Env) individuell in Hefen exprimiert werden (siehe Abb. 26-28). Die zwei Hefevektoren, pESC und pKT10 zeigten eine unterschiedlich starke Expression der foamyviralen Proteine. Im Falle von Gag wurde mit dem pESC Vektor im Vergleich zu dem pKT10 nur eine sehr geringe Expression detektiert (Abb. 26), während Pol und Env gar nicht im Western Blot nachgewiesen werden konnten. Die unterschiedlich starke Expression in den beiden Vektoren ist vermutlich auf die Stärke der Promotoren (GAP und *GAL1*) zurückzuführen.

Die Möglichkeit der Bildung foamyviraler Partikel in Hefen ist ein interessanter Aspekt bei der Produktion solcher Vektoren im großen Maßstab. Eine Produktion in Hefen- also in einer flüssig Kultur verläuft schneller und kostengünstiger als die zurzeit verwendete Vektorvirusproduktion, bei welcher Säugerzellen transient transfiziert werden müssen. Dies stellt einen breiten Anwendungsbereich in der

Gentherapie dar, da diese meistens eine große Menge und eine hohe Konzentration von Vektorviren benötigt.

Eine Produktion von Vektorviren in Hefezellen setzt voraus, dass alle wichtigen zellulären Faktoren vorhanden sind, die für diesen Prozess in der Wirtszelle notwendig sind. Es ist noch wenig darüber bekannt, ob Hefen diese Faktoren enthalten. Insektenzellen z.B. fehlen Faktoren, die den Zusammenbau infektiöser retroviraler Partikel unterstützen (Nermut et al., 2003). Ein großer Nachteil bei der Expression retroviraler Vektorviren in Hefen ist das Vorhandensein einer Zellwand, die das Abschnüren der umhüllten Viren (z.B. FV) von der Zellmembran verhindert. Abe et al., 1998, konnten jedoch zeigen, dass eine Produktion nicht infektiöser MLV-Partikel ohne Hülle in Hefen möglich ist. Die „nackten“ Viruspartikel wurden anschließend aus den Hefezellen isoliert und in einem *in vitro* verfahren mit einer VSV-G Hülle ausgestattet.

Ob ein ähnliches *in vitro*-Verfahren auch mit dem foamyviralen Hüllprotein möglich ist und eine Produktion von „nackten“ Foamyviren stattfindet, muss erst noch gezeigt werden.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass foamyvirale Proteine in Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden, sollte als nächstes die Bildung viraler Partikel untersucht werden. Mittels Immunofluoreszenz oder Elektronmikroskopie kann man untersuchen ob FV Partikel in Hefen zusammengebaut werden. Eine Expression der viralen Proteine in Hefen ermöglicht ebenfalls biochemische Studien, wie z.B. die Suche nach Interaktionspartnern der viralen Proteine und eukaryotischen zellulären Faktoren oder Studien einzelner Stadien des foamyviralen Replikationszyklus. Da zwischen den unterschiedlichen, molekularbiologisch gut charakterisierten Hefestämmen eine große zelluläre Diversität vorhanden ist bieten z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Yarrowia lipolytica* ein breites Spektrum von Untersuchungsmöglichkeiten an.

Ein großer Nachteil von Hefen stellt die Zellwand dar, welche das Knospen der Vektorviren verhindert. Die Herstellung von Hefen ohne Zellwand ist zwar möglich (Sphäroplasten oder Protoplasten) benötigt aber aufwendige technische Protokolle. Trotzdem sollte man das Potential einer der einfachsten eukaryotischen Zelle nutzen, um kostengünstiger die Massenproduktion der so wertvollen gentherapeutischen Vektorviren zu versuchen.

5.7 Vorteile von FV in der Gentherapie

Foamyviren weisen viele positive Eigenschaften auf (siehe Tab.7.), die vom großen Interesse für den Einsatz foamyviraler Vektoren in der Gentherapie sind. Dazu zählt unter anderen die Apathogenität der Foamyviren, aber auch ihr Integrationsverhalten. Foamyviren können jeden Zelltyp infizieren und ihre Verpackungskapazität ist sehr hoch (Heinkelein et al., 2002a; Trobridge et al., 2002a). Deshalb stellen foamyvirale Vektoren eine echte Alternative zu den gammoretroviralen und lenitviralen Vektorsystemen da, die zurzeit hauptsächlich in Gentherapiestudien verwendet werden. In dieser Arbeit wurde ein neuer verbesserter foamyviraler Vektor hergestellt und charakterisiert. Untersucht wurde auch, welche Teile der relativ großen cis-aktiven Sequenz II aus dem bis jetzt vorhandenen Vektor pMD9, ohne den Verlust der Pol und RNA Verpackung wie auch der Transduktionseffizienz dieser Vektoren deletiert werden können. In Hinsicht darauf wurde ein Vektor (pKP36) konstruiert, welcher nur die früher identifizierten Sequenzen enthält, welche notwendig für die Pol Inkorporation (PES) sind (Peters et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass diese nicht ausreichend sind, um einen effizienten Foamyvirusvektortransfer zu gewährleisten (siehe 4.1.3-4.1.4).

Desweiteren wurde der Einfluss des cPPT-Elements auf die Transduktionseffizienz der foamyviralen Vektoren getestet. Es konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Anwesenheit des cPPT und der Infektiosität der foamyviralen Vektoren gezeigt werden (siehe 4.1.4-4.1.6).

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die heterologe Verpackung zwischen zwei verwandten Foamyviren möglich ist, wenn die beiden Vektoren zusammen mit Verpackungsplasmiden in einer Produzentenzelle exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine heterologe Verpackung stattfindet, die Transduktionsrate aber sehr gering ausfällt (siehe 4.2). Dieses Ergebnis trägt zur Sicherheit foamyviraler Vektoren bei (siehe Abb. 24-25).

Tab. 7. Eigenschaften der foamyviralen Vektoren, welche einen Einsatz in der Gentherapie ermöglichen, modifiziert nach (Rethwilm, 2007)

<ul style="list-style-type: none"> • Apathogenität
<ul style="list-style-type: none"> • Stabiles DNA Genom
<ul style="list-style-type: none"> • Sehr breiter Zelltropismus (Lindemann and Goepfert, 2003)
<ul style="list-style-type: none"> • Genetische Stabilität, höher als bei Gammaretroviren • Foamyviren sind die ältesten exogene Retroviren (ca. 60 mln Jahre) (Switzer et al., 2005; Thümer et al., 2007)
<ul style="list-style-type: none"> • Integrationsmuster- Keine Bevorzugung: nah an Promoter oder in Gene (Nowrouzi et al., 2006; Trobridge et al., 2006)
<ul style="list-style-type: none"> • Wahrscheinlichkeit der Aktivierung anliegenden Gene ist sehr gering (Hendrie et al., 2008)
<ul style="list-style-type: none"> • sie sind vom SIN Typ (self-inactivating type) (Heinkelein et al., 2002a; Trobridge et al., 2002a)
<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Vektorkapazität (> 9 kb) (Heinkelein et al., 2002a; Trobridge et al., 2002a)
<ul style="list-style-type: none"> • Weisen kein Transgen silencing in Langzeitanwendung auf (Bauer et al., 2008; Josephson et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2001; Vassilopoulos et al., 2003)
<ul style="list-style-type: none"> • Keine Übertragung von Mensch zu Mensch • Keine Immunantwort beim Menschen da Simianer Abstammung (Boneva et al., 2007; Herchenröder et al., 1994)
<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Transduktion von Humanen Stammzellen • eine niedrigere Menge an foamyviralen Vektoren ist erforderlich im Vergleich zu Orthoretroviren (Trobridge and Russell, 2004)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Tiermodelle sind vorhanden (Bauer et al., 2008; Kiem et al., 2007; Si et al., 2008)
<ul style="list-style-type: none"> • Titeranreicherung ohne Infektiositätsverlust ist möglich (Hill et al., 1999; Trobridge et al., 2002b)
<ul style="list-style-type: none"> • Niedrige Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines replikationskompetenten Virus

Der in dieser Arbeit hergestellte Vektor pTW01, bedarf noch weiteren Optimierungen wie z.B. ein Versuch der Verkürzung der CASI Region, trotzdem zeigen die in Tab. 7. zusammengefassten Eigenschaften, dass foamyvirale Vektoren hervorragend geeignet sind, um z.B. HSZ zu transduzieren. Aus diesem Grund werden foamyvirale Vektoren in mehreren *in vivo* Studien eingesetzt wie z.B. in der Fanconi Anämie, der Rheumatoiden Arthritis, CD18-Defizienz, CGD, ADA-SCID und β -Thalassämie (Rethwilm, 2007; Vassilopoulos and Rethwilm, 2008). Die Optimierung der bestehenden Vektoren und Entwicklung neuer foamyviraler Vektoren, bietet neue Möglichkeiten für den Einsatz dieser in mehreren genetischen Erkrankungen und öffnet den Weg für die klinischen Studien.

