

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

**Charakterisierung eines Foamyvirus-Isolats des Klammeraffens  
- SFVspm -  
aus der Neuen Welt**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius - Maximilians - Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Leonore Thümer  
aus Chemnitz**

**Würzburg, April 2009**

**Referent:** Prof. Dr. med. Axel Rethwilm  
**Korreferent:** Prof. Dr. med. Detlev Schindler  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2010**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Foamyviren</b>	<b>4</b>
1.1.1	<i>Morphologie</i>	7
1.1.2	<i>Genomorganisation</i>	9
1.1.3	<i>Die foamyviralen Proteine</i>	11
1.1.4	<i>Die reverse Transkription</i>	15
1.1.5	<i>Der foamyvirale Replikationszyklus</i>	15
<b>1.2</b>	<b>Foamyviren in der Gentherapie</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Phylogenie der simianen Foamyviren und ihrer Wirte</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
2.1.1	<i>Chemikalien</i>	29
2.1.2	<i>Enzyme</i>	29
2.1.3	<i>Antibiotika</i>	29
2.1.4	<i>Kits</i>	29
2.1.5	<i>Größenstandards</i>	30
2.1.6	<i>Zelllinien</i>	30
2.1.7	<i>Virusisolat</i>	30
2.1.8	<i>Bakterienstämme</i>	30
2.1.9	<i>Plasmidvektoren</i>	30
2.1.10	<i>Oligonukleotide</i>	31
2.1.11	<i>Antikörper</i>	33
2.1.12	<i>Seren und Lymphozyten-DNA-Isolate aus Callithrix-Affen</i>	34
2.1.13	<i>Gewebeproben aus einem Callithrix-Affen</i>	34
2.1.14	<i>Weitere verwendete Materialien</i>	34

<b>2.2</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>35</b>
2.2.1	<i>Häufig verwendete Puffer und Lösungen .....</i>	35
2.2.2	<i>Bakterienkulturmedien.....</i>	35
2.2.3	<i>Zellkulturmedien.....</i>	36
2.2.4	<i>Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA.....</i>	36
2.2.5	<i>Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine.....</i>	36
2.2.6	<i>Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden .....</i>	37
<b>2.3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>38</b>
2.3.1	<i>Zellkulturmethoden.....</i>	38
2.3.1.1	<i>Kultivierung adhärenter Zelllinien.....</i>	38
2.3.1.2	<i>Virusinfektion adhärenter Zelllinien.....</i>	38
2.3.2	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	38
2.3.2.1	<i>DNA-Isolation aus Zellen .....</i>	38
2.3.2.2	<i>Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....</i>	38
2.3.2.3	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i>	39
2.3.2.4	<i>DNA-Agarosegelelektrophorese .....</i>	40
2.3.2.5	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....</i>	41
2.3.2.6	<i>TOPO-Klonierung .....</i>	41
2.3.2.7	<i>Transformation chemisch kompetenter Zellen.....</i>	41
2.3.2.8	<i>Plasmid-DNA-Vermehrung in Bakterien.....</i>	41
2.3.2.9	<i>Plasmid-DNA-Isolierung.....</i>	42
2.3.2.10	<i>Restriktionsverdau von DNA.....</i>	43
2.3.2.11	<i>Pheno-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol- Präzipitation von DNA.....</i>	43
2.3.2.12	<i>Ligation linearer DNA-Fragmente .....</i>	44
2.3.2.13	<i>Sequenzierung von DNA .....</i>	45
2.3.3	<i>Proteinbiochemische Methoden.....</i>	46
2.3.3.1	<i>Proteinexpression .....</i>	46
2.3.3.2	<i>Präparation von E.coli Lysaten unter nativen Bedingungen.....</i>	46
2.3.3.3	<i>Aufreinigung von Protein mit His-tag unter nativen Bedingungen.....</i>	46
2.3.3.4	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode.....</i>	46
2.3.3.5	<i>Erhöhung der Protein-Löslichkeit durch Urea .....</i>	47

2.3.3.6	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)</i>	47
2.3.3.7	<i>Coomassie-Färbung von Proteinen</i>	48
2.3.3.8	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Coomassie-Gel</i>	49
2.3.3.9	<i>Western Blot</i>	49
2.3.4	<i>Bioinformatik</i>	51
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung des SFVspm</b>	<b>52</b>
3.1.1	<i>Virusanreicherung in Zellkultur</i>	52
3.1.2	<i>DNA-Extraktion aus infizierten Zellen</i>	52
3.1.3	<i>Amplifikation eines SFVspm spezifischen Fragments</i>	53
3.1.4	<i>Klonierung und Sequenzierung des amplifizierten DNA-Fragments</i>	53
3.1.5	<i>Klonierung des Polymerase-Integrase-Fragments</i>	55
3.1.6	<i>Klonierung des Fragments PBS-Polymerase</i>	57
3.1.7	<i>Klonierung des LTR-Fragments</i>	59
3.1.8	<i>Klonierung des Integrase-LTR-Fragments</i>	61
<b>3.2</b>	<b>Molekulargenetische Analyse des SFVspm</b>	<b>63</b>
3.2.1	<i>Charakterisierung der LTR</i>	64
3.2.2	<i>Charakterisierung weiterer nichtkodierender Genomabschnitte</i>	65
3.2.3	<i>Charakterisierung von Gag</i>	67
3.2.4	<i>Charakterisierung von Pol</i>	72
3.2.5	<i>Charakterisierung von Env</i>	78
3.2.6	<i>Charakterisierung der akzessorischen Proteine Tas und Bet</i>	84
<b>3.3</b>	<b>Komplette Nukleinsäure-Sequenz des SFVspm</b>	<b>86</b>
<b>3.4</b>	<b>Phylogenetische Analyse des SFVspm</b>	<b>96</b>
3.4.1	<i>Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen SFVspm und FV</i>	96
3.4.2	<i>Phylogenetische Einordnung von SFVspm</i>	97

<b>3.5</b>	<b>Entwicklung eines diagnostischen Tests für SFVspm mittels Western Blot .....</b>	<b>99</b>
3.5.1	<i>Protein-Expression eines Abschnittes von gag zur Antigengewinnung .....</i>	99
3.5.2	<i>Antikörper gegen SFVspm-Gag-Antigen .....</i>	102
<b>3.6</b>	<b>Untersuchungen zum Nachweis einer Infektion mit SFV in Neuweltaffen .....</b>	<b>104</b>
3.6.1	<i>Test von Callithrix-Seren auf SFV-Immunität mittels Western Blot.</i>	105
3.6.2	<i>Test von Callithrix-Gewebe auf SFV-Infektion mittels PCR.....</i>	106
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>109</b>
4.1	<b>Molekulare und phylogenetische Analyse des SFVspm .....</b>	<b>109</b>
4.2	<b>Diagnostischer Test einer SFV-Infektion in Neuweltaffen .....</b>	<b>114</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>120</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

°C	Grad Celsius	ca.	circa
μ	Mikro	Ca	Karzinom
%	Prozent	CA	Kapsidprotein
∞	Unendlich	CAS	cis-acting RNA- Sequenzen
A	Adenin	CGD	Septische Granulomatose
A	Alanin	CLAD	Canine Leukozyten- adhäsionsdefizienz
a	antisense	CLL	Chronische lymphatische Leukämie
A	Ampere	COII	Mitochondriale Cytochromoxidase II
aa	Aminosäuren	CPE	zythopathogener Effekt
Abb.	Abbildung	cPPT	zentraler PPT
ADA	Adenosindesaminase	CTRS	zytoplasmatisches Ziel- und Retentionssignal
AIDS	Erworbenes Immun- defizienz-Syndrom	D	Asparaginsäure
ALV	Avian Leukosis Virus	Da	Dalton
APOBEC3G	Apolipoprotein B editing complex 3G	dest.	Destilliert
APS	Ammoniumpersulfat	D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
ATV	Trypsin-EDTA-Lösung	DMS	Dimer Linkage Site
bp	Basenpaar	DNA	Desoxyribo- nukleinsäure
<i>bel</i>	Gen des „between LTR“	dNTP	Desoxyribonukleotid- triphosphat
Bel	Protein des „between LTR“	dsDNA	doppelsträngige DNA
Bet	Protein „Bet“	E	Glutaminsäure
BFV	Bovines Foamyvirus		
BLV	Bovines Leukämievirus		
BSA	Bovines Serumalbumin		
bzw.	beziehungsweise		
C	Cystein		
C	Cytosin		

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

ECL	Enhanced Chemiluminescence	His	Histidin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	HIV	Humanes Immundefizienzvirus
EDTA	Ethylendiamin- tetraacetat	HRP	Meerrettichperoxidase
EFV	Equines Foamyvirus	HTLV	Humanes T-Zell- Leukämievirus
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	I	Isoleucin
<i>env</i>	Gen des Glykoproteins	IgG	Immunglobulin G
Env	Glykoprotein	in	Integrase-Gen
ER	Endoplasmatisches Retikulum	IN	Integrase-Protein
ERS	ER-Retentionssignal	IP	Interner Promoter
et al.	und andere	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D- thiogalactopyranosid
F	Phenylalanin	k	Kilo
Fc	Kristallines Fragment	K	Lysin
FCS	Fetales Kälberserum	KHK	Koronare Herzkrankheit
FFV	Felines Foamyvirus	l	Liter
FP	Fusionspeptid	L	Leucin
FV	Foamyviren	LB	lysogeny <u>b</u> roth
g	Gramm	LP	Leader Peptid
G	Glycin	LTR	Long terminal repeats
G	Guanin	LTR-P	Promoter der LTR
<i>gag</i>	Gen des gruppen- spezifischen Antigens	M	Meter
Gag	Protein des gruppen- spezischen Antigens	m	Milli
GR	Glycin-Arginin-reich	M	Methionin
GS	Größenstandard	MA	Molar
h	Stunde	MHR	Matrixprotein
H	Histidin	min	Major Homology Region
HFV	Humanes Foamyvirus	MLV	Minute
			Murines Leukämievirus



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

MMTV	Maus- Mammatumovirus	PK <i>pol</i>	Positivkontrolle Polymerase-Gen
MPMV	Mason-Pfizer Affenvirus	Pol PPP	Polymerase-Protein Proteinprobenpuffer
mRNA	Boten-RNA	PPT	Polypurintrakt
MSD	membrandurch- spannende Domäne	pro PRO	Protease-Gen Protease-Protein
n	nano	Q	Glutamin
N	Asparagin	R	Arginin
NAB	Nukleinsäure- Bindungsmotiv	R rER	redundant raues endoplasma- tisches Retikulum
NC	Nukleokapsidprotein		
NK	Negativkontrolle	RH	Ribonuklease H
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal	RNA RNase	Ribonukleinsäure Ribonuklease
NOD	Non-obese-Diabetes	rpm	Umdrehungen pro Minute
NTA	Nitrilotriessigsäure		
ORF	Offenes Leseraster	RSV	Rous Sarkomvirus
P	Prolin	RT	Reverse Transkriptase
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit	s s	Sekunde sense
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	S SA	Serin Spleißakzeptoren
PBS	Primerbindungsstelle	SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt
PCR	Polymeraseketten- reaktion	SD	Spleißdonatoren
PIC	Präintegrations- komplex	SDS SFV	Natriumdodecylsulfat Simianes Foamvirus
PES	Pol Encapsidation Sequenzen	SFVagm	FV der Grünen Meerkatze
PFV	Prototypisches Foamyvirus	SFVbab	FV des Pavians

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

SFVcap	FV des Kapuzineraffens		Ethylendiamin- tetraacetat
SFVcpz	FV des Schimpansen	TEMED	Tetramethyl- ethylendiamin
SFVcpz(hu)	Humanes FV des Schimpansen	TM	Transmembran- Protein
SFVgal	FV des Galagos		
SFVgor	FV des Gorillas	Tris	Tris-Hydroxymethyl- aminomethan
SFVmac	FV des Rhesusaffens		
SFVmar	FV des Büschelaffens	tRNA	Transfer-RNA
SFVora	FV des Orangutans	U	Selenocystein
SFVspm	FV des Klammeraffens	U	unique
SFVsqu	FV des Totenkopffaffens	U	Unit
		U	Uracil
S/SY	Substitutionen pro Site pro Jahr	UV	ultraviolett
		V	Valin
SU	Oberflächenprotein	V	Volt
T	Thymin	Vif	Viraler Infektiositätsfaktor
T	Threonin		
TAE	Tris-Hydroxymethyl- aminomethan/ Acetat/ Ethylendiamin- tetraacetat	VLP	Virus-ähnliche Partikel
		W	Tryptophan
		WDSV	Walleye dermales Sarkomvirus
tas	Transaktivator-Gen	X-SCID	X-Chromosom gebundene SCID
Tas	Transaktivator-Protein		
TCA	Trichloressigsäure	Y	Thyrosin
TE	Tris-Hydroxymethyl- aminomethan/		

## 1 Einleitung

Retroviren haben in den vergangenen Jahrzehnten in der medizinischen Forschung und in der Öffentlichkeit stark an Bedeutung gewonnen. Seit der Entdeckung des Humanen T-Zell-Leukämievirus (Poiesz, 1980) und des Humanen Immundefizienzvirus, HIV, (Barré-Sinoussi, 1983) sind Retroviren mit human-pathogenen Eigenschaften bekannt. Mit mehr als 33 Millionen Infizierten weltweit (UNAIDS, 2008) hat sich die Verbreitung des HIV und des Erworbenen Immundefektsyndroms (AIDS) als assoziierte Erkrankung zu einer Pandemie mit weitreichenden Auswirkungen entwickelt.

Erstmalig wurden Retroviren Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben, als 1904 Ellermann und Bang entdeckten, dass sich aviäre Leukämie durch zellfreie Filtrate auf Hühner übertragen ließ. Das infektiöse Agens, das dieser Beobachtung zugrunde lag, wurde Aviäres Leukosevirus genannt (Ellermann und Bang, 1908). 1911 konnte Rous die Transmission von Sarkomen auf gesunde Hühner durch zellfreie Extrakte nachweisen und auf das sogenannte Rous-Sarkoma-Virus zurückführen, wofür er 1966 schließlich mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde (Rous, 1911). Varmus und Bishop erhielten 1989 den Nobelpreis für Medizin für ihre Entdeckung des zellulären Ursprungs retroviraler Onkogene, nachdem sie gezeigt hatten, dass das Onkogen des Aviären-Sarkoma-Virus ein zelluläres Gen war, das das Virus während seiner Replikation aus der Wirtszelle aufgenommen hatte (Stehelin, 1976). Einen weiteren Nobelpreis auf dem Gebiet der Retroviren erhielten 1975 Baltimore und Temin, die das zentrale Dogma des genetischen Informationsflusses von DNA zu RNA widerlegen konnten, indem sie das Konzept der Reversen Transkription in die Molekularbiologie einführten (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). Schließlich wurden 2008 Barré-Sinoussi und Montagnier der Nobelpreis für die Entdeckung des Humanen Immundefizienzvirus verliehen (Barré-Sinoussi, 1983).

In den zurückliegenden Jahren ist das Interesse an Retroviren auf einem neuen Forschungsfeld gewachsen: Durch den Einsatz von Retroviren als Vektoren in der somatischen Gentherapie wird ein neuer therapeutischer Ansatz in der

Medizin propagiert, der sich momentan jedoch noch im Pilotstadium befindet. In experimentellen und klinischen Studien kommen neben replikationsinkompetenten Murinen Leukämieviren, Adenoviren und HI-Viren auch Foamyviren oder Kombinationen verschiedener Viren als Vektoren zum Einsatz (Kay, 2001). Hierbei zielen die Therapieansätze auf die Behandlung schwerwiegender Erkrankungen wie monogener Erbkrankheiten (beispielsweise SCID), Infektionskrankheiten (insbesondere HIV/AIDS), Neoplasien und kardiovaskulärer Erkrankungen.

Es wird deutlich, dass Retroviren auf verschiedenen Gebieten große Bedeutung für die Humanmedizin besitzen, sei es als tumorerzeugende Viren, als Erreger der pandemischen HIV-Infektion oder als Vektoren in der Gentherapie.

Retroviren sind RNA-Viren, die einen charakteristischen Replikationszyklus besitzen. Die Kombination aus reverser Transkription und DNA-Integration ist dabei das zentrale Merkmal der Retroviren: Im Laufe ihres Lebenszyklus wird mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase das RNA-Genom in DNA umgeschrieben. Diese wird als sogenanntes Provirus anschließend durch das Enzym Integrase in die zelluläre DNA integriert. In der Folge wird RNA transkribiert und im Anschluss entweder als genomische RNA zur Inkorporation in neuentstehende Viruspartikel oder als mRNA zur Translation viraler Proteine verwendet (Coffin, 1997).

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) wird in die zwei Unterfamilien *Orthoretrovirinae* mit sechs Genera und *Spumaretrovirinae* mit nur einem Genus unterteilt (Tabelle 1). Dieser Einteilung liegen Besonderheiten im Replikationszyklus der *Spumaretrovirinae* mit ihrem Vertreter der Foamyviren zu Grunde (Linial, 1999). Da sie starke Ähnlichkeiten zu den Hepadnaviren besitzen, werden sie oft als Bindeglied zwischen diesen und *Orthoretrovirinae* gesehen (Yu, 1996a).

Zudem können Retroviren auch anhand ihrer Genomstruktur eingeteilt werden. Einfache Retroviren verfügen nur über die Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env*, während komplexe Retroviren zusätzlich Gene für regulatorische Proteine besitzen (Coffin, 1997).