5.8 Aussichten

Der in dieser Arbeit hergestellte Vektor pTW01, wurde wegen seiner vergrößerten Verpackungskapazität ausgewählt, um das längste Fanconi Anämie Gen - BRCA2 (10,3 kb) zu exprimieren. Die Klonierungsarbeiten wurden abgeschlossen und erste *in vitro* Versuche zeigen eine Expression des BRCA2 Gens nach Transduktion von Patienten-Fibroblasten. Weitere *in vitro* und *in vivo* Analysen mit diesem FV Vektor sind geplant.

6 Literaturverzeichnis

- Achong, B.G., Mansell, P.W., and Epstein, M.A. (1971a). A new human virus in cultures from a nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 103, P18.
- Achong, B.G., Mansell, P.W., Epstein, M.A., and Clifford, P. (1971b). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 46, 299-307.
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., *et al.* (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.
- Ali, M., Taylor, G.P., Pitman, R.J., Parker, D., Rethwilm, A., Cheingsong-Popov, R., Weber, J.N., Bieniasz, P.D., Bradley, J., and McClure, M.O. (1996). No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12, 1473-1483.
- Anderson, D.C., Schmalsteig, F.C., Finegold, M.J., Hughes, B.J., Rothlein, R., Miller, L.J., Kohl, S., Tosi, M.F., Jacobs, R.L., Waldrop, T.C., *et al.* (1985). The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 152, 668-689.
- Anderson, W.F. (1984). Prospects for human gene therapy. *Science* 226, 401-409.
- Angeletti, P.C. (2005). Replication and encapsidation of papillomaviruses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Med* 119, 247-260.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., and Charneau, P. (2006). Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultrastructural resolution levels. *Retrovirology* 3, 38.
- Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P.A., Hahn, B.H., and Sharp, P.M. (2003). Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300, 1713.
- Baldwin, D.N., and Linial, M.L. (1998). The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus. *J Virol* 72, 3658-3665.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Banks, J.D., Yeo, A., Green, K., Cepeda, F., and Linial, M.L. (1998). A minimal avian retroviral packaging sequence has a complex structure. *J Virol* 72, 6190-6194.

Bannert, H., Muranyi, W., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., and Flugel, R.M. (2004). Coactivators p300 and PCAF physically and functionally interact with the foamy viral trans-activator. *BMC Mol Biol* 5, 16.

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

Bauer, T.R., Jr., Allen, J.M., Hai, M., Tuschong, L.M., Khan, I.F., Olson, E.M., Adler, R.L., Burkholder, T.H., Gu, Y.C., Russell, D.W., *et al.* (2008). Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nat Med* 14, 93-97.

Bauer, T.R., Jr., Gu, Y.C., Creevy, K.E., Tuschong, L.M., Embree, L., Holland, S.M., Sokolic, R.A., and Hickstein, D.D. (2004). Leukocyte adhesion deficiency in children and Irish setter dogs. *Pediatr Res* 55, 363-367.

Bauer, T.R., Jr., Hai, M., Tuschong, L.M., Burkholder, T.H., Gu, Y.C., Sokolic, R.A., Ferguson, C., Dunbar, C.E., and Hickstein, D.D. (2006). Correction of the disease phenotype in canine leukocyte adhesion deficiency using ex vivo hematopoietic stem cell gene therapy. *Blood* 108, 3313-3320.

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

Berkowitz, R., Fisher, J., and Goff, S.P. (1996). RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 177-218.

Bieniasz, P.D. (2004). Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 5, 1109-1115.

Bieniasz, P.D., Rethwilm, A., Pitman, R., Daniel, M.D., Chrystie, I., and McClure, M.O. (1995). A comparative study of higher primate foamy viruses, including a new virus from a gorilla. *Virology* 207, 217-228.

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

Bodem, J., Kang, Y., and Flugel, R.M. (2004). Comparative functional characterization of the feline foamy virus transactivator reveals its species specificity. *Virology* 318, 32-36.

Bodem, J., Krausslich, H.G., and Rethwilm, A. (2007). Acetylation of the foamy virus transactivator Tas by PCAF augments promoter-binding affinity and virus transcription. *J Gen Virol* 88, 259-263.

Bodem, J., Lochelt, M., Winkler, I., Flower, R.P., Delius, H., and Flugel, R.M. (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, 9024-9027.

Boneva, R.S., Grindon, A.J., Orton, S.L., Switzer, W.M., Shanmugam, V., Hussain, A.I., Bhullar, V.B., Chamberland, M.E., Heneine, W., Folks, T.M., *et al.* (2002). Simian foamy virus infection in a blood donor. *Transfusion* 42, 886-891.

Boneva, R.S., Switzer, W.M., Spira, T.J., Bhullar, V.B., Shanmugam, V., Cong, M.E., Lam, L., Heneine, W., Folks, T.M., and Chapman, L.E. (2007). Clinical and virological characterization of persistent human infection with simian foamy viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23, 1330-1337.

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.

Boyer, P.L., Stenbak, C.R., Clark, P.K., Linial, M.L., and Hughes, S.H. (2004). Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase. *J Virol* 78, 6112-6121.

Boyer, P.L., Stenbak, C.R., Hoberman, D., Linial, M.L., and Hughes, S.H. (2007). In vitro fidelity of the prototype primate foamy virus (PFV) RT compared to HIV-1 RT. *Virology* 367, 253-264.

Browning, M.T., Schmidt, R.D., Lew, K.A., and Rizvi, T.A. (2001). Primate and feline lentivirus vector RNA packaging and propagation by heterologous lentivirus virions. *J Virol* 75, 5129-5140.

Buscher, M., Reiser, W., Will, H., and Schaller, H. (1985). Transcripts and the putative RNA pregenome of duck hepatitis B virus: implications for reverse transcription. *Cell* 40, 717-724.

Cain, D., Erlwein, O., Grigg, A., Russell, R.A., and McClure, M.O. (2001). Palindromic sequence plays a critical role in human foamy virus dimerization. *J Virol* 75, 3731-3739.

Callahan, M.E., Switzer, W.M., Matthews, A.L., Roberts, B.D., Heneine, W., Folks, T.M., and Sandstrom, P.A. (1999). Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact orf-2 accessory gene. *J Virol* 73, 9619-9624.

Cartellieri, M., Herchenroder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2005a). N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *J Virol* 79, 12464-12476.

Cartellieri, M., Rudolph, W., Herchenroder, O., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2005b). Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology* 2, 44.

Cassani, B., Mirolo, M., Cattaneo, F., Benninghoff, U., Hershfield, M., Carlucci, F., Tabucchi, A., Bordignon, C., Roncarolo, M.G., and Aiuti, A. (2008). Altered intracellular and extracellular signaling leads to impaired T-cell functions in ADA-SCID patients. *Blood* 111, 4209-4219.

- Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2007). Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest* 117, 1456-1465.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., Yates, F., de Villartay, J.P., Le Deist, F., and Fischer, A. (2001). Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J Gene Med* 3, 201-206.
- Certo, J.L., Shook, B.F., Yin, P.D., Snider, J.T., and Hu, W.S. (1998). Nonreciprocal pseudotyping: murine leukemia virus proteins cannot efficiently package spleen necrosis virus-based vector RNA. *J Virol* 72, 5408-5413.
- Charneau, P., Alizon, M., and Clavel, F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 66, 2814-2820.
- Conley, M.E. (1991). X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 61, S94-99.
- Conley, M.E., Buckley, R.H., Hong, R., Guerra-Hanson, C., Roifman, C.M., Brochstein, J.A., Pahwa, S., and Puck, J.M. (1990). X-linked severe combined immunodeficiency. Diagnosis in males with sporadic severe combined immunodeficiency and clarification of clinical findings. *J Clin Invest* 85, 1548-1554.
- Cotrim, A.P., and Baum, B.J. (2008). Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol* 36, 97-103.
- Cullen, B.R. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-692.
- Culver, K., Cornetta, K., Morgan, R., Morecki, S., Aebersold, P., Kasid, A., Lotze, M., Rosenberg, S.A., Anderson, W.F., and Blaese, R.M. (1991). Lymphocytes as cellular vehicles for gene therapy in mouse and man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3155-3159.
- De Rijck, J., Van Maele, B., and Debyser, Z. (2005). Positional effects of the central DNA flap in HIV-1-derived lentiviral vectors. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 987-994.
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J.P., and Schwartz, O. (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* 80, 605-614.
- Delelis, O., Lehmann-Che, J., and Saib, A. (2004). Foamy viruses--a world apart. *Curr Opin Microbiol* 7, 400-406.