## EINLEITUNG

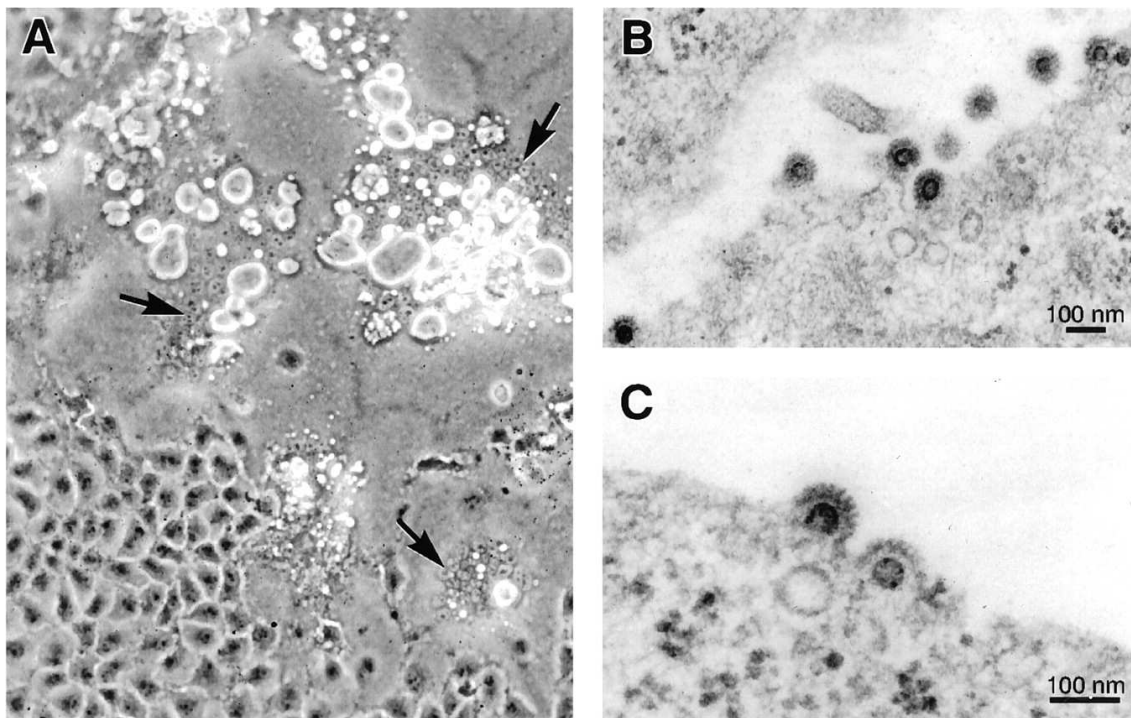
---

<b>Unterfamilie</b>	<b>Genus</b>	<b>Beispiele</b>	<b>Genom</b>
<i>Orthoretrovirinae</i>	$\alpha$ -Retroviren	Aviäres Leukosevirus (ALV) Rous-Sarkoma-Virus (RSV)	einfach
	$\beta$ -Retroviren	Mason-Pfizer-Affenvirus (MPMV) Maus-Mammatumovirus (MMTV)	einfach & komplex
	$\gamma$ -Retroviren	Murines Leukämievirus (MLV)	einfach
	$\delta$ -Retroviren	Humanes T-Cell-Leukämievirus (HTLV) Bovines Leukämievirus (BLV)	komplex
	$\epsilon$ -Retroviren	Walleye Dermates-Sarkoma-Virus (WDSV)	komplex
	Lentiviren	Humanes Immunodefizienzvirus (HIV)	komplex
<b><i>Spumaretrovirinae</i></b>	<b>Foamyviren</b>	<b>Prototypisches Foamyvirus (PFV)</b> <b>Simian Foamyvirus Typ spm (SFVspm)</b>	<b>komplex</b>

**Tabelle 1:** Systematik der *Retroviridae* (nach Rethwilm, 2003).

## 1.1 Foamyviren

Foamyviren sind die einzigen Vertreter der Unterfamilie der *Spumaretrovirinae*. Sie wurden in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmals beschrieben (Enders und Peebles, 1954), als man in kultivierten Zellen einen sogenannten zytopathogenen Effekt beobachtete, der sich durch zellfreies Agens übertragen ließ. Diesem verdanken die Foamyviren ihren Namen, denn infizierte Zellen weisen in ihrem Zytoplasma eine starke, schaumig erscheinende Vakuolisierung auf (englisch: foamy, schaumig) und lagern sich durch Zellfusion zu vielkernigen Synzytien zusammen (Hooks und Gibbs, 1975; Abb. 1).



**Abb. 1:** Foamyviren in Zellkultur.

A: Synzytien-Bildung in foamyviral infizierter Zellkultur. B und C: Elektronen-mikroskopische Aufnahme von foamyviral infizierten Zellen (aus: Tobaly-Tabiero, 2000).

Trotz dieser rasch eintretenden Zytopathogenität *in vitro* konnte bisher jedoch keine mit einer Foamyvirus-Infektion assoziierte Pathogenität *in vivo* nachgewiesen werden (Meiering und Linial, 2001). Foamyviren (FV) kommen in vielen verschiedenen Spezies vor. Zu ihren natürlichen Wirten zählen, neben anderen, Primaten, Katzen, Pferde und Rinder (Falcone, 2003; Saib, 2003). In

ihnen konnte eine Infektion mit FV mit hoher Prävalenz nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2). Bei Untersuchungen der Primatenart der Grünen Meerkatze zeigten sich beispielsweise bis zu 93% der Tiere eines Primatenzentrums infiziert (Schweizer, 1995). 1971 wurden schließlich sogar FV aus menschlichen Zellen isoliert. Die Zellen entstammten einem Nasopharynxkarzinom eines kenianischen Patienten und enthielten ein Virus, das bald als Humanes Foamyvirus (HFV) beschrieben wurde (Achong, 1971). Seitdem konnten in verschiedenen Studien vereinzelte FV-Infektionen des Menschen nachgewiesen werden (Schweizer, 1997), wobei die infizierten Individuen Risikogruppen angehörten, die in intensivem Kontakt zu Affen standen, insbesondere Tierpfleger, Laborpersonal und afrikanische Affenjäger. Diese Risikogruppen wiesen eine FV-Prävalenz von 1 - 5,3 % auf (Heneine, 1998; Wolfe, 2004; Switzer, 2004). Keine Studie, die methodisch unterschiedliche positive Testergebnisse zur Bestätigung einer Infektion machte, konnte jedoch eine allgemeine oder endemische (insbesondere ost- und zentralafrikanische) FV-Prävalenz in der humanen Bevölkerung beweisen (Schweizer, 1995; Ali, 1996). Als schließlich das Isolat des 1971 entdeckten HFV molekular charakterisiert und mit anderen bekannten FV verglichen wurde, lag aufgrund der bedeutenden Homologien des *pol*-Genes von HFV und SFVcpz von 95 % eine speziesübergreifende Infektion nahe (Herchenröder, 1994, Schweizer, 1995) und HFV wurde in SFVcpz(hu) und später in PFV (Prototype FV) umbenannt (Linial, 1999; Rethwilm, 2003). Dennoch ist die Gefahr einer Zoonose, insbesondere für Personen, die Primaten jagen, mit ihnen arbeiten oder als Haustiere halten, und die Gefahr einer potentiellen Endemie nicht zu vernachlässigen, insbesondere in Anlehnung an die Evolution der HIV-Pandemie (Sandstrom, 2000; Brooks, 2002; Murray und Linial, 2006; Boneva, 2007; Calattini, 2007). Die Transmission der FV erfolgt hauptsächlich über Speichel und Bissverletzungen (Meiering und Linial, 2001; Falcone, 2003), eine Übertragung ist jedoch auch über Blutprodukte und Xenotransplantationen möglich (Allan, 1998; Khan, 2006; Brooks, 2007). Eine sexuelle Transmission ist unwahrscheinlich (Switzer, 2004).

Spezies	Virusisolat	Jahr	Prävalenz in %
Rhesusaffe ( <i>Macaca mulatta</i> , <i>M. fascicularis</i> )	SFVmac (SFV-1, SFV-2)	1955	10-100
Grüne Meerkatze ( <i>Cercopthieus aethiops</i> )	SFVagm (SFV-3)	1964	28-93
Totenkopffaffe ( <i>Saimiri sciureus</i> )	SFVsqu (SFV-4)	1971	63
Galago ( <i>Galago crassicaudatus panganiensis</i> )	SFVgal (SFV-5)	1971	83
Schimpanse ( <i>Pan troglodytes</i> sp.)	SFVcpz (SFV-6, SFV-7)	1967	75-90
Klammeraffe ( <i>Ateles</i> sp.)	SFVspm (SFV-8)	1973	61
Kapuzineraffe ( <i>Cebus</i> sp.)	SFVcap (SFV-9)	1975	?
Pavian ( <i>Papio cynocephalus</i> )	SFVbab (SFV-10)	1975	34-100
Orangutan ( <i>Pongo pymaeus</i> )	SFVora (SFV-11)	1994	26-100
Gorilla ( <i>Gorilla gorilla</i> sp.)	SFVgor	1995	?
Katze ( <i>Felis</i> sp.)	FFV	1969	33-76
Rind ( <i>Bos</i> sp.)	BFV	1969	40-85
Pferd ( <i>Equus</i> sp.)	EFV	1999	?
Büschelaffe ( <i>Callithrix jacchus</i> )	SFVmar	1981	54
<b>Mensch</b>	<b>PFV (SFVcpz(hu), HFV)</b>	<b>1971</b>	<b>-</b>

**Tabelle 2:** Foamy-Virus-Infektionen in verschiedenen Spezies (Meiering und Linial, 2001).

Wie bereits erwähnt, konnten in keiner Studie Erkrankungen sicher mit einer FV-Infektion assoziiert werden. Im Verdacht standen vor allem Autoimmunerkrankungen, wie Thyreoiditis de Quervain, Morbus Basedow, Multiple Sklerose und Myasthenia gravis. Die Vermutungen konnten durch multiples Screening mittels verschiedener Assays (ELISA, Western Blot, PCR) widerlegt werden (Meiering und Linial, 2001). Das Charakteristikum einer Apathogenität *in vivo* macht FV zu interessanten Kandidaten für Vektoren in der Gentherapie (Russell und Miller, 1996).

FV haben einen weiten Zelltropismus. Da eine Vielfalt an Zellpopulationen *in vitro* infiziert werden kann, nimmt man an, dass der Rezeptor, der zur Adsorption des FV notwendig ist, ubiquitär vorkommt (Hill, 1999). *In vitro* führt eine FV-Infektion von Fibroblasten und epithelialen Zellen zur lytischen Destruktion, in infizierten Lymphozyten und Makrophagen ist das Virus jedoch meist persistierend und führt nur bei Aktivierung der Zellen zu einer Zythopathogenität (Mergia, 1996; Falcone, 1999; Meiering und Linial, 2002). *In*



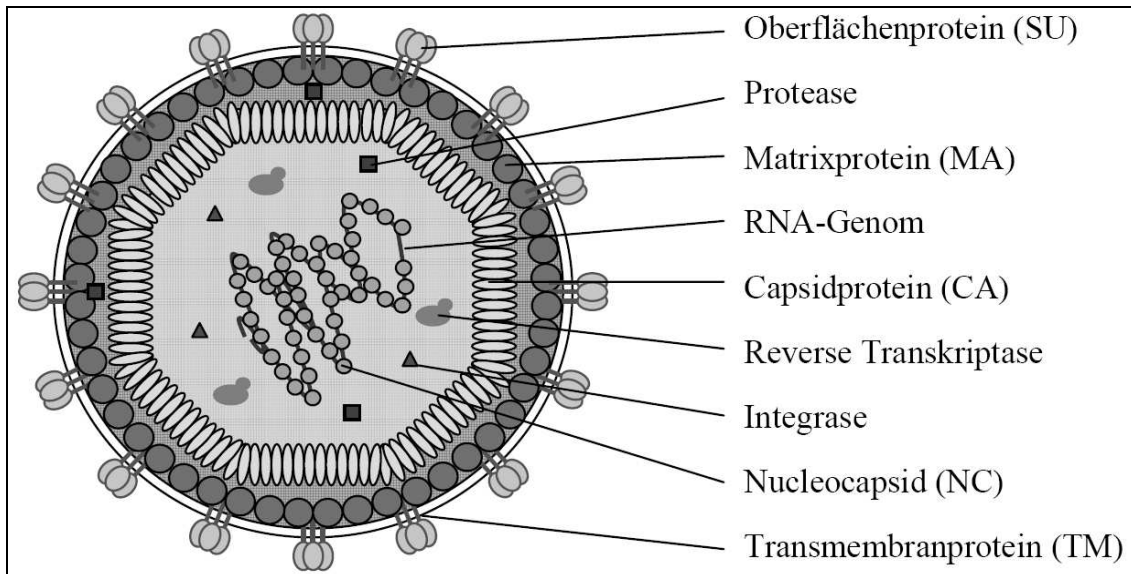
*vivo* verläuft eine Infektion latent und ist persistierend. FV-DNA konnte aus vielen Gewebearten isoliert werden, Hauptreservoir sind dabei Lymphozyten (von Laer, 1996). RNA konnte nur in Gewebe detektiert werden, das mit der Mundschleimhaut assoziiert war (Falcone, 1999; Murray, 2006 und 2008). Diese Beobachtung deckt sich mit Tatsache, dass FV vor allem über Speichel übertragen werden. Die endgültigen Zielzellen konnten jedoch nicht ermittelt werden.

FV sind genetisch außerordentlich stabil (Schweizer, 1999). Dies ist auf ihre sehr geringe Replikationsrate zurückzuführen und kann für phylogenetische Studien genutzt werden. So ließ sich anhand von Sequenzvergleichen zeigen, dass sich FV mit ihren Wirten gemeinsam entwickelten. Sie sind die ältesten bekannten RNA-Viren in Vertebraten: In Primatenpopulationen sind sie seit mindestens 65 Millionen Jahren präsent, in Altweltaffen seit mindestens 30 Millionen Jahren. (Schweizer und Neumann-Haefelin, 1995; Switzer, 2005)

### **1.1.1 Morphologie**

Foamyviren sind behüllte Viren von ca. 110 nm Durchmesser. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Partikel mit unreif erscheinendem Kern und prominenten Oberflächen-Molekülen zu erkennen (Fischer, 1998; Abb. 1). Außerdem konnte eine Auffälligkeit bezüglich der Virus-Knospung beobachtet werden: FV knospen im Gegensatz zu Orthoretroviren sowohl von der Plasmamembran als auch von intrazellulären Membranen (Lindemann und Goepfert, 2003).

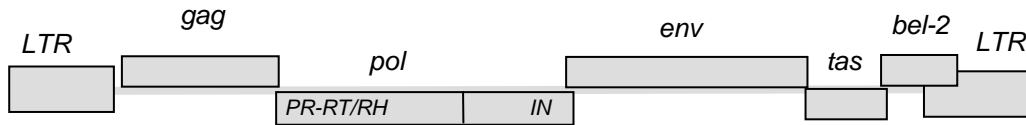
Abbildung 2 zeigt eine schematisierte Zeichnung eines Retrovirus: Ein Partikel besteht aus dem RNA-Genom, den strukturellen Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteinen, die die Nukleinsäure stabilisieren und die Enzyme Protease, Reverse Transkriptase / RibonukleaseH und Integrase einbetten, sowie einer Hüllmembran, die das Virus während der Knospung von der Wirtszelle erhält und in der sich Transmembran- und Surface-Proteine befinden (Coffin, 1997).



**Abb. 2:** Typischer Aufbau eines Orthoretrovirus (Peters, 2006).

Die Morphologie der Foamyviren unterscheidet sich aufgrund der Unreife der Partikel von jener der Orthoretroviren und kann bis heute nur in Ansätzen beschrieben werden: In der Hüllmembran befinden sich die glykosilierten und in Trimeren angeordneten Transmembran- und Surface-Proteine (TM und SU), (Linial und Eastmann, 2003). Im Virion ist neben den TM und SU jedoch auch das Leaderpeptid (LP) des Hüllproteins (Envelope-Protein, Env) vorhanden. Es ist ins Innere des Partikels gerichtet, wo es mit dem N-Terminus von Gag (Protein des gruppenspezifischen Antigens) interagiert (Lindemann und Goepfert, 2003). Das Gag-Protein der FV ist nicht in die typischen retroviralen Matrix-(MA), Kapsid-(CA) und Nucleocapsidproteine (NC) gespalten, sondern liegt in einer Mischung aus prozessierten und unprozessierten Gag-Proteinen im Partikel vor. Gag ist mit seinem N-Terminus dem LP zugewandt. Der C-Terminus von Gag ist nach innen orientiert und steht mit dem Genom in Kontakt. Mit dieser Struktur ähnelt das FV-Gag-Protein dem Core-Protein der Hepadnaviren. Die viralen Enzyme (Polymerase-Protein, Pol) liegen sowohl als unprozessierte Proteine als auch in den zwei Untereinheiten Protease–Reverse Transkriptase / RibonukleaseH (PRO-RT/RH) und Integrase (IN) im Partikel vor (Netzer, 1993; Flügel und Pfrepper, 2003). Foamyvirale Partikel enthalten quantitativ mehr RNA als DNA, das funktionelle Genom besteht aus DNA (Yu, 1999; Rethwilm, 2003).

### 1.1.2 Genomorganisation



**Abb. 3:** Genomorganisation des PFV.

FV weisen das längste Genom aller Retroviren mit Längen um 12000 bp auf. Das foamyvirale Genom ist entsprechend komplexer Retroviren organisiert. Es besitzt neben den Genen *gag*, *pol* und *env* zwei zusätzliche offene Leseraster *tas* und *bel-2*, die für die regulatorischen Proteine kodieren (Löchelt, 2003). Das RNA-Genom der FV liegt in zweifacher Kopie im Partikel vor und erfüllt alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA mit einer Cap-Struktur am 5'-Ende und einer Polyadenylierung am 3'-Ende. Die mRNA beginnt und endet mit der R-Region (R=redundant), die während der reversen Transkription eine entscheidende Rolle spielt und den Hauptpleißdonor enthält. Danach folgt die U5-Region (U=unique) mit Sequenzabschnitten, die für die Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA von Bedeutung sind. Stromabwärts schließt sich die 18 nt umfassende konservierte Primerbindungsstelle (PBS) an. An sie bindet während der reversen Transkription die zelluläre  $tRNA_{lys1,2}$ , die somit als Primer die Minusstrang-DNA-Synthese initiiert. Zwischen der PBS und der kodierenden Region befinden sich drei Sequenzblöcke zur Dimerisierung des Genoms (Dimer Linkage Site, DMS I-III,). Die folgenden offenen Leseraster (open reading frames, ORF) kodieren für Gag, Pol, Env, Tas und Bet (Abb. 3). Gag wird aus genomischer mRNA translatiert, Pol ebenso wie Env aus einer eigenen gespleißten mRNA. Das Tas-Transkript besteht aus gespleißter mRNA des ORF-1 (*bel-1*), Bet aus zweifach gespleißter mRNA aus Anteilen des ORF-1 (*bel-1*) und ORF-2 (*bel-2*). Außerdem existiert ein Env-Bet-Fusionsprotein mit unbekannter Funktion (Lindemann und Rethwilm, 1998). Abbildung 4 stellt die Genomexpression schematisch dar.

Innerhalb des ORF-2 liegt ein Polypurintrakt (PPT) mit mindestens 9 Adenosin- und Guanodin-Resten, der die Plusstrang-DNA-Synthese während der reversen Transkription initiiert. Dieser befindet sich genau vor Beginn der U3-Region.

Vier weitere purinreiche Sequenzabschnitte finden sich innerhalb des *pol*-Gens, wobei einer die identische Basenfolge des PPT aufweist und somit als zweiter, zentraler PPT (cPPT) die Plusstrang-DNA-Synthese initiieren könnte (Peters, 2008). Die U3-Region enthält Bindungssequenzen für die Integrase und den für die Genexpression wichtigen Promoter. Ein zweiter, interner Promoter ist stromaufwärts des ORF von *tas* gelegen (Löchelt, 1993). Der interne Promoter (IP) ist innerhalb der Retroviren einzigartig und steuert die Transkription der akzessorischen Proteine Tas und Bet (Löchelt, 1995 und 2003).

Während der reversen Transkription und somit zur Vorbereitung der Integration wird die U3-Region an das 5'-Ende der viralen DNA synthetisiert, die U5-Region an das 3'-Ende. Diese identische Abfolge der nicht kodierenden U3-, R- und U5-Regionen, die die kodierenden Abschnitte zu beiden Seiten flankieren, werden LTR (long terminal repeats) genannt (Rethwilm, 1995).

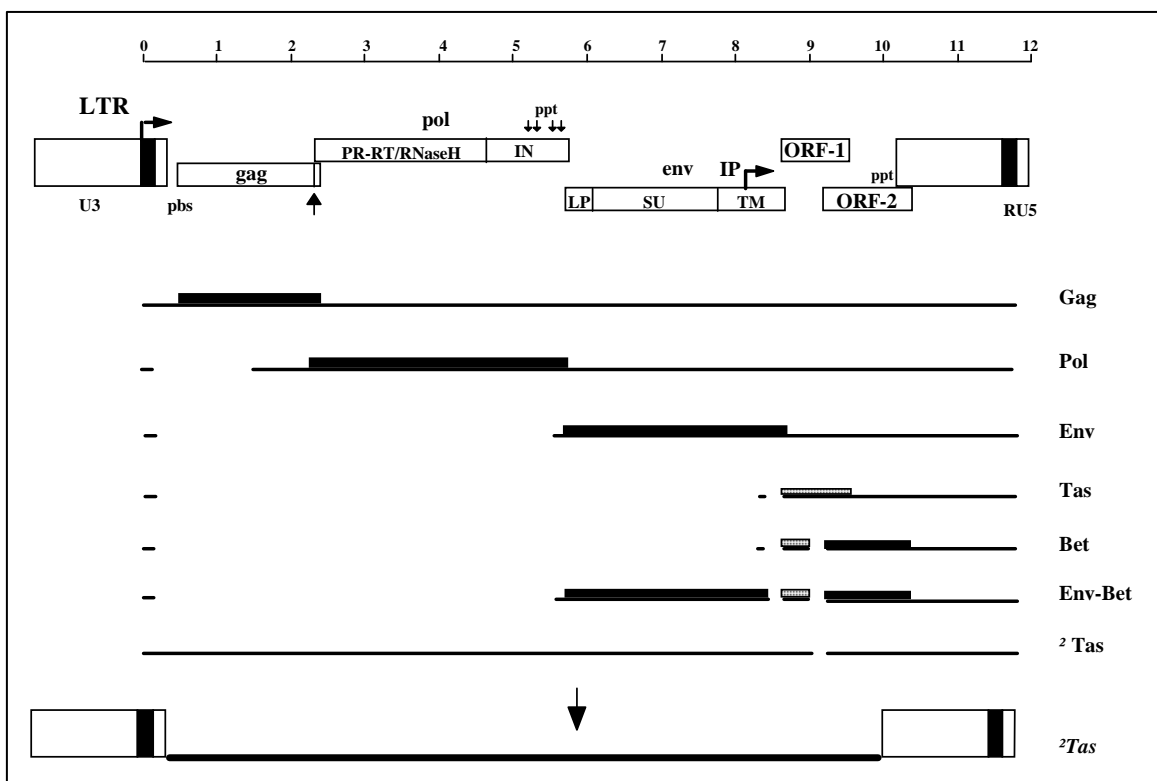


Abb. 4: Genomexpression von PFV (aus Rethwilm, 2007).

### **1.1.3 Die foamyviralen Proteine**

Die folgenden Charakteristika beziehen sich auf PFV, das prototypische Foamyvirus, das repräsentativ für die Gruppe der FV stehen soll.

**Gag** (gruppenspezifisches Antigen) kodiert für die Strukturproteine Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und Nukleokapsidprotein (NC). Das Gag-Protein hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von ca. 71 kDa. Im Gegensatz zu den anderen retroviralen Gag-Proteinen wird es nicht in die drei Untereinheiten MA, CA und NC gespalten. Anstelle dessen wird vom C-Terminus ein 3 kDa großes Peptid mittels der viralen Protease abgetrennt. Die Schnittstelle wurde mit der Sequenz AVN / TVT für PFV bestimmt und die Abspaltung des Peptids ist essentiell für die Infektiosität der Viren (Flügel und Pfrepper, 2003). In das Partikel werden prozessierte und unprozessierte Gag-Proteine (p68 und p71) im Verhältnis von circa 4 zu 1 integriert (Cartellieri, 2005b). Weitere putative Schnittstellen finden sich innerhalb Gags. Sie spielen wahrscheinlich während eines frühen Zeitpunkts der Infektion, insbesondere beim Uncoating, eine Rolle (Pfrepper, 1999). FV-Gag-Proteinen fehlen eine für Orthoretroviren typische Major Homology Region (MHR) und das Zinkfingermotiv, das als Verpackungssequenz und Bindungsstelle für das virale Genom dient. Stattdessen besitzen sie C-terminal drei Glycin-Arginin-reiche Boxen (GR-Boxen I-III): Die GR-Box I kann mittels eines Nukleinsäure-Bindungsmotivs (NAB) sowohl RNA als auch DNA binden, was dem Core-Protein der Hepadnaviren ähnelt. Die GR-Box II trägt ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), das für eine nukleäre Phase des Gag-Proteins verantwortlich ist. Die Funktion der dritten GR-Box ist unbekannt, bei FFV und EFV ist die GR-Box III nicht vorhanden (Schliephake und Rethwilm, 1994; Yu, 1996b; Stenbak und Linial, 2004). Am N-Terminus von Gag ist ein zytoplasmatisches Ziel- und Retentionssignal (CTRS) in Form eines konservierten Arginins lokalisiert, das für den zytoplasmatischen Kapsid-Zusammenbau von Bedeutung ist (Eastmann und Linial, 2001), sowie ein coiled-coil Motiv hydrophober Aminosäuren, über das einzelne Gag-Proteine miteinander interagieren können (Tobaly-Tapiero, 2001). Gag bindet C-terminal das virale Genom über das NAB, N-terminal interagiert es mit Env. Diese besondere Gag-Env-Interaktion ist wahrscheinlich

der Grund für die Unmöglichkeit einer FV-Pseudotypisierung, einer experimentellen Kombination von FV-Gag mit den Glykoproteinen anderer Retroviren (Cartellieri, 2005a). Ein YXXL Motiv innerhalb Gags ist für einen korrekten Kapsid-Zusammenbau erforderlich, ebenso ist es für die reverse Transkription und für die Infektiosität essentiell (Mannigel, 2007). Ein Myristilierungssignal als Zielsignal für die Plasmamembran existiert im Gegensatz zu den Orthoretroviren nicht. Es konnten jedoch sogenannte Late-Domänen, die mit den zellulären Exportmechanismen interagieren und somit eine Partikel-Abschnürung von der Plasmamembran gewährleisten, in Form eines PSAP-Motivs nachgewiesen werden (Stange, 2005).

**Pol** (Polymerase) enthält die Information für die Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase / RibonukleaseH (RT/RH) und Integrase (IN). Das Enzym RT/RH besitzt zwei enzymatische Aktivitäten, die für die charakteristische reverse Transkription verantwortlich sind. RT schreibt die genomische RNA in virale DNA um, RH entfernt aus RNA/DNA-Hybriden den RNA-Anteil. Das Enzym Integrase koordiniert die Integration der viralen DNA in die zelluläre DNA, während die Protease für die katalytische Spaltung des Gag- bzw. Pol-Vorläuferproteins zuständig ist (Netzer, 1993; Löchelt, 2003). Pol wird als 127 kDa großes Vorläuferprotein aus einer eigenen gespleißten mRNA translatiert und schließlich nicht wie bei anderen Retroviren in die einzelnen Enzyme PR, RT/RH und IN geschnitten. Nur die Integrase wird mittels viraler Protease abgespalten, der Rest fungiert als multifunktionelles Enzym. Die Schnittstelle weist bei PFV die Sequenz YVVN/CNTK auf. Weitere putative Schnittstellen sind beschrieben, deren Funktion ist jedoch unbekannt (Pfrepper, 1998). Die katalytischen Zentren der Enzyme sind in FV weitgehend konserviert: Das aktive Zentrum der Protease trägt das Motiv DSG. Das katalytische Zentrum der reversen Transkriptase in FV ist YVDD, im Gegensatz zu YMDD in anderen Retroviren (Kögel, 1995). Die RT der FV ist außerdem prozessiver, was den hohen DNA-Gehalt von FV-Partikeln erklären könnte (Rinke, 2002). Das Aminosäuren-Motiv DSHN wurde als katalytisches Zentrum der RH identifiziert (Boyer, 2004). Innerhalb der Integrase findet sich schließlich das konservierte und für die Integration essentielle DD<sub>35</sub>E Motiv wieder.

Außerdem enthält sie ein Zinkfingermotiv mit den Aminosäuren HHCC, das eine spezifische DNA-Bindung vermittelt, sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (Pahl und Flügel, 1995; An, 2008). Die Inkorporation von Pol ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutet werden sogenannte cis-acting RNA-Sequenzen (CAS) oder Pol Encapsidation Sequenzen (PES) in der U5-Region und im Pol-Gen der genomischen RNA, die zur Interaktion zwischen Pol und dem Genom führen, so dass das Genom ein Bindeglied zwischen Pol und Gag im Partikel darstellt (Peters, 2005).

**Env** (Envelope, Hülle) kodiert schließlich für die beiden Glykoproteine TM und SU und N-terminal für das Leaderpeptid (Lindemann und Goepfert, 2003). Das oberflächliche SU-Protein ist hauptsächlich für die Rezeptorerkennung an der Zielzelle verantwortlich, die transmembrane TM-Untereinheit leitet die Fusion der viralen Hüllmembran mit der zellulären Plasmamembran ein. Das Env-Vorläuferprotein von ca. 130 kDa Größe wird durch eine Furin-ähnliche zelluläre Protease in die Untereinheiten LP (18 kDa), SU (80 kDa) und TM (48 kDa) gespalten. Die Schnittstellen weisen für PFV die Sequenzen RIAR/SLRM und RKRR/SVDN auf. Alle drei Untereinheiten finden sich in gleichem Verhältnis im Virion (Wang und Mulligan, 1999; Bansal, 2000). Die LP-Untereinheit enthält eine Signalsequenz, die das foamyvirale Hüllprotein zum rER dirigiert (Goepfert, 1997). Das im Vergleich zu Orthoretroviren relativ lange Leaderpeptid (18 kDa) wird dort jedoch nicht degradiert, sondern bleibt Bestandteil des Partikels, wo es in der Hülle mit einer hydrophoben membrandurchspannenden Domäne (MSD1) verankert ist und mit seinem zytoplasmatischen Anteil mit Gag interagiert (Lindemann, 2001; Wilk, 2001). Am C-Terminus von Env befindet sich ein Dilysin-Motiv, welches ein ER-Retentionssignal (ERS) darstellt und für die Knospung von intrazellulären Membranen verantwortlich ist (Goepfert, 1997). Ein ERS fehlt bei BFV und EFV, es findet sich jedoch auch bei Hepadnaviren im Surface-Protein. Eine weitere Ähnlichkeit zu Hepadnaviren besteht in dem Vermögen, sogenannte Virus-ähnliche Partikel (Virus-like particles, VLP) zu bilden und extrazellulär freizusetzen (Eastman und Linial, 2001; Stanke, 2005). Des Weiteren wurden

innerhalb des TM eine membrandurchspannende Domäne und das hydrophobe Fusionspeptid identifiziert (Lindemann und Goepfert, 2003).

Das **Tas**-Protein mit einer Größe von ca. 36 kDa ist ein Transaktivator der Transkription, indem es an den internen Promoter (IP) und den LTR-Promoter (LTR-P) der U3-Region bindet. Innerhalb der FV bestehen keine bedeutenden Sequenzhomologien, es konnten jedoch eine N-terminale DNA-interagierende Domäne und eine C-terminale Aktivierungsdomäne identifiziert werden. Sie sind durch die Sequenz eines nukleären Lokalisationssignals (für PFV KPRQKRPRRR) voneinander getrennt (Löchelt, 2003). Tas Bindungsstellen konnten circa 25 nt langen Sequenzabschnitten im IP und LTR-P zugeschrieben werden, die jedoch unterschiedliche Sequenzen aufweisen (Kang, 1998). Der IP hat eine höhere Affinität zu Tas, zudem besteht eine basale Grundaktivität. Der LTR-P wird schließlich bei ausreichender Menge an Tas verstärkt genutzt. Die Präsenz eines IP unterscheidet FV von anderen Retroviren, ähnelt jedoch einigen DNA-Viren. Die beschriebene Regulation der Transkription könnte erklären, warum eine FV-Infektion latent verläuft.

Die Aktivität des IPs führt auch zur Synthese von **Bet** RNA und Protein. Die Funktion von Bet wurde als APOBEC3 inhibierend ähnlich zum Vif-Protein von HIV beschrieben (Löchelt, 2005; Russell, 2005). APOBEC3 ist ein zelluläres Protein, das während der reversen Transkription die DNA des replizierenden Virus deaminiert, sowie die cDNA-Synthese und Integration hemmt. Es besitzt somit eine antivirale Aktivität und wird als Abwehrmechanismus der Zelle interpretiert. In replizierenden HI-Viren bindet das regulatorische Protein Vif an APOBEC3G und leitet dessen proteosomalen Abbau ein (Holmes, 2007). In Foamyviren wirkt Bet als Gegenspieler von APOBEC3 jedoch über einen anderen Mechanismus: Bet induziert nicht wie Vif bei HIV die Degradierung von APOBEC3, sondern verhindert dessen Dimerisierung, und somit eine Inkorporation in virale Partikel (Perkovic, 2009). Weitere Funktionen des Bet-Proteins können in der Regulierung der Expression und Partikel-Freisetzung und in der Inhibition einer Superinfektion liegen (Meiering und Linial, 2002). Bet weist nur sehr geringe Homologien innerhalb der FV auf, so dass keine charakteristischen Motive identifiziert werden konnten.



#### **1.1.4 Die reverse Transkription**

Die reverse Transkription ist ein charakteristisches Merkmal der Retroviren (Coffin, 1997) und findet sich nur noch bei den Hepadna- und Caulimoviren (Summers und Mason, 1982). Das retrovirale Genom enthält dazu charakteristische Sequenzen, die einzig eine Bedeutung während der reversen Transkription besitzen. Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt die reverse Transkription kurz erläutert werden.

Zu Beginn der reversen Transkription bindet eine zelluläre tRNA an die PBS des RNA-Genoms und dient als Primer für die DNA-Synthese. Anschließend wird durch die RT die stromaufwärts gelegene U5- und R-Region als Minusstrang-DNA synthetisiert und der RNA-Anteil des RNA/DNA-Hybrids mittels RH entfernt. Danach erfolgt ein Matrizenwechsel: Die neu synthetisierte R-Region bindet an die am 3'-Ende liegende R-Region der genomischen RNA. Von dort ausgehend wird nun das gesamte Genom des Virus bis zur PBS als Minusstrang-DNA synthetisiert, die RNA wird wieder durch die RH entfernt, der Polypurintrakt kurz vor der 3'-LTR bleibt jedoch stehen. Dieser dient als Ausgangspunkt der Plusstrang-DNA-Synthese mittels einer zellulären DNA-Polymerase. Danach findet ein zweiter Matrizenwechsel statt und die neu synthetisierte PBS bindet an die PBS in der Minusstrang-DNA. Von dort kann nun das restliche Genom als Plusstrang-DNA geschrieben werden und das gesamte Genom liegt als doppelsträngige DNA (dsDNA) vor. Sie wird an beiden Seiten von den identischen LTRs flankiert. Diese sind essentiell für die Integration und Transkription des Provirus.

#### **1.1.5 Der foamyvirale Replikationszyklus**

Der Replikationszyklus der FV ist noch nicht vollständig geklärt. Er unterscheidet sich in wichtigen Punkten von jenem der Orthoretroviren und ähnelt andererseits jenem der Hepadnaviren. Dies führte schließlich zur Klassifikation einer eigenen Unterfamilie innerhalb der Retroviren. Der bedeutendste Unterschied liegt im Zeitpunkt der reversen Transkription: Bei Orthoretroviren findet sie zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion statt (während des Uncoatings), bei FV jedoch – ähnlich wie bei Hepadnaviren – zu einem

späten, größtenteils wahrscheinlich während des Zusammenbaus der neuentstehenden Partikel (Moebes, 1997; Rethwilm, 2003; Delelis, 2003).