- Duda, A., Stange, A., Luftenegger, D., Stanke, N., Westphal, D., Pietschmann, T., Eastman, S.W., Linial, M.L., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2004). Prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity. *J Virol* 78, 13865-13870.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med* 9, 833-842.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., and Edelstein, R.M. (2004). Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* 6, 597-602.
- Eglitis, M.A., and Anderson, W.F. (1988). Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells. *Biotechniques* 6, 608-614.
- Enders, J.F., and Peebles, T.C. (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 86, 277-286.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., and Rethwilm, A. (1997). Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* 71, 7312-7317.
- Enssle, J., Jordan, I., Mauer, B., and Rethwilm, A. (1996). Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4137-4141.
- Erlwein, O., Bieniasz, P.D., and McClure, M.O. (1998). Sequences in pol are required for transfer of human foamy virus-based vectors. *J Virol* 72, 5510-5516.
- Erlwein, O., and Rethwilm, A. (1993). BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology* 196, 256-268.
- Falcone, V., Leupold, J., Clotten, J., Urbanyi, E., Herchenroder, O., Spatz, W., Volk, B., Bohm, N., Toniolo, A., Neumann-Haefelin, D., *et al.* (1999). Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa. *Virology* 257, 7-14.
- Falcone, V., Schweizer, M., and Neumann-Haefelin, D. (2003). Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 161-180.
- Feldman, M.D., Dunnick, N.R., Barry, D.W., and Parkman, P.D. (1975). Isolation of foamy virus from rhesus, African green and cynomolgus monkey Leukocytes. *J Med Primatol* 4, 287-295.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Muller, J.G., and Rethwilm, A. (1998). Foamy virus particle formation. *J Virol* 72, 1610-1615.

- Flügel, R.M., and Pfrepper, K.I. (2003). Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 63-88.
- Follenzi, A., Ailles, L.E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25, 217-222.
- Friedenstein, A.J., Latzinik, N.W., Grosheva, A.G., and Gorskaya, U.F. (1982). Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 10, 217-227.
- Friel, J., Stocking, C., Stacey, A., and Ostertag, W. (1987). A temperature-sensitive mutant of the myeloproliferative sarcoma virus, altered by a point mutation in the mos oncogene, has been modified as a selectable retroviral vector. *J Virol* 61, 889-897.
- Gallo, R.C. (1981). Growth of human normal and leukemic T cells: T-cell growth factor (TCGF) and the isolation of a new class of RNA tumor viruses (HTLV). *Blood Cells* 7, 313-329.
- Garrett, E.D., He, F., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (1993). Transcriptional trans activators of human and simian foamy viruses contain a small, highly conserved activation domain. *J Virol* 67, 6824-6827.
- Gärtner, K., Wiktorowicz, T., Park, J., Mergia, A., Rethwilm, A., and Scheller, C. (2009). Accuracy estimation of foamy virus genome copying. *Retrovirology* 6, 32.
- Gaspar, H.B., and Thrasher, A.J. (2005). Gene therapy for severe combined immunodeficiencies. *Expert Opin Biol Ther* 5, 1175-1182.
- Geiselhart, V., Bastone, P., Kempf, T., Schmolzer, M., and Lochelt, M. (2004). Furin-mediated cleavage of the feline foamy virus Env leader protein. *J Virol* 78, 13573-13581.
- Geiselhart, V., Schwantes, A., Bastone, P., Frech, M., and Lochelt, M. (2003). Features of the Env leader protein and the N-terminal Gag domain of feline foamy virus important for virus morphogenesis. *Virology* 310, 235-244.
- German, A.C., Harbour, D.A., Helps, C.R., and Gruffydd-Jones, T.J. (2008). Is feline foamy virus really apathogenic? *Vet Immunol Immunopathol* 123, 114-118.
- Gharwan, H., Hirata, R.K., Wang, P., Richard, R.E., Wang, L., Olson, E., Allen, J., Ware, C.B., and Russell, D.W. (2007). Transduction of human embryonic stem cells by foamy virus vectors. *Mol Ther* 15, 1827-1833.
- Goepfert, P.A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B.H., and Mulligan, M.J. (1999). An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* 73, 7210-7217.
- Goff, S.P. (2001). Retroviridae: The retroviruses and their replication. In *Fields - Virology*, D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1871-1939

Grez, M., Becker, S., Saulnier, S., Knoss, H., Ott, M.G., Maurer, A., Dinauer, M.C., Hoelzer, D., Seger, R., and Hossle, J.P. (2000). Gene therapy of chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant* 25 *Suppl* 2, S99-104.

Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326, 662-669.

Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M., *et al.* (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.

Hacein-Bey, S., Gross, F., Nusbaum, P., Yvon, E., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2001). [Gene therapy of X-linked severe combined immunologic deficiency (SCID-X1)]. *Pathol Biol (Paris)* 49, 57-66.

Hahn, H., Baunach, G., Brautigam, S., Mergia, A., Neumann-Haefelin, D., Daniel, M.D., McClure, M.O., and Rethwilm, A. (1994). Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins. *J Gen Virol* 75 (Pt 10), 2635-2644.

Hatton, T., Zhou, S., and Standing, D.N. (1992). RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* 66, 5232-5241.

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

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

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

Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., *et al.* (2000a). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *Embo J* 19, 3436-3445.

Heinkelein, M., Rammling, M., Juretzek, T., Lindemann, D., and Rethwilm, A. (2003). Retrotransposition and cell-to-cell transfer of foamy viruses. *J Virol* 77, 11855-11858.

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

Heinkelein, M., Thurow, J., Dressler, M., Imrich, H., Neumann-Haefelin, D., McClure, M.O., and Rethwilm, A. (2000b). Complex effects of deletions in the 5'

untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging. *J Virol* 74, 3141-3148.

Hendrie, P.C., Huo, Y., Stolitenko, R.B., and Russell, D.W. (2008). A rapid and quantitative assay for measuring neighboring gene activation by vector proviruses. *Mol Ther* 16, 534-540.

Heneine, W., Schweizer, M., Sandstrom, P., and Folks, T. (2003). Human infection with foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 181-196.

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

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

Hill, C.L., Bieniasz, P.D., and McClure, M.O. (1999). Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol* 80 (Pt 8), 2003-2009.

Hirata, R.K., Miller, A.D., Andrews, R.G., and Russell, D.W. (1996). Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors. *Blood* 88, 3654-3661.

Hooks, J.J., and Gibbs, C.J., Jr. (1975). The foamy viruses. *Bacteriol Rev* 39, 169-185.

Hu, J., and Seeger, C. (1996). Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1060-1064.

Hungnes, O., Tjøtta, E., and Grinde, B. (1992). Mutations in the central polypurine tract of HIV-1 result in delayed replication. *Virology* 190, 440-442.

Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D.E., Fauci, A.S., and Koenig, S. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348, 245-248.

Janda, M., and Ahlquist, P. (1993). RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* 72, 961-970.

Johnson, R.H., de la Rosa, J., Abher, I., Kertayadnya, I.G., Entwistle, K.W., Fordyce, G., and Holroyd, R.G. (1988). Epidemiological studies of bovine spumavirus. *Vet Microbiol* 16, 25-33.

Johnston, P.B. (1961). A second immunologic type of simian foamy virus: monkey throat infections and unmasking by both types. *J Infect Dis* 109, 1-9.

Jolicoeur, P., Rosenberg, N., Cotellessa, A., and Baltimore, D. (1978). Leukemogenicity of clonal isolates of murine leukemia viruses. *J Natl Cancer Inst* 60, 1473-1476.

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

Josephson, N.C., Trobridge, G., and Russell, D.W. (2004). Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Hum Gene Ther* 15, 87-92.

Josephson, N.C., Vassilopoulos, G., Trobridge, G.D., Priestley, G.V., Wood, B.L., Papayannopoulou, T., and Russell, D.W. (2002). Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8295-8300.

Joyner, A., Keller, G., Phillips, R.A., and Bernstein, A. (1983). Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* 305, 556-558.

Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., and Schaller, H. (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *Embo J* 9, 3389-3396.

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

Katz, R.A., and Skalka, A.M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63, 133-173.

Kaye, J.F., and Lever, A.M. (1998). Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation. *J Virol* 72, 5877-5885.

Kiem, H.P., Allen, J., Trobridge, G., Olson, E., Keyser, K., Peterson, L., and Russell, D.W. (2007). Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood* 109, 65-70.

Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., Buchberger, M., and Wagner, E. (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 4, 409-418.

Knaus, T., and Nassal, M. (1993). The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. *Nucleic Acids Res* 21, 3967-3975.