Zu Beginn einer Infektion steht die rezeptorvermittelte Adsorption des FV an die Wirtszelle. Der Rezeptor scheint ubiquitär vorzukommen, da bisher keine Zelllinie bekannt ist, die nicht infiziert werden konnte. Es folgt die Penetration über einen pH-abhängigen Endozytoseweg (Pietschmann, 2000; Picard-Maureau, 2003). Im Verlauf des Uncoatings wird das Gag-Protein wahrscheinlich in kleinere Untereinheiten prozessiert (Pfrepper, 1999; Flügel und Pfrepper, 2003) und das Kapsid mit dem bereits revers transkribierten DNA-Genom als Präintegrationskomplex (PIC) entlang des Mikrotubulsystems zum Nukleus transportiert (Petit, 2003; Lehmann-Che, 2005). Mithilfe der Integrase wird das Genom anschließend in die zelluläre DNA integriert (Enssle, 1999; Juretzek, 2004). Das Provirus ist Ausgangspunkt der Transkription. Diese steht unter der Kontrolle des IP: Bei geringer Grundaktivität des IP werden zunächst Tas- und Bet-mRNA transkribiert und translatiert, so dass Tas den LTR-Promoter und schließlich die Transkription von genomischer RNA, sowie gespleißter mRNA von Pol und Env aktivieren kann (Löchelt, 2003). Gag- und Pol-Proteine werden im Zytoplasma translatiert, Env-Proteine im rER. Der Partikel-Zusammenbau ist noch nicht gut verstanden: Das Kapsid formiert sich aufgrund eines zytoplasmatischen Ziel- und Retentionssignals (CTRS) im Zytoplasma, wo ebenfalls eine Interaktion zwischen Gag und dem viralen Genom über das Nukleinsäure-Bindungsmotiv (NAB) der GR-Box II stattfindet. Die Inkorporation von Pol-Proteinen erfolgt wahrscheinlich über Bindung von Pol an das virale Genom, so dass das Genom als Brückenmolekül zwischen Gag und Pol fungiert (Heinkelein, 2002; Linial und Eastmann, 2003; Yu, 2006; Peters, 2008). Vorgeformte Kapside werden anschließend zum rER transportiert und erhalten über Gag-Env-Interaktionen die Glykoproteine (Lindemann und Goepfert, 2003). FV-Partikel knospen sowohl von intrazellulären Membranen als auch direkt von der Plasmamembran. Dafür verantwortlich sind wahrscheinlich das ER-Retentionssignal von Env und die Late-Domänen innerhalb Gags.

Erstaunlich ist, dass circa 20 % der extrazellulären Virus-Partikel ein DNA-Genom aufweisen, so dass angenommen werden muss, dass die reverse Transkription während des Partikel-Zusammenbaus stattfindet. Experimente, die die RT mittels Azidothymidin zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion hemmten, bestätigten diese Vermutung und zeigten, dass das infektiöse Genom DNA ist (Moebes, 1997; Yu, 1999). Ebenso erstaunlich ist, dass nur 1 – 10 % der infektiösen Partikel außerhalb der Zelle anzutreffen sind. Diese ausgeprägte Zellassoziation entspricht der Beobachtung einer Zell-zu-Zell-Ausbreitung mittels Synzytienbildung. In relativ hoher Zahl sind zudem intrazelluläre Partikel, die ein DNA-Genom assoziiert mit Gag- und Pol-Proteinen, aber ohne Env-Proteine enthalten, vorhanden. Sie können in das zelluläre Genom reintegrieren und zu multiplen Provirus-Kopien führen. Dabei könnte das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von Gag eine Rolle spielen. Diesen Prozess der Retrotransposition findet man auch im Replikationszyklus der Hepadnaviren (Heinkelein, 2003).

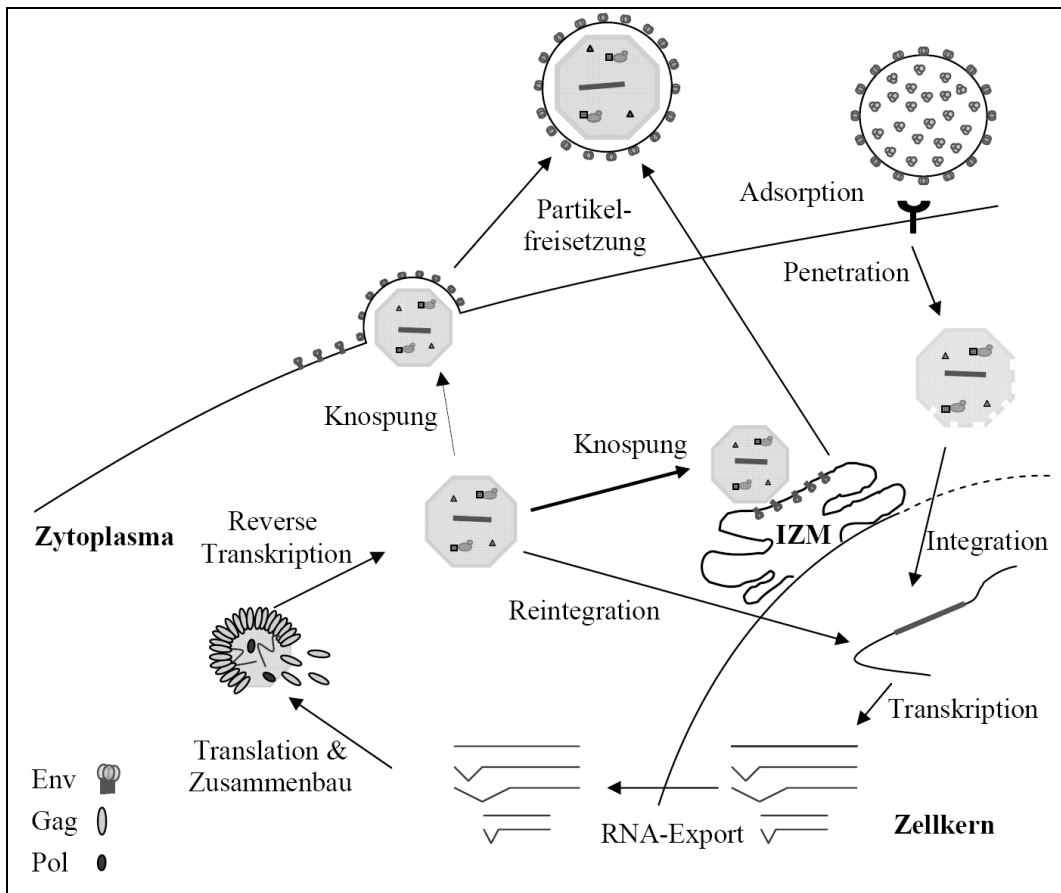


Abb. 5: Der Replikationszyklus von PFV (aus Peters, 2006).

## 1.2 Foamyviren in der Gentherapie

FV sind aufgrund ihrer morphologischen und replikativen Besonderheiten interessante Kandidaten für die Verwendung als Vektoren in der Gentherapie. Die Gentherapie wird seit Anfang der 90er Jahre mit Erforschung der molekularen und genetischen Ursachen von Erkrankungen als vielversprechender neuer Therapieansatz propagiert. Das zugrundeliegende Prinzip ist der Transfer von DNA oder RNA in Zellen oder Gewebe, um die Expression eines Gens zu modifizieren und somit einen Gendefekt zu therapieren. Es können grundsätzlich jedoch nur monogene Erkrankungen therapiert werden. Tabelle 3 zeigt Beispiele von Erkrankungen, zu denen momentan klinische Studien im Bereich der Gentherapie durchgeführt werden.

Neoplasien	Vaskuläre Krankheiten	Monogene Erbkrankheiten	Andere
Melanom	KHK	ADA/X-SCID	HIV
Glioblastom	pAVK	Cystische Fibrose	Rheumatoide Arthritis
CLL		Muskeldystrophie Duchenne	Colitis ulcerosa
Prostata-Ca		Fanconi-Anämie	Diabetes mellitus
Mamma-Ca		Epidermolysis bullosa	Multiple Sklerose
		Chronische Granulomatose	

**Tabelle 3:** Erkrankungen mit klinischen Studien in der Gentherapie  
(The Journal of Gene Medicine Clinical Trial Site, 2008).

Die größte Herausforderung der Gentherapie besteht in der Entwicklung von Vektorsystemen, die einen effizienten Gentransfer in die verschiedensten Gewebearten ermöglichen, ohne eine pathogene Wirkung im Wirt zu entfalten. Neben Plasmid-DNA kommen vor allem virale Vektoren zum Einsatz, unter denen Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und Retroviren die effizientesten Vektoren darstellen (Kay, 2001; Verma, 2005). Jedes Vektorsystem hat seine Vorteile und Limitationen: Adenoviren können eine Vielzahl an teilungsaktiven und teilungsinaktiven Zellen infizieren, diese werden jedoch relativ rasch vom Immunsystem des Wirts eliminiert. Adeno-assoziierte Viren weisen ein ähnliches Infektionsvermögen auf, sind jedoch in ihrer DNA-Kapazität eingeschränkt. Retroviren (wie MLV und Lentiviren) besitzen den großen Vorteil, dass sie ihr Genom stabil in die zelluläre DNA integrieren und somit zu

einer permanenten Genexpression führen. Allerdings benötigen MLV zur Transduktion eine mitotische Zellteilung. In klinischen Studien mit retroviralen Vektoren konnten zunächst erste gute Erfolge verzeichnet werden (Hacein-Bey-Abina, 2003), allerdings traten einige schwerwiegende unerwünschte Wirkungen auf: So entwickelten 3 von 28 mit einem MLV-Vektor therapierten X-SCID-Patienten drei Jahre nach der Behandlung eine T-Zell-Leukämie, die man auf eine Vektor-Integration in der Nähe von zellulären Protoonkogenen bzw. auf eine onkogene Wirkung des transferierten Gens zurückführte (Woods, 2006; Cavazzana-Calvo und Fischer, 2007). Rückschläge dieser Art betonen die Notwendigkeit der Weiterentwicklung von Vektoren, die die Vorteile verschiedener Systeme kombinieren und somit die biologische Sicherheit erhöhen. Ebenso sollten neue virale Vektoren, die sich in präklinischen Studien als vorteilhaft erwiesen haben, detaillierter erforscht werden. Zu diesen zählen die FV (Mergia und Heinkelein, 2003; Rethwilm, 2007). Tabelle 4 listet die idealen Eigenschaften eines Vektorsystems im Vergleich zu experimentell ermittelten Charakteristika von FV-Vektoren auf.

<b>Ideale Eigenschaften eines Vektors</b>	<b>Eigenschaften von FV-Vektoren</b>
▪ Effizientes apathogenes Verpackungssystem	Apathogen mit hoher Transduktionseffizienz Keine stabile Verpackungs-Zelllinie vorhanden
▪ Geringe Rekombinations-Wahrscheinlichkeit	Rekombination unwahrscheinlich
▪ Serumresistenz	Keine Elimination durch Immunsystem
▪ Pseudotypisierung mit zell-spezifischen Glykoproteinen	Keine Pseudotypisierung möglich, ubiquitär Rezeptor
▪ Stabiles Genom	Infektiöses DNA-Genom mit hoher Stabilität
▪ Präzise reverse Transkription vor Zell-Eintritt	RT bereits während des Zusammenbaus
▪ Unbeschränkter nukleärer Import	Transduktion postmitotischer Zellen unmöglich
▪ Isolierte Expressionskassette	Heterologer Promoter steuert Genexpression Stringente Termination der Transkripte
▪ Chromosomale Integration	Genom-Integration, kein Gen-Silencing
▪ Physiologische Expression des Transgens	Keine bevorzugte Integration vor Proto-Onkogenen / transkriptionsaktiven Bereichen

**Tabelle 4:** Vergleich der Anforderungen an virale Vektoren mit Eigenschaften der FV.

In den bisherigen präklinischen Studien mit foamyviralen Vektoren kommen vor allem replikationsdefiziente Vektoren zum Einsatz, die einen heterologen CMV Promoter zur Steuerung der Genexpression enthalten. Ihnen fehlt die genetische Information für Tas und Bet, so dass die regulatorische Funktion des Transaktivators ausgeschaltet ist und außerdem Kapazität für das zu transferierende Gen geschaffen wird. Einige Studien konnten bereits beeindruckende Ergebnisse liefern: So konnten humane hämatopoetische Stammzellen mit einer Effizienz von mehr als 80 % transduziert und in Knochenmark ablatierte NOD/SCID Mäuse transplantiert werden. Das transfizierte Gen konnte bis zu 6 Monate nach der Transplantation in allen hämatopoetischen Zelllinien nachgewiesen werden (Leurs, 2003; Josephson, 2002 und 2004). Eine autologe Transplantation FV-transduzierter hämatopoetischer Stammzellen in Hunde als Vertreter eines Großtiermodells wurde mit Transduktionsraten bis zu 19 % und günstigem Integrationsprofil beschrieben (Kiem, 2007). Studien zur Behandlung der Fanconi-Anämie Typ C mittels foamyviraler Vektoren zeigten erste vielversprechende Erfolge auf (Si, 2008), nachdem klinische Studien zu MLV-vermittelter Gentherapie fehlgeschlagen waren. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte erstmals ein genetischer Immundefekt mithilfe eines foamyviralen Vektors erfolgreich im Großtiermodell therapiert werden: Hunde mit Leukozytenadhäsionsdefizienz (CLAD), die FV-transfizierte hämatopoetische Stammzellen erhielten, zeigten eine komplette Remission des Phänotyps und waren auch zwei Jahre nach der Behandlung symptomfrei, ohne genotoxische Nebenwirkungen aufzuweisen (Bauer, 2008). Weiterhin konnten humane neurale Vorläufer-Zellen als weitere Zellpopulation mit FV transduziert werden, was vielversprechende Therapiemöglichkeiten bei neurologischen Erkrankungen eröffnen könnte (Rothenaigler, 2008).

Replikationskompetente Vektoren können dagegen vor allem in der Therapie maligner Erkrankungen eine Rolle spielen. Suizid-Gene werden in den Tumor inseriert, die für Enzyme kodieren, die inaktive Prodrugs lokal im Tumor in toxische Substanzen umwandeln (Young, 2006; Guinn, 2008). In FV replikationskompetenten Vektoren wird das zu transfizierende Gen in den ORF-

2 kloniert, da Bet *in vitro* zur Replikation nicht essentiell ist (Schmidt und Rethwilm, 1995; Mergia und Heinkelein, 2003). Eine Studie, in der Mäuse mit einer humanen Glioblastomzelllinie transplantiert und mit einem FV-Vektor infiziert wurden, konnte zeigen, dass gentherapierte Mäuse nach Prodrug-Applikation bessere Überlebenschancen hatten (Heinkelein, 2005).

Diese präklinischen Studien betonen das gentherapeutische Potential foamyviraler Vektorsysteme und den hohen Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Foamyviren (Williams, 2008; Vassilopoulos und Rethwilm, 2008).

### 1.3 Phylogenie der simianen Foamyviren und ihrer Wirte

Phylogenetische Analysen erforschen die Entwicklungsgeschichte und Verwandtschaftsverhältnisse der Arten. Diese können durch den Vergleich morphologischer, anatomischer oder physiologischer Merkmale, aber auch durch Sequenzvergleiche auf molekularer Ebene erfolgen.

Aufgrund der Annahme, dass Foamyviren sich mit ihren Wirten gemeinsam entwickelt haben und in Primaten seit mehr als 65 Millionen Jahren koexistieren (Switzer, 2005) soll an dieser Stelle die phylogenetische Einteilung der Primaten, der Wirte der simianen FV, anhand der folgenden Tabelle 5 kurz erläutert werden.

Unterordnung	Teilordnung	Familie
Feuchtnasenaffen ( <i>Strepsirrhini</i> )	Lemuren ( <i>Lemuriformes</i> )	
	Loriartige ( <i>Lorisiformes</i> )	Loris ( <i>Lorisidae</i> ) Galagos ( <i>Galagonidae</i> )
Trockenasenaffen ( <i>Haplorhini</i> )	Altweltaffen ( <i>Catarrhini</i> )	Geschwänzte Altweltaffen ( <i>Cercopithecoidea</i> )
		Menschenartige ( <i>Hominoidea</i> )
	Neuweltaffen ( <i>Platyrrhini</i> )	Krallenaffen ( <i>Callitrichidae</i> )
		Kapuzinerartige ( <i>Cebidae</i> ) Nachtaffen ( <i>Aotidae</i> ) Klammerschwanzaffen ( <i>Atelidae</i> ) Sakiaffen ( <i>Pitheciidae</i> )
	Koboldmakis ( <i>Tarsiiformes</i> )	

**Tabelle 5:** Systematik der Primaten

Phylogenetische Analysen zur Evolution der FV basieren ausschließlich auf Sequenzvergleichen und auf Nukleotid-Substitutionsraten, der sogenannten Molecular Clock. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, den Zeitpunkt der Aufspaltung in die einzelnen Arten zu bestimmen. In phylogenetischen Stammbäumen liegen zwei Arten bei einer hohen Anzahl an Sequenzhomologien näher beieinander und sie sind näher verwandt. Wenn sich die Stammbäume von artspezifischen Viren und ihren Wirten ähneln, so spricht dies für eine gemeinsame Evolution und für eine vertikale Transmission. Auch ähnliche Substitutionsraten lassen