Kögel, D., Aboud, M., and Flugel, R.M. (1995). Mutational analysis of the reverse transcriptase and ribonuclease H domains of the human foamy virus. *Nucleic Acids Res* 23, 2621-2625.

- Konvalinka, J., Lochelt, M., Zentgraf, H., Flugel, R.M., and Krausslich, H.G. (1995). Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J Virol* *69*, 7264-7268.
- Krol, M.A., Olson, N.H., Tate, J., Johnson, J.E., Baker, T.S., and Ahlquist, P. (1999). RNA-controlled polymorphism in the in vivo assembly of 180-subunit and 120-subunit virions from a single capsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13650-13655.
- Kupiec, J.J., Tobaly-Tapiero, J., Canivet, M., Santillana-Hayat, M., Flugel, R.M., Peries, J., and Emanoil-Ravier, R. (1988). Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res* *16*, 9557-9565.
- Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P.F., Hanenberg, H., and Auerbach, A.D. (2003). A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* *101*, 1249-1256.
- Laufs, S., Nagy, K.Z., Giordano, F.A., Hotz-Wagenblatt, A., Zeller, W.J., and Fruehauf, S. (2004). Insertion of retroviral vectors in NOD/SCID repopulating human peripheral blood progenitor cells occurs preferentially in the vicinity of transcription start regions and in introns. *Mol Ther* *10*, 874-881.
- Lecellier, C.H., and Saib, A. (2000). Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology* *271*, 1-8.
- Lee, E.G., and Linial, M.L. (2008). The C terminus of foamy retrovirus Gag contains determinants for encapsidation of Pol protein into virions. *J Virol* *82*, 10803-10810.
- Lee, M.G., Kremer, E.J., and Perricaudet, M. (1995). Adenoviral vectors. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser* *5*, 20-32.
- Leonard, W.J. (1996). Dysfunctional cytokine receptor signaling in severe combined immunodeficiency. *J Investig Med* *44*, 304-311.
- Leonard, W.J. (2000). X-linked severe combined immunodeficiency: from molecular cause to gene therapy within seven years. *Mol Med Today* *6*, 403-407.
- Leurs, C., Jansen, M., Pollok, K.E., Heinkelein, M., Schmidt, M., Wissler, M., Lindemann, D., Von Kalle, C., Rethwilm, A., Williams, D.A., *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*, 509-519.
- Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., and Oshiro, L.S. (1984a). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* *225*, 840-842.
- Levy, R.M., Pons, V.G., and Rosenblum, M.L. (1984b). Central nervous system mass lesions in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Neurosurg* *61*, 9-16.

- Lewinski, M.K., and Bushman, F.D. (2005). Retroviral DNA integration--mechanism and consequences. *Adv Genet* 55, 147-181.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11, 3053-3058.
- Lindemann, D., and Goepfert, P.A. (2003). The foamy virus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 111-129.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H., and Rethwilm, A. (2001). A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* 75, 5762-5771.
- Linial, M. (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* 8, 284-289.
- Linial, M.L. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* 73, 1747-1755.
- Löchelt, M. (2003). Foamy virus transactivation and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 27-61.
- Löchelt, M., and Flügel, R.M. (1996). The human foamy virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein. *J Virol* 70, 1033-1040.
- Löchelt, M., Muranyi, W., and Flügel, R.M. (1993). Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7317-7321.
- Löchelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y.B., Truyen, U., Rosler, U., Battenberg, M., Saib, A., *et al.* (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7982-7987.
- Lüftenegger, D., Picard-Maureau, M., Stanke, N., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2005). Analysis and function of prototype foamy virus envelope N glycosylation. *J Virol* 79, 7664-7672.
- Makarow, M. (1985). Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: internalization of enveloped viruses into spheroplasts. *EMBO J* 4, 1855-1860.
- Makarow, M., Sareneva, H., and von Bonsdorff, C.H. (1987). Characterization of the fusion of enveloped viruses with the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts. *J Biol Chem* 262, 1836-1841.
- Malech, H.L., and Hickstein, D.D. (2007). Genetics, biology and clinical management of myeloid cell primary immune deficiencies: chronic granulomatous disease and leukocyte adhesion deficiency. *Curr Opin Hematol* 14, 29-36.

- Malmquist, W.A., Van der Maaten, M.J., and Boothe, A.D. (1969). Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res* 29, 188-200.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. In *J Cell Biol*, pp. 441-452.
- Meiering, C.D., Comstock, K.E., and Linial, M.L. (2000). Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells. *J Virol* 74, 1718-1726.
- Meiering, C.D., and Linial, M.L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* 14, 165-176.
- Mergia, A. (1994). Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3' end of the env gene. *Virology* 199, 219-222.
- Mergia, A., and Heinkelein, M. (2003). Foamy virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 131-159.
- Mergia, A., Leung, N.J., and Blackwell, J. (1996). Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J Med Primatol* 25, 2-7.
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W., *et al.* (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4, 555-557.
- Miller, A.D. (1992). Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 1-24.
- Miller, A.D., and Buttimore, C. (1986). Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6, 2895-2902.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P.D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M.O., and Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* 71, 7305-7311.
- Motomura, K., Chen, J., and Hu, W.S. (2008). Genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2, two distinct human lentiviruses. *J Virol* 82, 1923-1933.
- Mulligan, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.
- Muranyi, W., and Flügel, R.M. (1991). Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol* 65, 727-735.

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

Nagai, M., and Osame, M. (2003). Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *J Neurovirol* 9, 228-235.

Nassal, M. (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 66, 4107-4116.

Nassal, M. (2008). Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res* 134, 235-249.

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

Nassal, M., and Schaller, H. (1996). Hepatitis B virus replication--an update. *J Viral Hepat* 3, 217-226.

Nelson, P.N., Carnegie, P.R., Martin, J., Davari Ejtehad, H., Hooley, P., Roden, D., Rowland-Jones, S., Warren, P., Astley, J., and Murray, P.G. (2003). Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol Pathol* 56, 11-18.

Nermut, M.V., Zhang, W.H., Francis, G., Ciampor, F., Morikawa, Y., and Jones, I.M. (2003). Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. *Virology* 305, 219-227.

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

Nienhuis, A.W., Dunbar, C.E., and Sorrentino, B.P. (2006). Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther* 13, 1031-1049.

Noth, U., Tuli, R., Osyczka, A.M., Danielson, K.G., and Tuan, R.S. (2002). In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 8, 131-144.

Nowrouzi, A., Dittrich, M., Klanke, C., Heinkelein, M., Rammling, M., Dandekar, T., von Kalle, C., and Rethwilm, A. (2006). Genome-wide mapping of foamy virus vector integrations into a human cell line. *J Gen Virol* 87, 1339-1347.

Ostertag, W., Seliger, B., Kollek, R., Stocking, C., Bergholz, U., and Smadja-Joffe, F. (1986). The myeloproliferative sarcoma virus retains transforming functions after introduction of a dominant selectable marker gene. *J Gen Virol* 67 (Pt 7), 1361-1371.

Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., *et al.* (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12, 401-409.

- Ott, M.G., Seger, R., Stein, S., Siler, U., Hoelzer, D., and Grez, M. (2007). Advances in the treatment of Chronic Granulomatous Disease by gene therapy. *Curr Gene Ther* 7, 155-161.
- Park, J., Nadeau, P.E., and Mergia, A. (2002). A minimal genome simian foamy virus type 1 vector system with efficient gene transfer. *Virology* 302, 236-244.
- Perkovic, M., Schmidt, S., Marino, D., Russell, R.A., Stauch, B., Hofmann, H., Kopietz, F., Kloke, B.P., Zielonka, J., Strover, H., *et al.* (2008). Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein Bet. *J Biol Chem*.
- Peters, K., Barg, N., Gartner, K., and Rethwilm, A. (2008). Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication. *Virology* 373, 51-60.
- Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2005). RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol* 79, 7005-7013.
- Petit, C., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., De The, H., and Saib, A. (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci* 116, 3433-3442.
- Pfeiffer, P., and Hohn, T. (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. *Cell* 33, 781-789.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J Virol* 77, 4722-4730.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* 73, 2613-2621.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S., and Gallo, R.C. (1981). Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* 294, 268-271.
- Pollack, J.R., and Ganem, D. (1993). An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol* 67, 3254-3263.
- Price, B.D., Rueckert, R.R., and Ahlquist, P. (1996). Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9465-9470.
- Puck, J.M., Pepper, A.E., Henthorn, P.S., Candotti, F., Isakov, J., Whitwam, T., Conley, M.E., Fischer, R.E., Rosenblatt, H.M., Small, T.N., *et al.* (1997). Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 89, 1968-1977.

- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80, 148-158.
- Rethwilm, A. (1995). Regulation of foamy virus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 193, 1-24.
- Rethwilm, A. (2007). Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 7, 261-271.
- Rethwilm, A., Erlwein, O., Baunach, G., Maurer, B., and ter Meulen, V. (1991). The transcriptional transactivator of human foamy virus maps to the bel 1 genomic region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 941-945.
- Riggs, J.L., Oshirls, Taylor, D.O., and Lennette, E.H. (1969). Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* 222, 1190-1191.
- Rinke, C.S., Boyer, P.L., Sullivan, M.D., Hughes, S.H., and Linial, M.L. (2002). Mutation of the catalytic domain of the foamy virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity. *J Virol* 76, 7560-7570.
- Rizvi, T.A., and Panganiban, A.T. (1993). Simian immunodeficiency virus RNA is efficiently encapsidated by human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 67, 2681-2688.
- Rogers, N.G., Basnight, M., Gibbs, C.J., and Gajdusek, D.C. (1967). Latent viruses in chimpanzees with experimental kuru. *Nature* 216, 446-449.
- Romen, F., Backes, P., Materniak, M., Sting, R., Vahlenkamp, T.W., Riebe, R., Pawlita, M., Kuzmak, J., and Lochelt, M. (2007). Serological detection systems for identification of cows shedding bovine foamy virus via milk. *Virology* 364, 123-131.
- Rosenberg, P.S., Alter, B.P., Socie, G., and Gluckman, E. (2005). Secular trends in outcomes for Fanconi anemia patients who receive transplants: implications for future studies. *Biol Blood Marrow Transplant* 11, 672-679.
- Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., *et al.* (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323, 570-578.
- Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., Gartner, K., Bock, M., Herchenroder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2003). Feline foamy virus genome and replication strategy. *J Virol* 77, 11324-11331.
- Russell, D.W., and Miller, A.D. (1996). Foamy virus vectors. *J Virol* 70, 217-222.
- Russell, R.A., Wiegand, H.L., Moore, M.D., Schafer, A., McClure, M.O., and Cullen, B.R. (2005). Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* 79, 8724-8731.

- Russell, R.A., Zeng, Y., Erlwein, O., Cullen, B.R., and McClure, M.O. (2001). The R region found in the human foamy virus long terminal repeat is critical for both Gag and Pol protein expression. *J Virol* 75, 6817-6824.
- Rustigian, R., Johnston, P., and Reihart, H. (1955). Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents. *Proc Soc Exp Biol Med* 88, 8-16.
- Saib, A. (2003). Non-primate foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 277, 197-211.
- Saib, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J., and de The, H. (1997). Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol* 71, 1155-1161.
- Sakuragi, S., Goto, T., Sano, K., and Morikawa, Y. (2002). HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7956-7961.
- Sandstrom, P.A., Phan, K.O., Switzer, W.M., Fredeking, T., Chapman, L., Heneine, W., and Folks, T.M. (2000). Simian foamy virus infection among zoo keepers. *Lancet* 355, 551-552.
- Sawyer, S.L., Emerman, M., and Malik, H.S. (2004). Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* 2, E275.
- Schenk, T., Enssle, J., Fischer, N., and Rethwilm, A. (1999). Replication of a foamy virus mutant with a constitutively active U3 promoter and deleted accessory genes. *J Gen Virol* 80 (Pt 7), 1591-1598.
- Schliephake, A.W., and Rethwilm, A. (1994). Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* 68, 4946-4954.
- Schmidt, M., Herchenroder, O., Heeney, J., and Rethwilm, A. (1997). Long terminal repeat U3 length polymorphism of human foamy virus. *Virology* 230, 167-178.
- Schmidt, M., and Rethwilm, A. (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* 210, 167-178.
- Schweizer, M., Falcone, V., Gange, J., Turek, R., and Neumann-Haefelin, D. (1997). Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J Virol* 71, 4821-4824.
- Schweizer, M., Turek, R., Hahn, H., Schliephake, A., Netzer, K.O., Eder, G., Reinhardt, M., Rethwilm, A., and Neumann-Haefelin, D. (1995). Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 161-170.
- Shaw, K.L., Lindemann, D., Mulligan, M.J., and Goepfert, P.A. (2003). Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J Virol* 77, 2338-2348.

Si, Y., Pulliam, A.C., Linka, Y., Ciccone, S., Leurs, C., Yuan, J., Eckermann, O., Fruehauf, S., Mooney, S., Hanenberg, H., *et al.* (2008). Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of Fancc-/- stem cells. *Blood*.

Simpson, D.M., and Tagliati, M. (1994). Neurologic manifestations of HIV infection. *Ann Intern Med* 121, 769-785.

Skasko, M., and Kim, B. (2008). Compensatory role of human immunodeficiency virus central polypurine tract sequence in kinetically disrupted reverse transcription. *J Virol* 82, 7716-7720.

Stange, A., Mannigel, I., Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Gottlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H., and Lindemann, D. (2005). Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J Virol* 79, 5466-5476.

Stenbak, C.R., and Linial, M.L. (2004). Role of the C terminus of foamy virus Gag in RNA packaging and Pol expression. *J Virol* 78, 9423-9430.

Strappe, P.M., Hampton, D.W., Brown, D., Cachon-Gonzalez, B., Caldwell, M., Fawcett, J.W., and Lever, A.M. (2005). Identification of unique reciprocal and non reciprocal cross packaging relationships between HIV-1, HIV-2 and SIV reveals an efficient SIV/HIV-2 lentiviral vector system with highly favourable features for in vivo testing and clinical usage. *Retrovirology* 2, 55.

Suhonen, J., Ray, J., Blomer, U., Gage, F.H., and Kaspar, B. (2006). Ex vivo and in vivo gene delivery to the brain. *Curr Protoc Hum Genet Chapter 13*, Unit 13 13.

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

Swack, N.S., and Hsiung, G.D. (1975). Pathogenesis of simian foamy virus infection in natural and experimental hosts. *Infect Immun* 12, 470-474.

Swanstrom, R., and Wills, J.W. (1997). Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 263-335.

Switzer, W.M., Bhullar, V., Shanmugam, V., Cong, M.E., Parekh, B., Lerche, N.W., Yee, J.L., Ely, J.J., Boneva, R., Chapman, L.E., *et al.* (2004). Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J Virol* 78, 2780-2789.

Switzer, W.M., Salemi, M., Shanmugam, V., Gao, F., Cong, M.E., Kuiken, C., Bhullar, V., Beer, B.E., Vallet, D., Gautier-Hion, A., *et al.* (2005). Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature* 434, 376-380.

Temin, H.M. (1971). The provirus hypothesis: speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 46, 3-7.

- Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
- Thümer, L., Rethwilm, A., Holmes, E.C., and Bodem, J. (2007). The complete nucleotide sequence of a New World simian foamy virus. *Virology* 369, 191-197.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Giron, M.L., Neves, M., Koken, M., Saib, A., and de The, H. (2001). Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N terminus of Gag. *J Virol* 75, 4367-4375.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemain, M.C., Lecellier, C.H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M.L., de The, H., *et al.* (2000). Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* 74, 4064-4073.
- Tobaly-Tapiero, J., Kupiec, J.J., Santillana-Hayat, M., Canivet, M., Peries, J., and Emanoil-Ravier, R. (1991). Further characterization of the gapped DNA intermediates of human spumavirus: evidence for a dual initiation of plus-strand DNA synthesis. *J Gen Virol* 72 (Pt 3), 605-608.
- Trobridge, G., Josephson, N., Vassilopoulos, G., Mac, J., and Russell, D.W. (2002a). Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol Ther* 6, 321-328.
- Trobridge, G., and Russell, D.W. (2004). Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J Virol* 78, 2327-2335.
- Trobridge, G., Vassilopoulos, G., Josephson, N., and Russell, D.W. (2002b). Gene transfer with foamy virus vectors. *Methods Enzymol* 346, 628-648.
- Trobridge, G.D., Miller, D.G., Jacobs, M.A., Allen, J.M., Kiem, H.P., Kaul, R., and Russell, D.W. (2006). Foamy virus vector integration sites in normal human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1498-1503.
- Trobridge, G.D., and Russell, D.W. (1998). Helper-free foamy virus vectors. *Hum Gene Ther* 9, 2517-2525.
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G., and Hall, B.D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298, 347-350.
- Van Maele, B., De Rijck, J., De Clercq, E., and Debyser, Z. (2003). Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol* 77, 4685-4694.
- Vassilopoulos, G., and Rethwilm, A. (2008). The usefulness of a perfect parasite. *Gene Ther* 15, 1299-1301.
- Vassilopoulos, G., Trobridge, G., Josephson, N.C., and Russell, D.W. (2001). Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood* 98, 604-609.