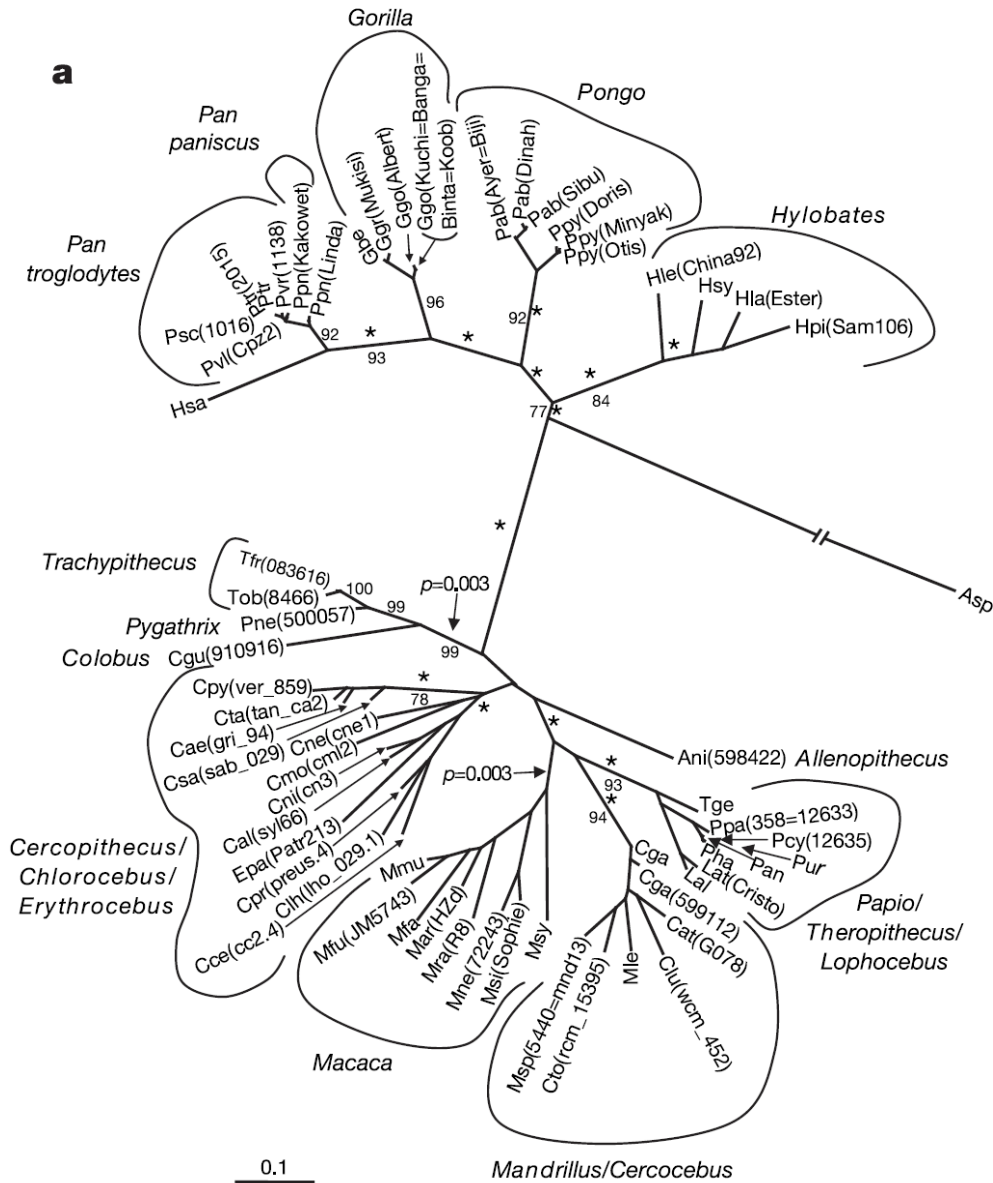
auf eine gemeinsame Evolution schließen. Unterschiedliche Substitutionsraten spiegeln dagegen eine hohe Divergenz zwischen zwei Arten bzw. zwischen Virus und Wirt wider und sprechen für eine horizontale, also speziesübergreifende Transmission. Die Molecular Clock ist abhängig von der Übertragungshäufigkeit und vor allem von der Replikationsrate des Virus. RNA-Viren besitzen aufgrund der hohen Fehlerraten ihrer Polymerasen hohe Mutationsraten. Dies gilt jedoch nur für hohe Replikationsraten; bei latenter Infektion, das heißt bei geringer Replikationsrate, treten weniger Mutationen auf und die Substitutionsrate gleicht sich jener des Wirtes an.

Schweizer und Neuman-Haefelin hatten zunächst anhand eines phylogenetischen Stammbaumes, der auf einer 425 bp langen *pol*-Sequenz basierte, eine Einteilung der FV in vier große Cluster propagiert: FV der Asiatischen Altweltaffen mit SFVmac, FV der Afrikanischen Altweltaffen mit SFVagm, FV der Menschenartigen mit SFVcpz und PFV, und schließlich als divergentestes Cluster die FV der Neuweltaffen mit SFVspm (Schweizer und Neumann-Haefelin, 1995).

Switzer et al. verglichen später die Stammbäume der simianen FV und der Primaten und schlossen aufgrund ihrer Ähnlichkeiten auf eine Ko-Evolution zwischen Virus und Wirt (Switzer, 2005). Die phylogenetischen Analysen der Primaten basierten auf Sequenzvergleichen der mitochondrialen Cytochromoxidase II (COII), die der SFV auf Vergleichen einer 425 bp langen Sequenz des *pol*-Gens. Diese Sequenz war auch von SFVspm bekannt und stellte die einzige bekannte Sequenz eines Neuweltaffen-FV dar. Sie konnte jedoch nicht in die stammesgeschichtlichen Auswertungen einbezogen werden, da sie keine zuverlässige Outgroup darstellte. Demzufolge konnte nur die Phylogenie der Altweltaffen-FV untersucht werden.

Im phylogenetischen Primaten-Stammbaum Switzers (Abb. 6a) sind drei große Gruppen zu erkennen: Die Gruppe der Geschwänzten Altweltaffen (*Cercopithecoidea*) umfasst, neben anderen, den Makaken (*Macaca*), die Grünen Meerkatze und den Pavian (*Papio*), die Gruppe der Menschenartigen (*Hominoidea*) beinhaltet, neben anderen, den Schimpansen (*Pan*), den Orangutan (*Pongo*) und den Gorilla (*Gorilla*). Beide Gruppen gehören der

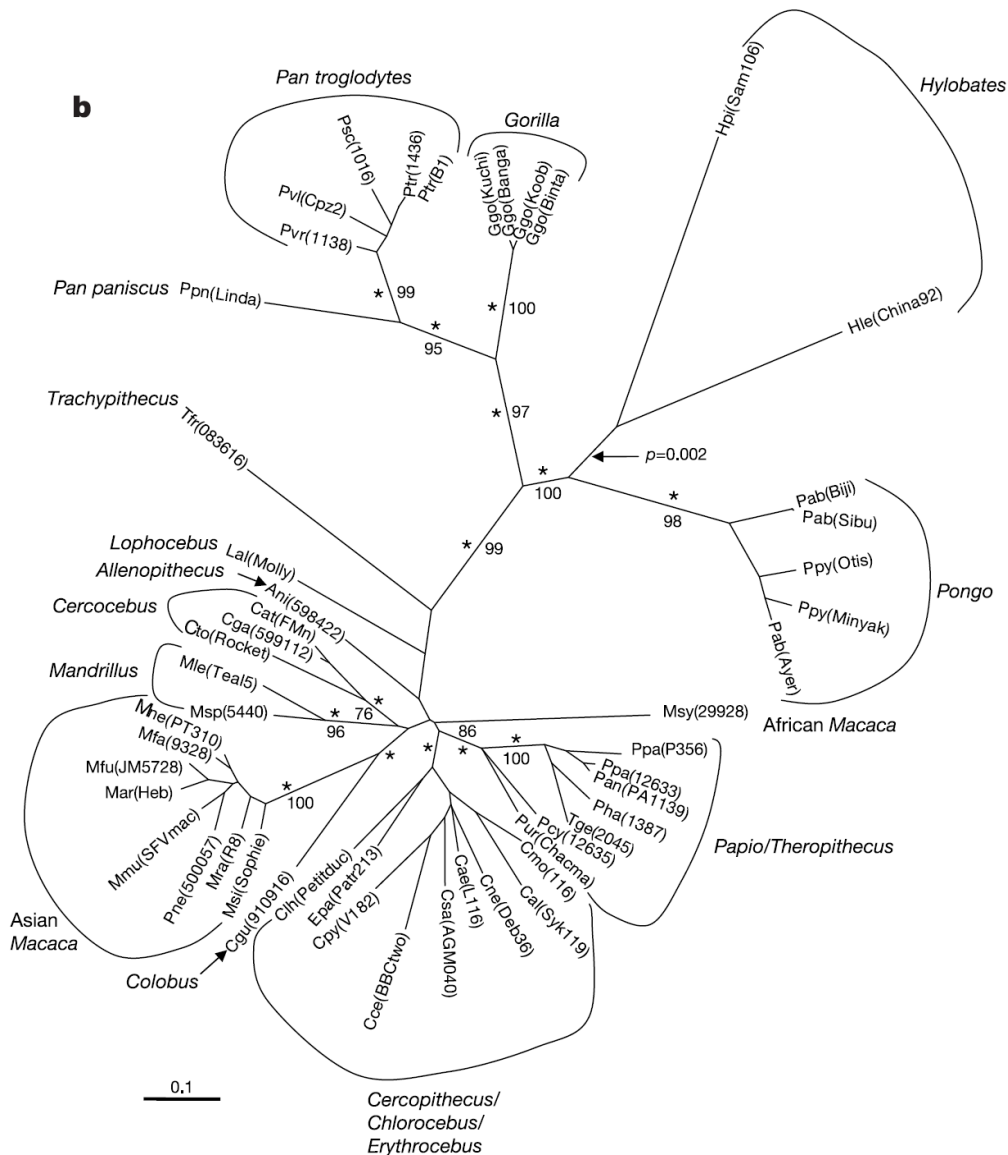
Teilordnung der Altweltaffen an. Schließlich findet sich separat stehend der Klammeraffe (*Ateles*, *Asp*) als einziger Vertreter der Teilordnung der Neuweltaffen. Dies spiegelt die große evolutionäre Divergenz zwischen Altweltaffen und Neuweltaffen wider.



**Abb. 6a:** Phylogenetischer Stammbaum der Primaten. Die Phylogenien basieren auf der Sequenz der COII, die sich als Marker für Primaten-Phylogenien durchgesetzt hat. Maximum-likelihood Methode. 1000 Bootstraps. (Aus: Switzer et al. 2005)

Analog zum Primatenstammbaum können die SFV, von denen jedoch nur die Altweltaffen-FV berücksichtigt sind, nach Switzer in zwei große Cluster

eingeteilt werden (Abb. 6b): Eines umfasst die FV der Geschwänzten Altweltaffen (*Cercopithecoidea*) mit SFVmac des Makaken (*Macaca*), SFVagm der Grünen Meerkatze (*Chlorocebus*) und SFVbab des Pavians (*Papio*), das andere Cluster schließt die FV der Menschenartigen (*Hominoidea*) mit SFVcpz des Schimpansen (*Pan*), SFVora des Orangutans (*Pongo*) und SFVgor des Gorillas (*Gorilla*) ein. Der Stammbaum der Primaten-Foamyviren besitzt somit einen sehr ähnlichen Aufbau im Vergleich zum Stammbaum ihrer Wirte, was als auf eine gemeinsame Evolution deutet.



**Abb. 6b:** Phylogenetischer Stammbaum der FV. Die Phylogenien basieren auf einer 425-bp langen Sequenz des *pol*-Gens der FV. Maximum-likelihood Methode. 1000 Bootstraps. (aus Switzer, 2005).

Mithilfe von phylogenetischen Stammbäumen und Berechnungen der Molecular Clock konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich Neuweltaffen von Altweltaffen vor circa 33 - 43 Millionen Jahren voneinander trennten (Schrago und Russo, 2003; Glazko und Nei, 2003; Steiper und Young, 2006). Da Südamerika bereits vor circa 130 Millionen Jahren durch die Kontinentaldrift von Afrika getrennt worden war, erfolgte die Besiedlung des südamerikanischen Kontinents, dem Lebensraum der Neuweltaffen, durch Primaten wahrscheinlich nach einer Transatlantik-Überquerung auf treibenden Inseln bzw. Flößen (Houle, 1999).

Switzer et al. konnten die Divergenzzeitpunkte für Primaten und der simianen FV mit ähnlichen Zeiten ermitteln: So wurde die Aufspaltung in Geschwänzte Altweltaffen und Menschenartige bzw. ihrer FV sowohl für Wirt als auch Virus auf einen Zeitpunkt vor circa 30 Millionen Jahren berechnet. Die Substitutionsraten der simianen COII bzw. der SFV wurden auf  $1,16 \pm 0,35 \times 10^{-8}$  bzw.  $1,7 \pm 0,45 \times 10^{-8}$  Substitutionen pro Site pro Jahr (S/SY) geschätzt, womit beide Raten sich annäherten. Dies ist die niedrigste Substitutionsrate, die für RNA-Viren beschrieben wurde, und ähnelt jener der DNA-Viren ( $10^{-7}$  bis  $10^{-8}$  S/SY) und der endogenen Retroviren ( $10^{-9}$  S/SY). Diese Studien zur Evolution der FV sprechen deutlich für eine gemeinsame Entwicklung zwischen Wirt und Virus und verweisen auf eine Existenz der FV über Jahrmillionen, in Altweltaffen über 30 Millionen Jahre, in Primaten über 65 Millionen Jahre und aufgrund ihres Vorkommens in anderen Säugetieren vielleicht sogar schon in deren Vorfahren über 100 Millionen Jahre (Switzer, 2005). FV stellen somit die ältesten bekannten exogenen RNA-Viren in Vertebraten dar.

Berücksichtigt man die molekularen und replikativen Charakteristika der FV, die in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurden, so entsprechen die hohe Prävalenz in einer Vielfalt von Wirten, die latente und persistierende Infektion, die niedrige Replikationsrate und die Ähnlichkeit zu DNA-Viren, wie den Hepadnaviren, den Voraussetzungen einer vertikalen Transmission. Dies steht im Gegensatz zu den meisten anderen RNA-Viren und auch Lentiviren, die sich durch spezies-übergreifende (horizontale) Transmission in ihren Wirten entwickelt haben und sogenannte Mosaik-Genome besitzen (Charleston, 2002; Salemi, 2003; Holmes, 2003).

## 1.4 Ziel der Arbeit

FV sind in vielen verschiedenen Primaten-Spezies beschrieben worden, wobei jede Art ihr spezifisches FV besitzt. Untersuchungen auf molekularer Ebene liegen jedoch nur für FV der Altweltaffen vor. Neuweltaffen sind die einzig wildlebenden Primaten auf dem amerikanischen Kontinent. Die Jagd auf Neuweltaffen in Lateinamerika hat in den letzten Jahren verheerende Ausmaße angenommen (Care for the wild, 2007). In der Rolle der Affen als Nahrungsquelle und Haustier steigt die Gefahr einer zoonotischen Infektion des Menschen mit FV, deren Folgen trotz der bisher nicht nachgewiesenen Pathogenität überwacht werden sollten.

Aufgrund ihres Potentials in der Gentherapie stehen FV im Licht wissenschaftlichen Interesses. Insbesondere kleine Primatenarten, wie der Neuweltaffe *Callithrix*, können als ideale Tiermodelle in die Forschung einbezogen werden. Das Verhalten einer natürlichen FV-Infektion muss zuvor jedoch erforscht werden. So sollten zur Surveillance einer Neuweltaffen-FV-Infektion bzw. Immunität geeignete diagnostische Methoden zur Verfügung stehen.

Schließlich sind FV aufgrund ihrer genetischen Stabilität interessante Marker für Untersuchungen der Phylogenie ihrer Wirte als auch ihrer selbst. FV der Neuweltaffen konnten bisher jedoch nicht sicher in phylogenetische Analysen einbezogen werden, da eine repräsentative Genomsequenz nicht bekannt war.

In der vorliegenden Arbeit sollen die molekularen Charakteristika des simianen Foamyvirus des Klammeraffens (SFVspm) analysiert werden, dessen Wirt *Ateles* der Unterordnung der Neuweltaffen angehört.

Zur Entschlüsselung der Genomsequenz ist die Klonierung und Sequenzierung des Virus erforderlich. Ausgehend von einer 425 bp langen bekannten Sequenz des *pol*-Gens soll in dieser Arbeit das komplette Genom des SFVspm entschlüsselt und charakteristische Sequenz- und Proteinmotive ermittelt werden.

Anhand phylogenetischer Analysen soll die Distanz des SFVspm zu anderen FV bestimmt und die Evolution des SFVspm erforscht werden.

Schließlich ist es Ziel der Arbeit, zum Nachweis einer Neuweltaffen-FV-Infektion bzw. Immunität Western-Blot und PCR basierte Methoden zu entwickeln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, insofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem, Fermentas, Merck, Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen EcoRI, HindIII, BamHI, PstI	NEB
Ribonuklease A	Roche
T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
Lysozym	NEB

#### 2.1.3 Antibiotika

	Stamm-Lösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Penicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml	100 µg/ml

#### 2.1.4 Kits

DNeasy Tissue Kit	Qiagen
Expand Long Template PCR System	Roche
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
TOPO XL Cloning Kit	Invitrogen
Champion pET Directional TOPO Expression Kit	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500	Macherey-Nagel
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Pierce

### **2.1.5 Größenstandards**

GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas

### **2.1.6 Zelllinien**

MRC-5 , Humane Fibroblasten, Institut für Virologie, Würzburg

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärenente Zellen.

### **2.1.7 Virusisolat**

Simian Foamyvirus Type 8, ATCC VR-940, Lot-Nummer 218093

### **2.1.8 Bakterienstämme**

One Shot TOP10 Chemically Competent *E.coli*, Invitrogen

BL21 Star (DE3) One Shot Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen

### **2.1.9 Plasmidvektoren**

#### **pCRII TOPO (Invitrogen)**

Der TOPO-Klonierungsvektor kodiert neben einem Ampicillinresistenz-Gen auch für ein Kanamycinresistenz-Gen zur Selektion eukaryotischer Zellen.

#### **pCR XL TOPO (Invitrogen)**

Der TOPO-Klonierungsvektor kodiert neben einem Kanamycinresistenz-Gen auch für ein Zeocin-Resistenzgen zur Selektion eukaryotischer Zellen.

#### **puc18 (Invitrogen)**

Der Klonierungsvektor kodiert für ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion eukaryotischer Zellen.

#### **pET102/D-TOPO (Invitrogen)**

Dieser Expressionsvektor erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit Thioredoxin und die Selektion transformierter Bakterien mit Ampicillin. Das



Fusionsprotein kann über die Histidin-Bindestelle im His-Patch-Thioredoxin oder über ein C-terminal lokalisiertes 6xHis-Tag aufgereinigt werden.

### 2.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Sigma-Genosys bezogen und auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt.