- Vassilopoulos, G., Wang, P.R., and Russell, D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-904.
- Verma, I.M., and Weitzman, M.D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74, 711-738.
- Wagner, A., Doerks, A., Aboud, M., Alonso, A., Tokino, T., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (2000). Induction of cellular genes is mediated by the Bel1 transactivator in foamy virus-infected human cells. *J Virol* 74, 4441-4447.
- White, S.M., Renda, M., Nam, N.Y., Klimatcheva, E., Zhu, Y., Fisk, J., Halterman, M., Rimel, B.J., Federoff, H., Pandya, S., *et al.* (1999). Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J Virol* 73, 2832-2840.
- Whitwam, T., Peretz, M., and Poeschla, E. (2001). Identification of a central DNA flap in feline immunodeficiency virus. *J Virol* 75, 9407-9414.
- Wiktorowicz, T., Peters, K., Armbruster, N., Steinert, A.F., and Rethwilm, A. (2009). Generation of an improved foamy virus vector by dissection of cis-acting sequences. *J Gen Virol* 90, 481-487.
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (2000). The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol* 74, 2885-2887.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S.D., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (2001). Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J Virol* 75, 7995-8007.
- Wivel, N.A., and Walters, L. (1993). Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 262, 533-538.
- Wolfe, N.D., Switzer, W.M., Carr, J.K., Bhullar, V.B., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Prosser, A.T., Torimiro, J.N., Wright, A., Mpoudi-Ngole, E., *et al.* (2004). Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet* 363, 932-937.
- Wu, M., Chari, S., Yanchis, T., and Mergia, A. (1998). cis-Acting sequences required for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* 72, 3451-3454.
- Wu, M., and Mergia, A. (1999). Packaging cell lines for simian foamy virus type 1 vectors. *J Virol* 73, 4498-4501.
- Yang, P., Zemba, M., Aboud, M., Flugel, R.M., and Lochelt, M. (1997). Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus. *Virus Genes* 15, 17-23.
- Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., and Wilson, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-4411.

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

Yu, S.F., Edelmann, K., Strong, R.K., Moebes, A., Rethwilm, A., and Linial, M.L. (1996b). The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol* 70, 8255-8262.

Yu, S.F., Stone, J., and Linial, M.L. (1996c). Productive persistent infection of hematopoietic cells by human foamy virus. *J Virol* 70, 1250-1254.

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

Zou, J.X., and Luciw, P.A. (1996). The transcriptional transactivator of simian foamy virus 1 binds to a DNA target element in the viral internal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 326-330.

7 Anhang

7.1 Zusammenfassung

Im Vergleich zu anderen Retroviren, zeichnen sich Foamyviren durch eine Reihe von Eigenschaften aus, die sie besonders attraktiv für die Vektorentwicklung und somatische Gentherapie machen. Foamyviren exprimieren ihr Pol Prekursorprotein unabhängig von Gag, d.h. von ihrer eigenen gespleisten mRNA. Zwar ist der genaue Pol-Verpackungsmechanismus von Foamyviren noch nicht vollständig aufgeklärt, frühere Studien zeigten jedoch, dass die prägenomische RNA essentiell für die Pol-Enkapsidierung ist. Zwei Pol-Verpackungssequenzen (PES) wurden identifiziert, welche sich in den cis-aktiven Sequenzen (CAS) der prägenomischen RNA befinden (Heinkelein et al., 1998; Peters et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die PESI und PESII Sequenzen alleine ausreichend für die Pol-Verpackung sind. Zusätzlich wurde der Einfluss von verschiedenen Teilen der ca. 2000 nt langen CASII Sequenz auf den Vektortransfer ohne Verlust der Pol-Enkapsidierung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass PESI und PESII alleine nicht ausreichend für die Pol-Verpackung ins foamyvirale Partikel sind. Die Verkürzung des CASII Elements zeigte keinen Effekt auf die Pol-Verpackung und den Vektortransfer. Das Einfügen eines zusätzlichen zentralen Polypurintraktes führte jedoch zur signifikanten Erhöhung der Transduktionseffizienz von FV Vektoren. Diese Ergebnisse führten zur Entwicklung eines neuen foamyviralen Vektors (pTW01), der ca. 850nt kürzer ist als die früher etablierten FV Vektoren, aber immer noch die gleiche Transduktionseffizienz auf Fibroblasten und humanen Stammzellen zeigt. Dieser Vektor mit einer höheren Verpackungskapazität und Sicherheit, eignet sich hervorragend für den Einsatz in gentherapeutischen Studien. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine heterologe Verpackung zwischen zwei unterschiedlichen Foamyviren (PFV und SFV_{mac}) zu einem geringen Prozentsatz stattfindet.

Als erster Schritt in der Entwicklung eines neuen Systems für eine einfache und kostengünstige Vektorvirusproduktion wurde gezeigt, dass die Expression der foamyviralen Gag, Pol und Env Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* stattfinden kann.

7.2 Summary

Foamy viruses harbor some unique features which make them, compared to other retroviruses, especially attractive for vector development and somatic gene therapy. Foamy viruses express their Pol precursor protein independently of Gag, i.e. from their own spliced mRNA. While the exact mechanism by which Pol is incorporated into the foamy virus particle is still unknown, previous studies have shown that pregenomic RNA is essential for Pol incorporation. Two cis-active sequences (CAS) were identified, within which two essential Pol encapsidation sequences (PES) were mapped (Heinkelein et al., 1998; Peters et al., 2005).

Using the prototype foamy virus (PFV) as a model, this work investigated whether the previously identified PESI and PESII sequences in an FV vector are alone sufficient for Pol encapsidation. Additionally, the influence of various parts of the 2000 bp CASII sequence on vector transfer efficiency without the loss of Pol encapsidation was studied.

The obtained results indicate that the PESI and PESII alone are not sufficient for Pol incorporation into a foamy virus particle. The truncation of the CASII element has no effect on Pol incorporation and vector transfer. However, if an additional central poly purine tract is generated into a foamy virus vector, it significantly increases the FV vector transduction rate. These results led to a generation of an improved foamy virus vector (pTW01), about 850 bp shorter than the previously established vectors, yet still as effective in transducing fibroblasts and primary human cells. These data add to the packaging limit of the PFV vectors for gene therapy, as well as to the safety of these vectors. In addition to these findings, it was shown that the cross-packaging between two different foamy viruses (PFV and SFV_{mac}) takes place very rarely.

Finally, as a first step in finding a new low-cost possibility to produce large amounts of vector viruses, it was shown that an expression of the three foamy virus proteins: Gag, Pol and Env can take place in *Saccharomyces cerevisiae*.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: (A) EM Aufnahme von Spumaviren (H. Zentgraf); (B) uninfizierte humane Fibroblasten; (C) PFV infizierte humane Fibroblasten mit zytopathischen Effekt ...	5
Abb. 2: Morphologie der retroviralen Partikel	8
Abb. 3: Genomorganisation und Genexpression von PFV	11
Abb. 4: Gag-Vorläuferprotein von PFV	13
Abb. 5: Pol-Vorläuferprotein von PFV	14
Abb. 6: Env Vorläuferprotein von PFV	15
Abb. 7: Replikationszyklus der Foamyviren.....	18
Abb. 8: Foamyvirale Vektoren	25
Abb. 9: PFV-Verpackungsplasmide.....	64
Abb. 10: Vektoren mit Deletionen in der CASII-Region	66
Abb. 11: Repräsentatives Beispiel eines Western Blot, der Zellysate und Partikelpräparation aus transfizierten 293T-Zellen	67
Abb. 12: RNase-Protektions-Assay (RPA) und relative partikelassoziierte RNA-Inkorporation in den verschiedenen Vektorüberständen	68
Abb. 13: Vektor mit Deletionen in den CASI- und CASII-Regionen.....	69
Abb. 14: Western Blot der Gag- und Pol-Proteine in 293T-Zellysaten und Partikelpräparationen	70
Abb. 15: RPA und relative partikelassoziierte RNA-Inkorporation in den verschiedenen Vektorüberständen im Vergleich mit pKP36.....	71
Abb. 16: Transduktionsrate der pKP-Vektoren auf HT1080 Zellen.....	72
Abb. 17: Darstellung der pTW-Vektoren.....	74
Abb. 18: Repräsentativer Western Blot der Gag- und Pol-Expression in Zellysaten und Partikelpräparation zum Vergleich der pTW-Vektoren	75
Abb. 19: RNase Protektions Assay (RPA) und relative Partikelassoziierte RNA Inkorporation der pTW Vektoren im Vergleich zu pKP33	76
Abb. 20: Transduktionsrate der pTW Vektoren auf HT1080 Zellen	77
Abb. 21: FACS-Analyse der Transduktionsrate der pTW-Vektoren auf Mesenchymalen Stammzellen (MSC)	78
Abb. 22: FACS-Analyse der Transduktionsrate der pKP- und pTW-Vektoren, die nach Kotransfektion von 293T-Zellen mit SFV _{mac} Verpackungsplasmiden (Gag+Pol+Env) produziert wurden auf HT1080 Zellen.....	80
Abb. 23: pEGFPD Vektor (abgeleitet von SFV _{mac}) & pTW05, pTW06-Vektoren (abgeleitet von PFV).....	82