Position in SFVspm	Primer Name	O	Primer Sequenz (5' - 3')	Verwendung
370 / 11330	LTR s4	S	CACAGGTATACTATTTACAGTAG	Seq LTR
485 / 11447	LTR a1	A	GGGTGTCAGCTTCTCAAGCATACGCTAGC	Env PCR Seq ENV
960 / 11920	LTR s2	S	GCTGCGTCTAGAGTGAGACGGAACTC	Seq LTR
960 / 11920	LTR a2	A	GAGTTCCGTCTCACTCTAGACGCAGC	Seq LTR
1150 / 12110	LTR a4	A	GCTCTAACCTGCCTTCTCTCAGTTAGGG	Seq LTR
1245	PBS s	S	CRYRACARTTGGCGCCCAACGTGGGGCTGA	PBS PCR Seq
1330	LTR a5	A	CCATTACTTCCGCAGTACAGAAGTTCC	Seq LTR
1341	Gag expr s	S	CACCATGGCTCAAGGGAATCAACCTGAAC	Gag Topo Expression
1547	LTR a	A	CCCATTCTGGTTCGAGGTAAAGGATTTCC	LTR PCR
1593	LTR s	S	GGTTGTACTTTTAGACAAGCTCAAC	LTR PCR
1710	Pbs seq 1s	S	GGTTAACATTCAATCCTTTATCTGCAG	Pbs seq
1810	Pbs seq 4a	A	TCTTTGTTGTATAACTACATCAGCC	Pbs seq
2106	Gag expr a	A	CTACTGTATAACAGGCAGAACAGGTGGAGC WITH STOP	Gag Topo Expression
2180	Pbs seq 2s	S	CCCATTGCTCAAATAAAAGCTG	Pbs seq
2240	Pbs seq 3a	A	GCTGCAGCATGTTTAGCTACCCAC	Pbs seq
2830	Pbs seq 3s	S	CCTCGCTCTCAAGAACAGCAACCC	Pbs seq
2920	Pbs seq 2a	A	GGACCGCCTCCAAGTCTTTGAGGTC	Pbs seq
3368	Pol 200 s	S	AAGGAAGAAAAGTGGAAGCAGAAG	POL PCR
3440	Pbs seq pra	A	TTCTAATGGTGTAGGTTTATACCAGGG	Pbs seq
3740	Pbs seq 5a	A	TAGTAGATTGTCTTAACACCCC	Pbs seq
3840	Pbs seq 4s	S	CCATACCTTTGATAGCTGCCC	Pbs seq
3970	polseq	S	AATGGATAACAGCATTCACTTGGG	Seq POL
4230	Pbs seq 1a	A	CCGAGAAAGTTAACCTCATATCTGGC	Pbs seq
4730	Pr2 s	S	AGGCCACCAATTAAGTATATAGTCC	Seq POL

**MATERIAL UND METHODEN**

---

<b>Position in SFVspm</b>	<b>Primer Name</b>	<b>O</b>	<b>Primer Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
4750	Pol seq 2a	A	TTGGACTATATACTTTAATTGGTTGGCC	PBS PCR Seq POL
5410	Pol seq 1a	A	TTTATTGTATTA ACTGAATAACTACC	Seq POL
5462	Int s	S	AAATCCTTCAAGGAAATTTACC	IN PCR ENV PCR Seq ENV
5720	Int s3	S	GCCATGCCTGCAA ACTGATAGTAC	Seq ENV
5886	Int a	A	TAACCATGTAAAGCCTGTG	IN PCR POL PCR
6000	Sfv8-int	S	CCTCTGCACCTTTTGCTGATGGGGC	Seq ENV
6150	Seq env s1	S	GTGGTATCCATTATTGCCTACGGTTC	Seq ENV
6150	Seq env a4	A	GAACCGTAGGCAATAATGGATACCAC	Seq ENV
6490	Seq env a2	A	TTGCCTGCCTTGCCACAATTACC	Seq ENV
6610	Seq env s2	S	CAAGAAGAGGAACCTGGAAACATGG	Seq ENV
6950	Seq env s5	S	GGATTTAGTTAGAATTGTAGAGG	Seq ENV
7090	Seq env s6	S	CTGAAAGCATTGCTTCCAGCATGG	Seq ENV
7190	Seq env a6	A	GAGGAAGTTCAA AATCTAACATCAC	Seq ENV
7710	Seq env s8	S	GGCATAGTTCAGGTCAAATGCTC	Seq ENV
7850	Seq env s9	S	GTTACATCCTTATACCTGTAGAC	Seq ENV
7850	Seq env a9	A	GTCTACAGGTATAAGGATGTAAC	Seq ENV
8060	Seq env s12	S	GTATGGAGAATGTATGAGGGCCACTG	Seq ENV
8060	Seq env a12	A	CAGTGGCCCTCATACATTCTCCATAC	Seq ENV
8310	Seq env s13	S	GCTGGATATGCAATAACCAATTCTG	Seq ENV
8310	Seq env a13	A	CAGAATTGGTTATTGCATATCCAGC	Seq ENV
9200	Seq env s10	S	GGAATTCAAGTGAAGATCACTTC	Seq ENV
9200	Seq env a10	A	GAAGTGATCTTCACTTGAATTCC	Seq ENV
9300	Seq env a11	A	GAAAGCTGTTTCAGCCAATTTGC	Seq ENV
9860	Seq env s7	S	GGAAAAGTTCTTCCCAACACC	Seq ENV
9860	Seq env a7	A	GGTGTGGGAAGAACTTTTCC	Seq ENV
9980	Seq env a8	A	CCTGTGTGAGGTTGTATGCATGC	Seq ENV
10280	Seq env s3	S	ATTCAGGTCCCCTAGAGCAACTGGT	Seq ENV
10280	Seq env a3	A	ACCAGTTGCTCTAGGGGACCTGAAT	Seq ENV
10570	Seq env a5	A	GAGGAACATGCAAATAAGTTTGGT	Seq ENV
10730	Seq env a1	A	CCTGGTTCTCCATATACAGGAGGC	Seq ENV

Position in SFVspm	Primer Name	O	Primer Sequenz	Verwendung
10730	Seq env s4	S	GCCTCCTGTATATGGAGAACCAGG	Seq ENV
10890	Sfv-8-ltrseq a	A	ATAGGTTATAGGTAATTTACCTTC	Seq ENV
	Pol 41	S	TCAAGGGGACTAAGTTGAAAGCCCCTGGG	-
	Pol 571	S	TTAATACCACAAAATAGTACAATGAATAC	-
	Pol 800	S	TATTGGTTAACAGAATTTACTTGGC	-
	Pol 1081	S	TTTAATATTACTAAAGAAGGTCGTGGCC	-
	M13 forward (Invitrogen)	S	CTGGCCGTCGTTTTAC	Seq
	M13 reverse (Invitrogen)	A	CAGGAA ACAGCTATGAC	Seq

**Tabelle 6:** Oligonukleotide. O: Orientierung, A: Antisense, S: Sense, Seq: Sequenzierung.

### 2.1.11 Antikörper

Nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten primären AK sowie die Bedingungen, unter denen diese eingesetzt wurden.

AK	Spezifität	Tier	Hersteller	Verdünnung im Western Blot
Anti-Thioredoxin	Thioredoxin	Kaninchen	Sigma	1:5000
				1:10000
Anti-SFVspmGag	SFVspmGag	Kaninchen	Eurogentec	1:10000

**Tabelle 7:** Primäre Antikörper.

Es wurden folgende sekundäre Antikörper verwendet, um die oben angeführten primären Antikörper durch Enhanced Chemiluminescence nachzuweisen.

AK	Spezifität	Organismus	Hersteller	Gekoppelt an	Verdünnung im Western Blot
Esel Anti-Kaninchen	Kaninchen IgG	Esel	Dianova	HRP	1:5000
Protein G	Säugetier IgG	Streptococcus	Sigma	HRP	1:5000

**Tabelle 8:** Sekundäre Antikörper. HRP: Meerrettich-Peroxidase.

**2.1.12 Seren und Lymphozyten-DNA-Isolate aus Callithrix-Affen**

Die nachfolgenden Seren und Lymphozyten DNA-Isolate wurden durch die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Helmut Hanenberg (Universität Düsseldorf) und Prof. Dr. med. Peter Horn (Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt.

Affe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>DNA</b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Serum</b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

**Tabelle 9:** Seren und DNA aus Callithrix.

**2.1.13 Gewebeproben aus einem Callithrix-Affen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben der Leber, Milz und Mundschleimhaut des Callithrix-Affen wurden durch die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Helmut Hanenberg (Universität Düsseldorf) und Prof. Dr. med. Peter Horn (Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt.

**2.1.14 Weitere verwendete Materialien**

Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell
Pipetten	Gilson
Plastik Einwegmaterial	Eppendorf, Greiner, Falcon
Röntgenfilm X-ray Retina XBD	Fotochemische Werke GmbH
Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm)	Schleicher & Schuell
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen	Nunc
Zellkulturschalen	Costar, Greiner, Nunc

## 2.2 Puffer und Lösungen

### 2.2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

1M Tris-HCl	1M Tris; pH-Werte mit HCl einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0
10 % SDS	10% SDS ; pH 7,2 mit HCl einstellen
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O; 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,5 mM CaCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O; 1mM MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O
0,5 M EDTA pH 8,0	500 mM EDTA; pH 8,0 mit NaOH einstellen

### 2.2.2 Bakterienkulturmedien

5x LB-Medium	100 g LB Broth Base Lennox L (Invitrogen); 25 g NaCl; 5g α-D Glucose; H <sub>2</sub> O ad 1000 ml autoklavieren
LB-Agar	20 g LB Broth Base Lennox L; 20 g Agar; 5 g NaCl; H <sub>2</sub> O ad 1000 ml Autoklavieren

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter 60°C wurde das Antibiotikum Ampicillin zugegeben; Lagerung bei 4°C.

Ampicillin	100 mg/ml Ampicillin Natriumsalz steril filtrieren (0,2 µm Filter)
IPTG	1,19g IPTG; H <sub>2</sub> O ad 5 ml steril filtrieren (0,45 µm Filter)

### **2.2.3 Zellkulturmedien**

Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM)	D-MEM (Invitrogen) FCS (Biochrom, Berlin) 10%; Glutamat 0,03 % Penicillin 100 mg/l; Streptomycin 100 mg/l
ATV	137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 5 mM D-Glucose; 70 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 500 mg/l Trypsin

### **2.2.4 Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA**

50x TAE	2M Tris; 5,71% konzentrierte Essigsäure; 50 mM EDTA pH 8,0
6x DNA-Probenpuffer	0,125% Bromphenolblau; 40% Sucrose autoklavieren
Plasmidpräparationslösung I	50 mM Glucose; 10mM EDTA pH 8,0; 25 mM Tris pH 8,0; autoklavieren
Plasmidpräparationslösung II	0,2M NaOH; 1% SDS
Plasmidpräparationslösung III	3M NaAcetat; pH 5,4 mit konzentrierter Essigsäure einstellen; autoklavieren
TE/RNase	100 µl TE; 100 µg/ml RNase; H <sub>2</sub> O ad 1 ml
Tris/MgCl <sub>2</sub>	200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl <sub>2</sub> autoklavieren

### **2.2.5 Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine**

Lysozym-Stammlösung	10 mg/ml Lysozym
Lyse-, Wasch-, Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 2 - 250 mM Imidazol; pH 8,0 mit NaOH einstellen

Urea-Lysepuffer	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 8 M Urea; 0,05 % Tween pH 8,0 mit NaOH einstellen
Refolding Puffer	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM NaCl; 10 % Glycerol; 0,05 % Tween pH 8,0 mit NaOH einstellen
<b>2.2.6 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden</b>	
Proteinproben (2xPPP)	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 23,25% Glycerin; 10% β-Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau
Gelpuffer	3 M Tris base; 0,3% SDS pH 8,45 mit HCl einstellen
5x Kathodenpuffer	500 mM Tris; 500 mM Tricine; 0,5% SDS
10x Anodenpuffer	2 M Tris-HCl ; pH 8,9
Fixierlösung	40% Methanol; 10% Essigsäure; 50% H <sub>2</sub> O
Entfärbelösung	10% Methanol; 5% Essigsäure; 85% H <sub>2</sub> O
Blotpuffer	50 mM Tris; 40 mM Glycin; 0,037% SDS; 20 % Methanol
Ponceau S	0,1% Ponceau; 5% TCA
PBS-Tween	0,5% Tween-20 in PBS

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Zellkulturmethoden**

#### **2.3.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien**

Die verwendete Zelllinie wurde in DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen kultiviert. Adhärenente Zellen wuchsen in einem Monolayer auf dem Boden der Kulturflasche und mussten alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von 60-80 % gesplittet, das heißt verdünnt werden. Dazu wurde das alte Medium verworfen, die Zellen mit ATV gespült, gelöst und in einer Verdünnung von 1:3 oder 1:5 in frischem Medium aufgenommen.

#### **2.3.1.2 Virusinfektion adhärenter Zelllinien**

Bei einer Zell-Konfluenz von ca. 30 % wurde das Virusisolat nach Erneuern des Kulturmediums zur Zellkultur pipettiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kokultiviert. Die infizierten Zellen wurden weiterhin wie oben beschrieben kultiviert und gesplittet. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe frischer uninfizierter Zellen.

### **2.3.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.3.2.1 DNA-Isolation aus Zellen**

Adhärenente Zellen wurden mit ATV gelöst, in frischem Medium aufgenommen und anschließend 5 min lang bei 500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS gelöst. Gewebeproben wurden in Stücke von ca. 10 – 25 mg geschnitten. Aus der Zellsuspension bzw. den Gewebeproben wurde im Anschluss anhand des DNeasy Tissue Kit (Qiagen) DNA isoliert und in zwei Schritten in je 100 µl Elutionspuffer eluiert.

#### **2.3.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Die Nukleinsäurekonzentration kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz anhand der Extinktion bei 260 nm im UV-Spektrophotometer bestimmt werden. Die Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient



der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung an und sollte bei 1,8 liegen.

Die isolierte DNA wurde in einer 1:100 Verdünnung in TE-Puffer gelöst und in einer Quarzküvette gegen TE-Puffer spektrophotometrisch vermessen.

### **2.3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mittels PCR können definierte DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Methode wurde 1984 von Mullis entwickelt, wofür er 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.

Die Reaktion besteht aus drei Schritten, die 20 – 35 mal wiederholt werden und zur exponentiellen Vermehrung der durch die Primer begrenzten DNA-Sequenz führen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bei 94 °C aufgespalten (Denaturierung). Im zweiten Schritt können nach Temperatursenkung die Primer, zwei spezifische Oligonukleotide, die komplementär zur definierten Sequenz erstellt wurden, an die Matrize binden (Annealing). Eine thermostabile Polymerase synthetisiert schließlich im dritten Schritt ausgehend vom 5'-Ende der Primer einen zur Matrize komplementären DNA-Strang (Elongation). Nach 20 – 35 Zyklen liegt das definierte DNA-Fragment in hoher Konzentration vor.

In dieser Arbeit wurden alle PCRs mit dem Expand Long Template PCR System im Protokoll XL durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit passend zur erwarteten Größe des DNA-Fragmentes variiert.

<b>Reaktionsansatz:</b>	bis 500 ng	DNA
	5 µM	Primer sense
	5 µM	Primer antisense
	5 µl	Puffer 3
	2,5 µl	10 mM dNTP Mix
	0,75 µl	Long Expand Polymerase
	ad 50 µl	Aqua dest. steril

<b>PCR-Protokoll XL:</b>	Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
	Denaturierung	94°C	10 s	
	Annealing	51°C	30 s	10 Zyklen
	Elongation	68°C	2-4 min	
	Denaturierung	94°C	10 s	
	Annealing	54°C	30 s	25 Zyklen
	Elongation	68°C	2-4 min + 20 s / Zyklus	
	Finale Elongation	68°C	7 min	
	Lagerung	4°C	∞	

Zur Überprüfung der Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes auf ein Agarose-Gel aufgetragen und analysiert. Vor einer weiteren Verwendung wurde das PCR-Produkt im Agarose-Gel aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und ihre DNA extrahiert.

#### **2.3.2.4 DNA-Agarosegelelektrophorese**

In einem Agarosegel, das sich in einem Spannungsfeld befindet, kann DNA ihrer Größe nach aufgetrennt werden, da DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode wandert und die Geschwindigkeit dabei abhängig von ihrer Größe ist. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen zwischen 0,8 und 1,2 % gewählt.

Agarose wurde in 1x TAE-Puffer eingewogen, aufgeköcht und nach Abkühlen auf etwa 40°C mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde in einen Gelschlitten gegossen und nach Polymerisation in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V wurden die DNA-Fragmente der Größe nach getrennt. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, kann diese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Alternativ kann Agarose mit Kristallviolett gefärbt werden. Dieses interagiert mit DNA und ist bei Tageslicht sichtbar. Durch Verwendung der Kristallviolett-Färbung können die durch UV-Licht verursachten Thymin-Dimerisierungen in der DNA, die bei der Analyse der Ethidiumbromid-Gele auftreten können, vermieden werden.

#### **2.3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Um DNA aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde das entsprechende Fragment unter schwacher UV-Beleuchtung (Ethidiumbromid-Gel) bzw. unter Tageslicht (Kristallviolett-Gel) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mithilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits isoliert.

#### **2.3.2.6 TOPO-Klonierung**

Die isolierten DNA-Fragmente wurden anhand des TOPO TA Cloning Kits bzw. TOPO XL Cloning Kits in die Vektoren pCRII TOPO bzw. pCR XL TOPO kloniert.

#### **2.3.2.7 Transformation chemisch kompetenter Zellen**

TOP10 chemisch kompetente *E.coli* Bakterien wurden anhand des TOPO TA Cloning Kits bzw. TOPO XL Cloning Kits mit den klonierten Plasmid-Vektoren transformiert und auf LB-Agarplatten, die mit 0,1% Ampicillin bzw. Kanamycin angereichert worden waren, ausplattiert. Das in den Agarplatten enthaltene Antibiotikum erlaubte die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien, da nur diesen Bakterien aufgrund einer im Plasmid-Vektor kodierten Antibiotika-Resistenz Wachstum ermöglicht wurde. Die ausplattierten Agarplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

#### **2.3.2.8 Plasmid-DNA-Vermehrung in Bakterien**

Von den inkubierten Platten wurden Einzelkolonien der transformierten Bakterien gepickt. Anschließend wurden 2 ml 1xLB-Medium mit 0,1% Ampicillin bzw. Kanamycin mit jeweils einer Kolonie angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttler inkubiert.

### **2.3.2.9 Plasmid-DNA-Isolierung**

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natronlauge (NaOH) führte zur Denaturierung der DNA und zur Bildung von Protein-SDS-Komplexen. Nach Zugabe von Natriumacetat fielen die Protein-SDS-Komplexe und die chromosomale DNA, nicht aber Plasmid-DNA aus. Anschließend konnte die Plasmid-DNA von den Proteinen und der chromosomalen DNA getrennt und gereinigt werden.

#### **Mini-Präparationen von Plasmid-DNA:**

Mini-Präparationen wurden zur qualitativen Analyse der Plasmid-Präparationen angefertigt. Nach alkalischer Lyse und Präzipitation der Proteine und chromosomaler DNA wurden diese durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt. Anschließend erfolgte die Reinigung und Konzentration der Plasmid-DNA durch eine Ethanol-Fällung. Es wurden

- 1-1,5 ml der Übernachtskultur bei 13 000 rpm pelletiert und der Überstand abgesaugt
- 100 µl Plasmidpräparationslösung I zugegeben, gevortext und ca. 5 min bei RT inkubiert
- 100 µl Plasmidpräparationslösung II zugegeben, gevortext und 5 min bei RT inkubiert
- 150 µl Plasmidpräparationslösung III zugegeben, invertiert und 10-20 min auf Eis inkubiert
- 15 min bei 14 000 rpm zentrifugiert
- Überstand zu 1 ml Ethanol gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert
- 15 min bei 14 000 rpm zentrifugiert
- Überstand verworfen
- Pellet mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert
- 1 min bei 14 000 rpm zentrifugiert
- Überstand abgesaugt und Pellet bei 37°C getrocknet
- Pellet in 50 µl TE/RNase Lösung resuspendiert

**Maxi-Plasmidpräparationen von Plasmid-DNA:**

Für die Präparation großer und reiner Mengen an Plasmid-DNA wurden 200 ml einer Übernachtskultur verwendet und die Plasmid-DNA mithilfe des Plasmid DNA Purification Kit: NucleoBond PC500 (Macherey-Nagel) isoliert. In diesem Fall erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse über eine Anionenaustauschsäule.

**2.3.2.10 Restriktionsverdau von DNA**

Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch. Die Erkennungssequenzen sind meist palindromisch und enthalten die Schnittstelle. Das Schneiden der DNA erzeugt, je nach Enzym, überhängende oder glatte Enden. Restriktionsenzyme wurden zur Analyse der klonierten Plasmide und präparativ zur Klonierung neuer Plasmide verwendet.

<b>Reaktionsansatz:</b>	<b>analytisch</b>	<b>präparativ</b>
DNA	1 µg	10 - 40 µg
10x Puffer	2 µl	10 µl
Enzym	0,5 µl	10 µl
Aqua dest. steril	ad 20 µl	ad 100 µl

Der Puffer richtete sich nach Angabe des Herstellers. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

**2.3.2.11 Pheno-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA**

Zum Entfernen von Protein- und Lipidverunreinigungen aus wässrigen DNA-Lösungen wurde nach einem präparativen Restriktionsverdau eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt. Proteine sammelten sich in der organischen Phase, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verblieben. Anschließend erfolgte die Präzipitation der DNA mit Isopropanol und Ethanol zur Entfernung der Phenolreste und Konzentration der DNA.

Es wurden zur

***Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion***

- 100 µl des Restriktionsverdau mit 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 50:48:2 versetzt und 30 s lang gevortext
- 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert
- obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt
- 100 µl Chloroform-Isoamylalkohol (48:2) zugegeben und 30 s lang gevortext
- 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert
- obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführt

***Ethanol-Präzipitation***

- 5 µl Glycogen
- 15 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 4,5 – 5,2)
- und 360 µl Ethanol zugegeben und gemischt
- bei – 80°C für mindestens 2 h inkubiert
- 30 min lang bei 13 000 rpm zentrifugiert
- Überstand verworfen
- zweimalig mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen
- jeweils 15 min lang bei 13 000 rpm zentrifugiert und Überstand abgesaugt
- Pellet ca. 15 min bei 37°C getrocknet und in 20 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen

**2.3.2.12 Ligation linearer DNA-Fragmente**

In einer Ligrationsreaktion wurden DNA-Fragmente mithilfe der T4 Ligase durch Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3' Hydroxylgruppe und einem 5' Phosphatende miteinander verknüpft, wobei ATP als Kofaktor notwendig war. Die DNA-Enden mussten entweder glatte oder komplementär einzelsträngige Überhänge aufweisen. Die Ligation wurde entweder als Religation oder als Insertion eines Fragmentes in einen Vektor durchgeführt.

<b>Reaktionsansatz:</b>	T4 DNA-Ligasepuffer	3 µl
	DNA	100–500 ng
	T4 DNA-Ligase	3 µl
	Aqua dest. steril	ad 30 µl

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14°C.

### 2.3.2.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Ähnlich zur PCR beruht sie auf der Wiederholung dreier Schritte: Denaturierung, Primerbindung und Elongation mittels Polymerase. Im Reaktionsansatz befindet sich jedoch nur ein Primer und neben Desoxynukleotiden auch ein Gemisch aus Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxynukleotiden, deren Einbau zum Kettenabbruch führt. Da der Einbau zufällig erfolgt, haben die neuen DNA-Stränge unterschiedliche Längen, die ihrer Größe nach gelelektrophoretisch aufgetrennt werden können. Die Fluoreszenzfarbstoffe an ihren Enden werden mittels Laser angeregt und gemessen. Auf diese Weise kann die Sequenz bestimmt werden. Für die Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde das Big Dye Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet.

<b>Reaktionsansatz:</b>	0,5 µl	DNA
	3,3 pmol	Primer
	1 µl	Tris/MgCl <sub>2</sub>
	1 µl	Big Dye Mix
	ad 5 µl	Aqua dest. steril

<b>PCR-Protokoll XL:</b>	Denaturierung	95°C	20 s	
	Primerbindung	50°C	15 s	25 Zyklen
	Elongation	60°C	4 min	
	Lagerung	4°C	∞	

### **2.3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.3.3.1 Proteinexpression**

Der zur Proteinexpression gewünschte Genabschnitt wurde mittels PCR amplifiziert und 5 µl einer Mini-Plasmidpräparation, deren Sequenz durch Sequenzierung bestätigt wurde, anhand des Champion pET Directional TOPO Expression Kits in den pET102/D-TOPO kloniert. Eine Einzelkolonie der transformierten BL 21 (D3) *E.coli* Bakterien wurde in einem Volumen von 100 ml 0,1%-Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert und am nächsten Tag in einem Volumen von 5 l Ampicillin-haltigem LB-Medium verdünnt. Nach 3-stündiger Inkubationszeit bei 37°C und Schütteln bei 180 rpm wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur weitere 6 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (20 min bei 4000 x g) und bei -20°C eingefroren.

#### **2.3.3.2 Präparation von *E.coli* Lysaten unter nativen Bedingungen**

Die Präparation der Lysate erfolgte unter nativen Bedingungen anhand des QIAexpressionist Protokolls mit Lysepuffer, Lysozym und Sonifizierung.

#### **2.3.3.3 Aufreinigung von Protein mit His-tag unter nativen Bedingungen**

Proteine, die einen His-Tag/Patch enthalten, ermöglichen die Aufreinigung mithilfe von Nickel-NTA-Agarose. Geladene Nickelionen binden Histidin und somit Histidin-markierte Proteine. Imidazol konkurriert um die Bindung an Nickel, so dass das Protein schließlich durch Imidazol-haltige Puffer eluiert werden kann. Die Proteinaufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen anhand des QIAexpressionist Protokolls.

#### **2.3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode**

Bradford-Lösung enthält den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau. Durch Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich dessen Absorptionsspektrum von einem Maximum von 465 nm nach 595 nm. Diese Änderung kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden.



Das verwendete Bradford-Reagenz wurde als 5x Konzentrat von der Firma Biorad bezogen. Durch Messung der Extinktion bekannter Konzentrationen an BSA wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Konzentrationen der zu analysierenden Proteinproben ermittelt wurde. Es wurde eine BSA-Lösung (1mg/ml) hergestellt und wie folgend angegeben eingesetzt.

**Eichgerade:** 0, 1, 2, 4, 6  $\mu$ l BSA-Lösung ad 20 $\mu$ l Aqua dest + 1ml 1x Bradford-Reagenz.

**Proben:** 2  $\mu$ l Proteinlösung ad 20  $\mu$ l Aqua dest. + 1 ml 1x Bradford-Reagenz.

Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in Plastikküvetten überführt und anschließend die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Durch Vergleich der Werte der Proteinproben mit der Eichgeraden konnte die Konzentration an Protein in den Proben bestimmt werden.

### **2.3.3.5 Erhöhung der Protein-Löslichkeit durch Urea**

Urea führt durch Zerstörung nicht-kovalenter Bindungen in Proteinen zu ihrer Denaturierung. Dadurch kann die Löslichkeit eines Proteins erhöht werden. Nach Präzipitation des bakteriell exprimierten und aufgereinigten Proteins wurde es auf 70°C erhitzt, bis das gesamte Protein ausfiel, und das zentrifugierte Pellet 3-malig mit PBS gewaschen. Danach wurde das Protein in 500  $\mu$ l 8 M Urea-Lysepuffer gelöst und in 250  $\mu$ l Refolding Puffer verdünnt.

### **2.3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Proteinproben lassen sich in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese anhand ihres Molekulargewichtes auftrennen. Polyacrylamidgele bestehen aus einem Acryl-Bisacrylgemisch, dessen Verhältnis die Auftrennung der Proteine bestimmt. SDS (Natriumdodecylsulfat) wird den Proteinproben im Überschuss zugegeben, was zu ihrer Denaturierung führt und zusammen mit  $\beta$ -Mercaptoethanol Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindert. SDS bindet als anionisches Detergenz an hydrophobe Bereiche von Proteinen, wodurch diese eine starke negative Ladung erhalten, die ihre Eigenladung maskiert. Dadurch wandern alle Proteine während einer Elektrophorese zur Anode; die Geschwindigkeit wird durch ihre Größe bestimmt, so dass eine Auftrennung anhand ihres Molekulargewichts resultiert. In dieser Arbeit wurden 8%ige Gele

in einem Acryl-Bisacrylgemisch im Verhältnis 37,5:1 verwendet. Die Polymerisierung des Acrylamid-Gels wurde durch Zugabe von je 150 µl Ammoniumpersulfat (10% APS) und 20 µl TEMED ermöglicht.

	<b>Trenngel 8%</b>	<b>Sammelgel 4%</b>
Acryl-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	5,3 ml	2,6 ml
Gelpuffer	6,6 ml	5,0 ml
Glycerin	2,2 ml	
Aqua dest. steril	6,0 ml	12,4 ml

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet; nach Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm, der Taschen für Proben bildete, eingesetzt. Nach Polymerisierung des Sammelgels wurden die Kammern der Elektrophoreseapparatur mit Kathoden- und Anodenpuffer gefüllt, der Kamm entfernt und die Proteinproben, die zuvor mit 2xPPP versetzt und 8 min lang bei 95 °C aufgeköcht wurden, sowie Proteinmarker aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht bei einer Spannung zwischen 35 und 50 V.

#### **2.3.3.7 Coomassie-Färbung von Proteinen**

Coomassie-Brilliantblau ist ein Farbstoff, der sich an die basischen Seitenketten von Proteinen anlagert und zur Färbung von in Polyacrylamid-Gelen befindlichen Proteinen genutzt wird.

Das Polyacrylamid-Gel mit den nach SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurde 30 min lang in Fixier-Lösung geschwenkt und dann in 1x-Coomassie-Färbelösung überführt (5x-Konzentrat der Firma Roth). Nach Anfärbung der Banden wurde die Färbelösung verworfen und das Gel 30 min lang in Entfärbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in einem Geltrockner zwischen Cellophan-Folien getrocknet.

### **2.3.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Coomassie-Gel**

Eine SDS-PAGE wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Proteinprobe und BSA (Stocklösung 1mg/ml) durchgeführt und das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Stärken der Banden der Probenkonzentrationen mit jenen der verschiedenen BSA-Konzentrationen verglichen. Der visuelle Vergleich führte zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Proteinprobe. Die Probenlösungen wurden wie folgt eingesetzt:

**BSA:** 125, 250, 500, 1000 ng

**Proben:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µl Proteinlösung in einer 1:2000-Verdünnung

### **2.3.3.9 Western Blot**

In einem Western Blot können Proteine mithilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. Die Proteine werden zuvor durch SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt und anschließend auf einer Membran fixiert. Der Transfer der Proteine (Blot) vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgt in einem elektrischen Feld, wobei die mit SDS-beladenen Proteine in Richtung Anode wandern. Durch Färbung mit Ponceau-Lösung können Proteine auf der Membran unspezifisch sichtbar gemacht werden, was zur Kontrolle des Blots dient. Durch Inkubation mit einem spezifischen Primär-Antikörper binden Proteine diesen. Nachdem ungebundene Antikörper durch Waschschriffe entfernt wurden, wird durch Zugabe eines sekundären Antikörpers der F<sub>C</sub>-Teil des ersten Antikörpers erkannt. Der gebundene sekundäre Antikörper kann durch ein Enzym, in diesem Fall Meerrettich-Peroxidase (HRP), die an dessen F<sub>C</sub>-Teil gekoppelt ist, nachgewiesen werden. Anschließend führt die Zugabe einer Detektionslösung (Pierce ECL Western Blotting Substrate) zu einer Oxidation und zu einer damit verbundenen Freisetzung von Lichtquanten (Chemilumineszenz). Diese Lichtemission kann durch Belichtung eines Fotofilms detektiert werden. Der Western Blot wurde nach dem „semidry“-Verfahren durchgeführt.

Es wurde zum

### ***Blotaufbau***

- Anodenplatte (mit Blotpuffer befeuchtet)
- drei Lagen Blot-Filterpapier (10x15cm, in Blotpuffer getränkt)
- Nitrocellulosemembran (in Blotpuffer getränkt)
- SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinen (10x15cm)
- zwei Lagen Blot-Filterpapier (10x15cm, in Blotpuffer getränkt)
- Kathodenplatte (mit Blotpuffer befeuchtet)

### ***Immunoblot***

- 90 min bei 450 mA geblottet
- Membran 1 min lang mit Ponceau-Lösung gefärbt und mit Aqua dest. gespült
- gegebenenfalls die Membran entlang der Protein-Spur in Streifen geschnitten
- mit PBS gespült und entfärbt
- schüttelnd 1 h bei Raumtemperatur in 4% Magermilchpulver in PBS blockiert
- 3 x kurz mit PBS-Tween gewaschen
- schüttelnd 1 h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper, verdünnt in 4% Magermilchpulver in PBS, inkubiert
- 3 x 10 min mit PBS-Tween gewaschen
- schüttelnd 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundärem Antikörper, verdünnt in 4% Magermilchpulver in PBS, inkubiert
- 2 x 10 min mit PBS-Tween gespült, 1 x 10 min mit PBS gewaschen

### ***Detektion***

- Nitrocellulosemembran kurz zwischen Whatman-Papier leicht getrocknet
- auf Glasplatte gelegt
- 3 ml ECL zugegeben und nach 90 s mit Whatman-Papier entfernt
- Membran mit Kopierfolie abgedeckt und in eine Fotokassette überführt
- in der Dunkelkammer Röntgenfilme je nach Signalstärke für 5 s bis 1 min belichtet
- und anschließend entwickelt, fixiert und getrocknet.

#### 2.3.4 Bioinformatik

**ClustalW** ermöglicht multiple Sequenzalignments, Sequenzvergleiche und das Erstellen phylogenetischer Stammbäume mittels Maximum-Likelihood-Methode (Thompson, 1994).

Software: <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software>. Version 1.83 für Windows/ Mac OS

**Cap3** setzt überlappende multiple Sequenzen zu einer Gesamtsequenz zusammen (Huang und Madan, 1999).

Software: <http://seq.cs.iastate.edu>.

**SeqMan** (DNASTar) setzt multiple überlappende Sequenzen zu einer Gesamtsequenz zusammen und ermöglicht Sequenzvergleiche und Modifikationen nach Sanger-Sequenzierung (Swindell und Plasterer, 1997).

Software: [www.dnastar.com](http://www.dnastar.com)

**EMBOSS** (European Molecular Biology Open Software Suite) beinhaltet verschiedenste bioinformatische Programme, wie Sequenz-Translationen, Auffinden von offenen Leserastern, Restriktionsanalysen (Rice, 2000).

Software: [emboss.sourceforge.net](http://emboss.sourceforge.net)

**Treeview** zeichnet aus *ClustalW* Phylogenie-Distanzen Stammbäume (Page, 1996).

Software: [taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html](http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html)

**TREE-PUZZLE** erstellt phylogenetische Stammbäume aus einem Sequenzdatensatz mit der Maximum-Likelihood-Methode (Schmidt, 2002).

Software: [www.tree-puzzle.de](http://www.tree-puzzle.de). Version 5.2.

**SplicePredictor Online** sagt mögliche Positionen von Spleißdonatoren und Spleißakzeptoren in einer Sequenz voraus (Brendel, 2004)

Software: <http://deepc2.psi.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi>

**Promoter2.0PredictionServer** sagt mögliche Positionen von Promoter in einer Sequenz voraus (Knudsen, 1999)

Software: <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung des SFVspm

Um molekulare Untersuchungen am simianen Foamyvirus des Klammeraffens (SFVspm) durchführen zu können, musste das Virus zunächst in Zellkultur angereichert werden. Danach wurde aus den infizierten Zellen DNA isoliert. Die virale DNA stammte entweder aus viralem integriertem Genom bzw. aus nicht-integriertem Genom, das in multiplen Kopien im Zytoplasma vorlag. Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden aus der isolierten DNA einzelne Fragmente des SFVspm amplifiziert, in Plasmide kloniert, kompetente *E.coli* Bakterien mit der rekombinanten DNA transformiert und die isolierten Plasmidpräparationen sequenziert. Das Genom wurde in fünf Schritten amplifiziert. Das erste Primerpaar konnte anhand einer 425 bp langen bekannten Integrase-Sequenz des SFVspm generiert werden. Anschließend wurden die Primer anhand konservierter Stellen im Foamyvirus-Genom bzw. neu-sequenzierter und SFVspm-spezifischer Genomabschnitte ausgewählt. Durch diese Klonierungsstrategie wurde schließlich das gesamte Genom des simianen Foamyvirus des Klammeraffens entschlüsselt.