Abb. 24: FACS-Analyse von HT1080- Zielzellen nach Transduktion mit Vektorviren die durch die Doppelverpackung von PFV- und SFV _{mac} -Vektoren mit PFV- bzw. SFV _{mac} -Verpackungsplasmiden entstanden sind	84
Abb. 25: FACS-Analyse von HeLa-Zielzellen nach Transfektion mit Vektorviren, die durch die Doppelverpackung von PFV- und SFV _{mac} -Vektoren mit PFV- bzw. SFV _{mac} -Verpackungsplasmiden entstanden sind	86
Abb. 26: Gag Western Blot, Expression des foamyviralen Gag Proteins in Hefen	89
Abb. 27: Pol Western Blot, Expression des foamyviralen Pol Proteins in Hefen ..	89
Abb. 28: Env Western Blot, Expression des foamyviralen Env Proteins in Hefen	90
Abb. 29: Vektor pTW01 im Vergleich mit dem Vektor pMD9	98
Abb. 30: PFV-Genom mit eingezeichneten Regionen die in pTW01 enthalten und für den Vektortransfer notwendig sind	98

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Klassifizierung der Retroviren	2
Tab. 2. Beispiele für Foamyvirus-Isolate und ihre Wirte	4
Tab. 3. Transfektionsansätze	56
Tab. 4. Vergleich der Transduktionsrate der pKP und pTW Vektoren mit PFV- und SFV _{mac} Verpackungsplasmiden.....	81
Tab. 5. Kombinationen der Vektoren in den Transfektionsansätzen für die Doppelverpackung	83
Tab. 6. Hefekonstrukte, die Expression der foamyviralen Proteine zeigten	89
Tab. 7. Eigenschaften der foamyviralen Vektoren, welche einen Einsatz in der Gentherapie ermöglichen	107

7.5 Abkürzungsverzeichnis

- °C Grad Celsius
- μ mikro
- Abb. Abbildung
- dest destilliertes Wasser
- APOBEC apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like complex 3
- AIDS *acquired immunodeficiency syndrome*
- ALV Avian leukosis virus
- BFV Bovines Foamyvirus
- BLV Bovines Leukämie Virus
- bp Basenpaare
- BPB Bromphenolblau
- BSA Rinderserumalbumin
- bzw. Beziehungsweise
- ca. circa
- CA Kapsidprotein
- CAEV Caprine arthritis encephalitis virus
- CAS cis-aktive Sequenz
- CGD chronic granulomatous disease; engl. für Septische Granulomatose
- CIAP Calf Intestine Alkaline Phosphatase
- CMV Cytomegalievirus
- cPPT zentraler Polypurintrakt
- CRM1 chromosome maintenance region 1
- ddNTP Didesoxynukleotid
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- dNTP Desoxynukleotid
- dsDNA Doppelsträngige DNA
- EB Ethidiumbromid

- *E.coli Escherichia coli*
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- EFV Equines Foamyvirus
- EGFP enhanced green flourescing protein
- EM Elektronmikroskopie
- env Hüllprotein
- EIAV Equine infectious anemia virus
- ER Endoplasmatisches Retikulum
- FACS Fluorescence Activated Cell Sorter
- FCS Fötales Kälberserum
- FFV Felines Foamyvirus
- FeLV Feline leukemia virus
- FIV Feline immunodeficiency virus
- FSC Forward Scatter
- FV Foamyvirus
- g Fallbeschleunigung
- gag Kapsidprotein
- GALV Gibbon ape leukemia virus
- GR-Box Glycin-Arginin-reiche Box
- HAT Histonacetyltransferase
- hA3F humanes APOBEC3G
- hA3G humanes APOBEC3F
- HFV Humanes Foamyvirus
- HIV Humanes Immundefizienzvirus
- HSZ humane Stammzellen
- HTLV Humanes T-Zell-Leukämie Virus
- IN Integrase
- IP interner Promoter
- IRES interne Ribosomenbindungsstelle
- IRT intrazelluläre Retrotransposition
- kb Kilobasen
- LAD Leukozyten-Adhäsionsdefizienz

- L-Domäne late Domäne
- LP Leaderpeptid
- LTRs Long Terminal Repeats
- M molar
- MA Matrix
- min Minuten
- MLV Murines Leukämie Virus
- mM Millimolar
- M-MLV Moloney Murine Leukemia Virus
- MMTV Mouse mammary tumor virus
- MOI multiplicity of infection
- M-PMV Mason-Pfizer Monkey Virus
- mRNA messenger RNA
- MSD membranspannende Domäne
- NC Nukleokapsid
- NLS nukleäres Lokalisationssignal
- nm Nanometer
- NOD/SCID-Mäuse non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency
- orf open reading frame (offener Leserahmen)
- pbs Primerbindungsstelle
- PBS phosphatgepufferte Salzlösung
- PCAF Lysin-acetyltransferase 2B
- PIC Präintegrationskomplex
- PCR Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
- PEI Polyethylenimin
- PES Pol-Enkapsidierungssequenz
- PFV Prototypisches Foamyvirus
- pmol Pikomol
- pol Polymerase
- PPP Proteinprobenpuffer
- PR Protease
- PSI packaging signal

- RevT Reticuloendotheliosis virus
- RNA Ribonukleinsäure
- RNaseH RibonukleaseH
- RRE Rev-responsibles Element
- RSV Rous sarcoma virus
- RT Reverse Transkriptase
- RV Retrovirus
- SCID schwerer kombinierter Immundefekt
- SD Spleißdonor
- SDS Natriumdodecylsulfat
- sek Sekunden
- SFFV Spleen Focus Forming Virus
- SFV Simian Foamyvirus
- SIN selbst inaktivierende Vektoren
- SIV Simian Immundefizienzvirus
- SSC Side Scatter
- SU Oberflächenuntereinheit
- SVP Subvirale Partikel
- Tab. Tabelle
- TAE Tris-Azetat-Puffer
- TAR transactivator responsive element
- Tas Transaktivator von Spumaviren
- Tat Transaktivator von HIV-1
- TE-Puffer Tris-EDTA-Puffer
- TM Transmembranuntereinheit
- UTR untranslated region
- UV ultraviolett
- ÜN über Nacht
- Vif virion infectivity factor
- VLP virus like particle
- v_{max} maximale Geschwindigkeit
- z. B. zum Beispiel

7.6 Klonierungsstrategie

pKP 32

Vektor: pMD9 Δ Hinc-100 x EcoRI x NotI (CIP) \rightarrow 7954 bp

Insert: pMD9 Δ 200- Msc x EcoRI x NotI \rightarrow 1333 bp

pKP33

Vektor: pKP32 x EcoRV x BamHI (CIP) \rightarrow 8240 bp

Insert: pKP32 x BamHI x Hinc II \rightarrow 832 bp

pKP35

pMD9 Δ 200 – MscI x BstXI x Eco47III mit T4 Polymerase abgedaut \rightarrow 9400 bp

pKP36

Vektor: pKP33 x SmaI x MluI \rightarrow 7800 bp

Insert 1: pKP33 x MluI x SacI \rightarrow 601 bp

Insert 2: 28nt – oligo 4129 annealt mit oligo 4131

pTW01

Vektor: pKP 33 x BsmBI

Insert: oligo 4333 annealt mit oligo 4334

pTW02

Vektor : pKP33 x BsmBI

oligo 4335 annealt mit oligo 4336

pTW03

Vektor : pKP33 x BsmBI

Insert: oligo 4337 annealt mit oligo 4338

pTW04

Vektor : pKP33 x BsmBI

oligo 4339 annealt mit oligo 4340

pTW05

Vektor: pKG84 geschnitten mit AgeI und NotI

Insert: PCR von mRFP

pTW06

Vektor: pKG84 geschnitten mit Eco47III und NotI

Insert: PCR von tag RFP

pTW07

Vektor: pKT10 geschnitten mit EcoRI und NotI

Insert: PCR von Gag an pClgag2

pTW08

Vektor: pKT10 geschnitten mit EcoRI und NotI

Insert: PCR von Pol an pCpol2

pTW09

Vektor: pKT10 geschnitten mit EcoRI und NotI

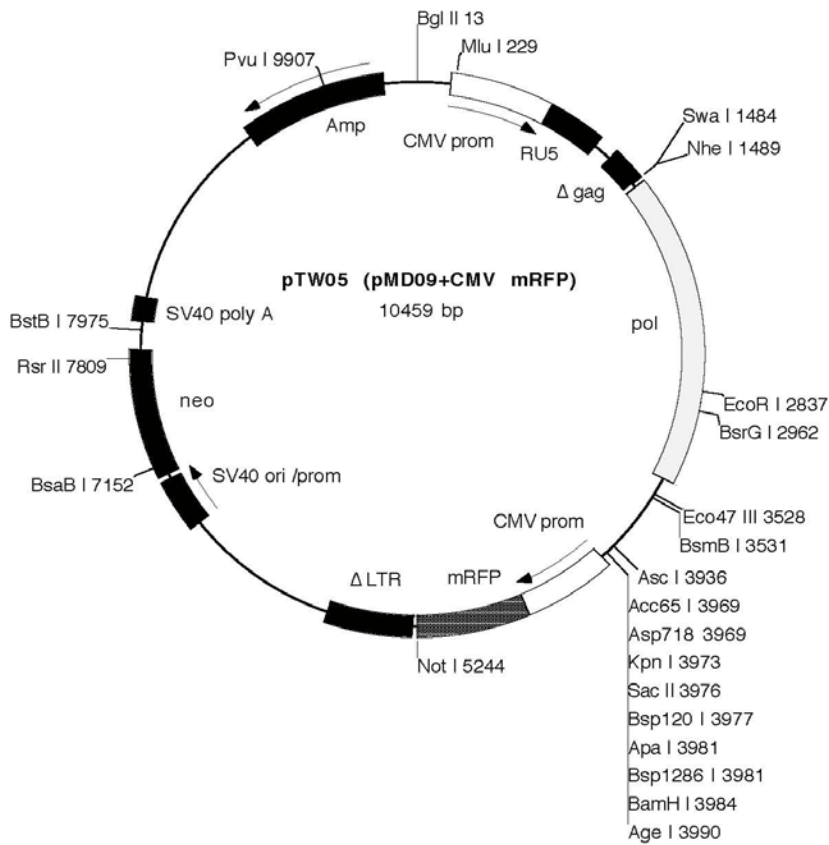
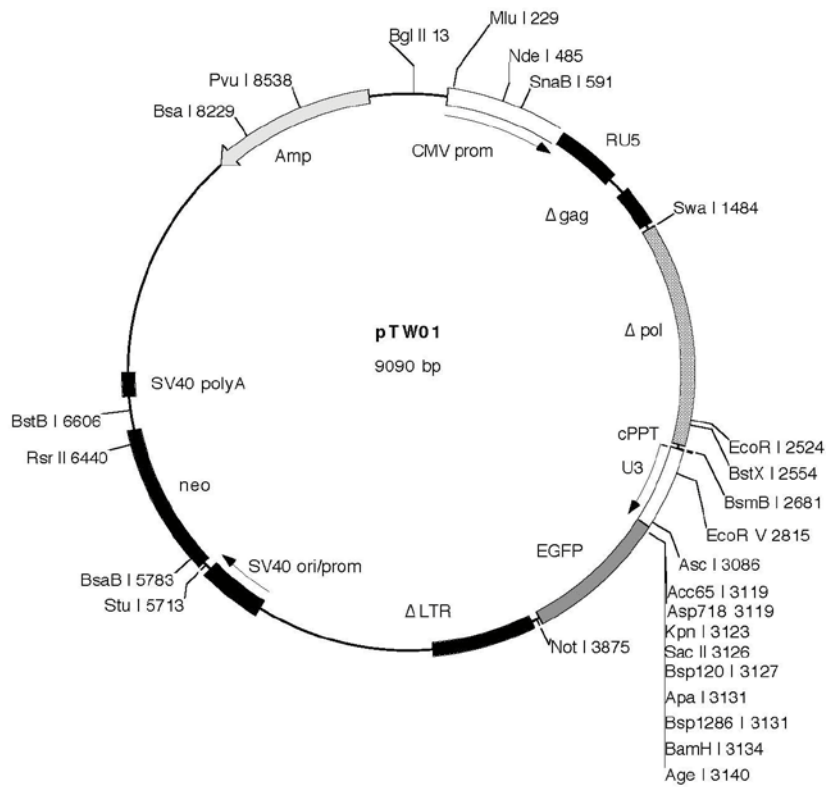
Insert: PCR von Env an pCenv1

pTW10

Vektor: pESC Leu mit BamHI und XhoI aufgeschnitten

Insert: PCR an pClgag2

7.7 Vektorkarten



7.8 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Herstellung eines neuen foamyviralen Vektors durch Einengung der cis-aktiven Sequenzen“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, den

Tatiana Wiktorowicz

7.9 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Tatiana Wiktorowicz
Geburtsdatum: 04.03. 1981
Geburtsort: Warschau (Polen)
Nationalität: polnisch

Ausbildung:

1987-1995 Deutsche Auslandsschule/ Warschau
später Willy Brandt Schule / Warschau
1995-1997 Oberschule Nr. 3/ Warschau
1997-1999 Oberschule Nr. 1/ Warschau
Abschluss Abitur
1999-2004 Studium der Biologie, Universität Warschau
07/2002 Bachelor Abschluss:Biotechnologie/Institut für
Mikrobiologie, Universität Warschau
06/2004 Magisterarbeit (M.Sc.) am Institut für Mikrobiologie, Abteilung
Genetik der Bakterien, Universität Warschau
07/2004-07/2009 Promotion am Institut für Virologie der Bayrischen Julius-
Maximilians Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Axel Rethwilm

Praktika und Stipendien:

09/1999 Pflegepraktikum/ St. Vinzent-Hospital Köln
10/2000-09/2001 Wissenschaftliches Stipendium der Universität Warschau,
10/2002-09/2004 Fakultät für Biologie, anhand der Gesamtleistung im Studium

- 10/2002-03/2003** Auslandstipendium Biologie ein Semester: Sokrates-Erasmus Programm 2002/03 Georg-August Universität, Göttingen
- 03/2003** Laborpraktikum in der Abteilung Virologie, Zentrum für Hygiene und Humangenetik, Bereich Medizin, Georg-August-Universität Göttingen
- 03/2009-06/2009** Laboraufenthalt zur Erlernung von Stammzelltechniken am Herman B Wells Center for Pediatrics Research, Indiana University, Indianapolis USA in der Arbeitsgruppe von MD D. Wade Clapp

7.10 Publikationsliste

Wolska, K. I., A. Kraczkiewicz-Dowjat, A. M. Grudniak, A. Sajkowska, and T. Wiktorowicz. 2004. New methods of pathogenic bacteria elimination. *Pol J Microbiol* **53 Suppl**:39-43.

Peters, K., T. Wiktorowicz, M. Heinkelein, and A. Rethwilm. 2005. RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol* **79**: 7005-13.

Kretzschmar, B., A. Nowrouzi, M. J. Hartl, K. Gärtner, T. Wiktorowicz, O. Herchenroder, S. Kanzler, W. Rudolph, A. Mergia, B. Wohrl, and A. Rethwilm. 2008. AZT-resistant foamy virus. *Virology* **370**:151-7.

Wiktorowicz T., K. Peters, N. Armbruster, AF.Steinert and A. Rethwilm Generation of an improved foamy virus vector by dissection of *cis*-acting sequences. *Journal of General Virology* 2009 *J Gen Virol* **90**, 481-487.

Gärtner K, Wiktorowicz T, Park J, Mergia A, Rethwilm A, Scheller C Accuracy estimation of foamy virus genome copying. *Retrovirology*. 2009 Apr **6**:6:32.

7.11 Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Rethwilm bedanken, der es ermöglicht hat, dass diese Dissertation unter seiner Betreuung am Institut für Virologie Universität Würzburg angefertigt werden konnte. Ich danke Ihm sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Unterstützung und sein ständiges Interesse und seine Diskussionsbereitschaft, die den Fortgang meiner Arbeit stets begleitet und gefördert haben.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Georg Krohne für sein Interesse an dieser Arbeit und seine Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Ich möchte mich ganz besonders bei Dr. Katrin Peters und bei Dr. Jochen Bodem für die Betreuung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Ihre wertvollen Hinweise haben mir weitergeholfen.

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts für Virologie und Immunbiologie für Hilfsbereitschaft und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein besonders großer Dank gilt Kathleen, Oana, Daniel, Falko, Nicole, Kathrin, Bianca und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Rethwilm und Scheller für ihre unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mein Studium ermöglicht haben und mich immer in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert haben.

Ich danke auch allen Freunden, Slava, Jakub und Ania, die mich in all den Jahren unterstützt haben. Danke, dass Ihr für mich da seid.