#### 3.1.1 Virusanreicherung in Zellkultur

Humane Fibroblasten der Zelllinie MRC-5 wurden an Tag 1 mit dem Simian Foamy Virus Typ 8 kokultiviert. Nach 3 Tagen war ein für Foamyviren charakteristischer zytopathogener Effekt (CPE) in Form von Synzytien sichtbar. Dies entsprach den bisherigen Beobachtungen einer Foamyvirus-Infektion *in vitro*, so dass von einer Infektion mit SFVspm ausgegangen werden konnte.

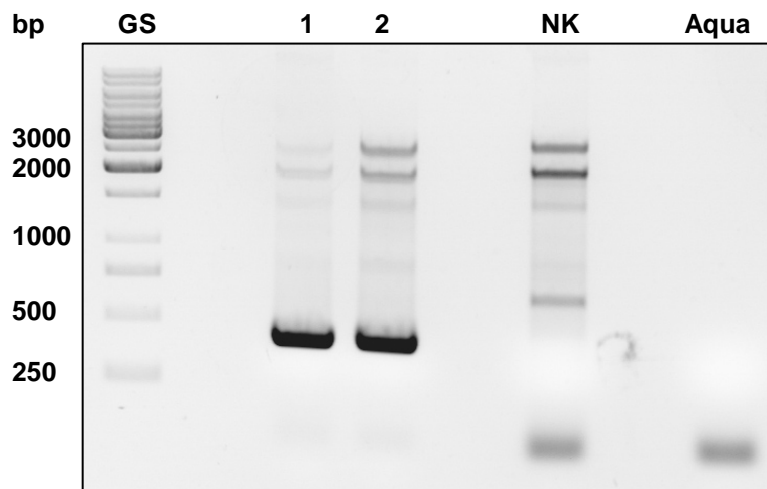
#### 3.1.2 DNA-Extraktion aus infizierten Zellen

Die mit SFVspm kokultivierten MRC-5 Zellen wurden an Tag 5 geerntet, zentrifugiert und die DNA extrahiert. Ebenso wurde DNA aus nicht-infizierten MRC-5 Zellen extrahiert, diese diente als Negativkontrolle.

### 3.1.3 Amplifikation eines SFVspm spezifischen Fragments

Die Infektion mit SFVspm sollte im Anschluss durch den Nachweis von SFVspm-spezifischer Nukleinsäure mittels PCR bestätigt werden. Eine 425 bp lange bekannte Sequenz der SFVspm-Integrase (Schweizer und Neumann-Haefelin, 1995) stand als Referenzsequenz zur Verfügung.

Ein Sense-Primer *sfv8 int sense* wurde passend zum 5'-Ende der publizierten Sequenz gewählt, ein Antisense-Primer *sfv8 int antisense* zum 3'-Ende. Die PCR wurde mit dem Expand Long Template PCR System im Protokoll XL durchgeführt. Es wurden 100 ng bzw. 300 ng der isolierten DNA der infizierten MRC-5 Zellen bzw. 300 ng der DNA der nicht-infizierten Zellen eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 50°C und einer Elongationszeit von 2 min. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarose-Gel analysiert. Es konnte ein Hauptfragment mit einer Größe von ca. 400 bp amplifiziert werden, was der erwarteten Größe des Integrasefragments entsprach. Außerdem zeigten sich Nebenprodukte, die jedoch auch in der Negativkontrolle vorhanden waren (Abb. 7).



**Abb. 7:** PCR des Integrase-Fragments.

GS: Größenstandard; 1 und 2: amplifizierte DNA aus mit SFVspm infizierten MRC-5-Zellen. NK: Negativkontrolle, amplifizierte DNA aus nicht infizierten MRC-5 Zellen. Aqua: PCR ohne DNA.

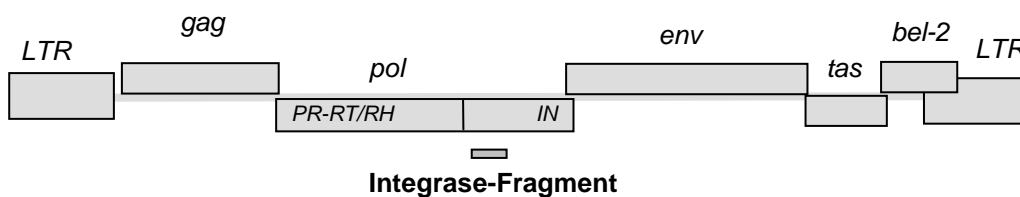
### 3.1.4 Klonierung und Sequenzierung des amplifizierten DNA-Fragments

Zum Vergleich der amplifizierten Sequenz mit der bereits publizierten Integrase-Sequenz wurde das 400 bp große, aufgereinigte PCR-Produkt zunächst in den

pCR II TOPO Vektor kloniert. Anschließend wurden chemisch kompetente Top10 *E.coli*-Bakterien mit der rekombinanten Plasmid-DNA transformiert. Aus Einzelkolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und zur Analyse mit EcoRI geschnitten. Im Restriktionsverdau zeigte sich, dass alle Plasmidpräparationen das 400 bp große Fragment enthielten. Anschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA mit den Primern *M13 forward* und *M13 reverse* sequenziert und mit der publizierten Integrase-Sequenz mithilfe der Software *ClustalW* verglichen. Es ergab sich eine Übereinstimmung von 99,1% (Abb. 8). Dies bewies die Amplifikation eines Genomabschnittes von SFVspm aus infizierten Zellen und ebenso die stattgefundene Infektion der humanen Fibroblasten mit SFVspm, so dass die extrahierte DNA für die Klonierung weiterer Segmente des SFVspm-Genoms verwendet werden konnte (Abb. 9).

Schweizer Klonierung	TCAAGGAAATTTACCAAAGGCTATCCTAAACAATATAAATATGTATTGAAAAATAATGA TGAAGGAAATTTACCAAAGGCTATCCTAAACAATATAAATATGTATTGAAAAATAATGA * *****
Schweizer Klonierung	GCTTATTGTACAACGTCCTGAGGGAGATAAAATCATCCCCCAAAGGCGGATAGACTTCC GCTTATTGTACAACGTCCTGAGGGAGATAAAATCATCCCCCAAAGGCGGATAGACTTCC *****
Schweizer Klonierung	GCTAGTTAAACAGCTCATGAATTGGCACATACAGGAAGAGAAGCTACTTTATTGAAGTT GCTAGTTAAACAGCTCATGAATTGGCACATACAGGAAGAGAAGCTACTTTATTGAAGTT *****
Schweizer Klonierung	GCAAACAACCTCACTGGTGGCCTAATATGAGAAAAGACATTATAACTGTTTTAAGACAATG GCAAACAACCTCACTGGTGGCCTAATATGAGAAAAGACATTATAACTGTTTTAAGACAATG *****
Schweizer Klonierung	TAAGCCATGCCTGCAAACCTGATAGTACAAATTTAACTCCTATTCCCTCTGTTTCTCAGCC TAAGCCATGCCTGCAAACCTGATAGTACAAATTTAACTCCTATTCCCTCTGTTTCTCAGCC *****
Schweizer Klonierung	AAGGCCTGTTAAACCTTTTGATAAGTTCTTTATTGACTATATTGGCCCTTTGCCACCATC AAGGCCTGTTAAACCTTTTGATAAGTTCTTTATTGACTATATTGGCCCTTTGCCACCATC *****
Schweizer Klonierung	TCATGGCTTCTCATATGTGTTGGTCATGTTGATGCAGCCACAGGCTTACATGGTTA TCATGGCTTCTCATATGTGTTGGTCATGTTGATGCAGCCACAGGCTTACATGGTTA *****

**Abb. 8:** Sequenz-Vergleich der Integrase-Abschnitte von SFVspm der von Schweizer et. al publizierten Sequenz und des klonierten Fragments. \*: Übereinstimmung.



**Abb. 9:** Position des Integrase-Fragments im Genom von SFVspm.



### 3.1.5 Klonierung des Polymerase-Integrase-Fragments

Im Folgenden war es Ziel, noch unbekannte Genomabschnitte von SFVspm zu klonieren und ihre Sequenz zu entschlüsseln.

Retroviren weisen insbesondere in *pol* bemerkenswerte Sequenzhomologien auf. Dies ist vor allem darin begründet, dass *pol* die genetische Information der viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase / RNaseH und Integrase kodiert, die nur eine sehr geringe Variabilität aufweisen. Im Falle von SFVspm wurden für die Sequenzvergleiche die *pol*-Gene aus der Gruppe der Simian Foamyviren herangezogen: SFVmac, SFVagm, SFVczp und PFV. Das Alignment erfolgte mit *ClustalW*. Anhand dieser Sequenzvergleiche wurden fünf verschiedene Primer in Sense-Richtung an besonders konservierten Abschnitten des *pol*-Gens erstellt (Abb. 10).

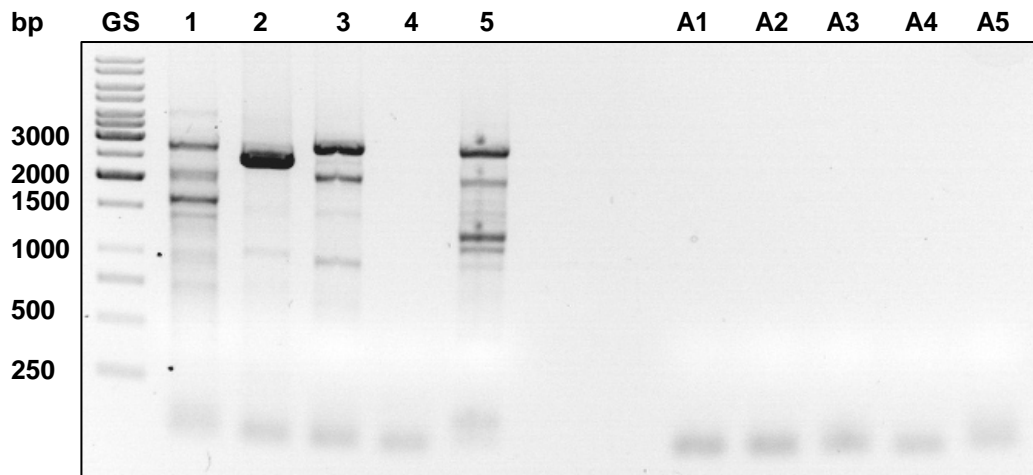
<b>Primer Pol</b>	<b>41</b>	<b>TCAAGGGAAGTAAGTTGAAAGCCCCTGGG</b>	
SFVmac	41	TCAAGGGAAGTAATTTAAAAGCCCCTGGG	70
SFVagm	41	TCAAGGGGACTAAGCTGAAAGCTCATTGGG	70
PFV	41	TCAAAGGGACTAAATTTGTTAGCCCCTGGG	70
SFVcpz	41	TCAAGGGAAGTAAGTTACTAGCCCCTGGG	70
		**** * * * * * * * * * *	
<b>Primer Pol</b>	<b>200</b>	<b>AAGGAAGAAAAGTGGGAAGCAGAAG</b>	
SFVmac	200	AAGGAAGAAAAGTGGGAAGCAGAAG	223
SFVagm	200	AAGGCAGAAAAGTGGGAAGCAGAAG	223
PFV	200	AAGGAAGAAAAGTGGGAAGCAGAAG	223
SFVcpz	200	AGGGAAGAAAAGTGGGAAGCAGAAG	223
		* * * * * * * * * * * * * * * *	
<b>Primer Pol</b>	<b>571</b>	<b>TTAATACCACAAAATAGTACAATGAATAC</b>	
SFVmac	571	TTAATACAACAAAATAGTACAATGAATAC	599
SFVagm	571	TTAATTCAACAAAATAGTATAATGAATAC	599
PFV	571	TTAACGCCTCAAAAATAGTACAATGAATAC	599
SFVcpz	571	TTAACACCCCAAAAATAGCACAATGAATAC	599
		**** * * * * * * * * * *	
<b>Primer Pol</b>	<b>801</b>	<b>TTGGTTAACAGAATTTACTTGGC</b>	
SFVmac	801	CTGGTTAACAGCCTTTACTTGGC	823
SFVagm	801	TTGGTTAACTGCTTTTACTTGGC	823
PFV	801	TTGGTTAACAGCATTTACCTGGC	823
SFVcpz	801	TTGGCTTACTGCATTCACCTGGC	823
		*** * * * * * * * * *	823
<b>Primer Pol</b>	<b>1081</b>	<b>TTTAATATTACTAAAGAAGGTCGTGGCC</b>	
SFVmac	1081	TTTAATATTACTAAAGAAGGCCGAGGCC	1108
SFVagm	1081	TTTAATATTACCAAAGAAGGCCGAGGCC	1108
PFV	1081	TTTAATATTACTAAAGAAGGTCGTGGCC	1108
SFVcpz	1081	TTTAATATTACTAAAGAAGGTCGTGGCC	1108
		***** * * * * * * * * *	

Abb. 10: Sequenz-Vergleich der FV-*pol*-Abschnitte und Primer.

Im Anschluss wurden fünf verschiedene PCR mit den beschriebenen Pol-Sense-Primern, *sfv8 Pol 41*, *Pol 200*, *Pol 571*, *Pol 801* und *Pol 1081*, durchgeführt. Als Antisense-Primer diente jeweils *sfv8 int antisense*. Es wurden 100 ng der DNA-Extraktion aus infizierten MRC-5-Zellen eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit dem Expand Long Template PCR System und dem PCR Protokoll XL bei einer Annealingtemperatur von 50°C und einer Elongationszeit von 2 min. Nur die PCR mit *Pol 200* und *int antisense* ergab ein Hauptprodukt der erwarteten Größe von ca. 2500 bp. In allen anderen Reaktionen zeigten sich mehrere Nebenprodukte, die für eine unspezifische Amplifikation sprachen (Tabelle 10 und Abb. 11).

Sense Primer	Antisense Primer	Erwartete Länge des PCR-Produktes in bp
Pol 41	int antisense	2700
Pol 200	int antisense	2500
Pol 571	int antisense	2150
Pol 801	int antisense	1900
Pol 1081	int antisense	1600

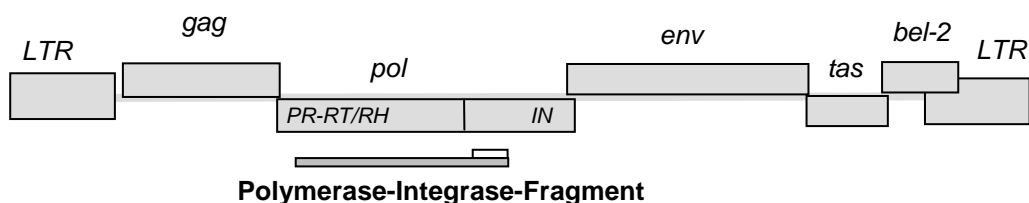
**Tabelle 10:** Primer innerhalb von *pol* und erwartete Länge der PCR-Produkte.



**Abb. 11:** PCR des Polymerase-Integrase-Fragments.

1-5: PCR mit SFVspm-DNA und Primerpaar *sfv8 Pol 41*, *Pol 200*, *Pol 571*, *Pol 801* bzw. *Pol 1081* und *sfv8 int antisense*. A1-5: PCR mit Aqua und Primerpaar *sfv8 Pol 41*, *Pol 200*, *Pol 571*, *Pol 801* bzw. *Pol 1081* und *sfv8 int antisense*.

Das PCR Produkt aus dem Primerpaar *sfv8 Pol 200* und *sfv8 int antisense* wurde auf ein mit Crystal-Violet gefärbtes Agarose-Gel aufgetragen, nach der Gelelektrophorese ausgeschnitten, extrahiert und in den pCR XL Topo Vektor kloniert. Die Plasmid-DNA der transformierten Bakterien wurde isoliert, mit *EcoRI* geschnitten und im Agarose-Gel analysiert, wobei sich die erfolgreiche Klonierung des 2500 bp großen PCR-Produktes bestätigte. Nachfolgend wurden zehn der Plasmidpräparationen mit den Sequenzierprimern *M13 forward* und *M13 reverse* sequenziert. Dabei konnte die Sequenz des bekannten Integrase-Fragmentes bestätigt und um 225 bp in 5' Richtung verlängert werden. Zusätzlich wurde ein 655 bp langer bisher unbekannter Abschnitt des SFVspm *pol*-Gens am 5' Ende bestimmt. Aus den neuen Sequenzen wurden Primer erstellt, die ein fortlaufendes Sequenzieren des PCR-Produktes erlaubten, so dass das gesamte 2500 bp lange Amplifikat in zwei weiteren Schritten mit den Primern *Pol seq* und *pol seq 1a* bzw. *pr2s* und *pol seq2a* sequenziert werden konnte. Die folgende Abbildung 12 zeigt eine graphische Darstellung des sequenzierten Abschnitts.



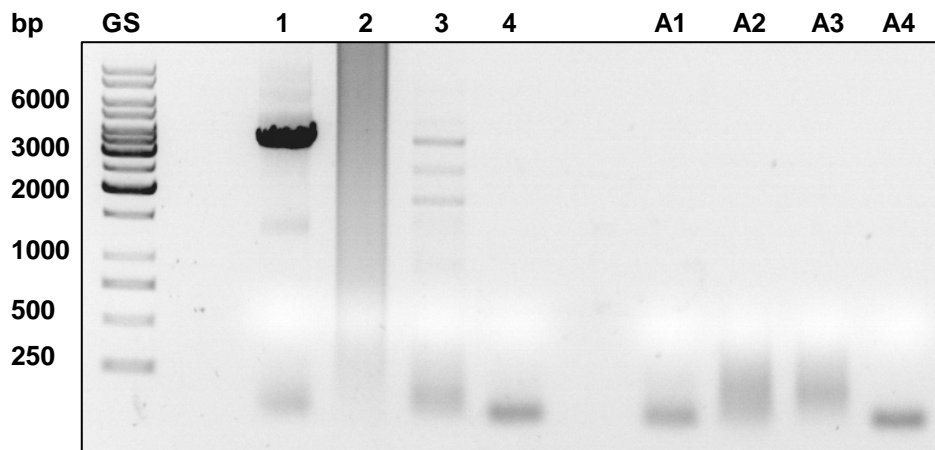
**Abb. 12:** Position des Polymerase-Integrase-Fragments im Genom von SFVspm.

### 3.1.6 Klonierung des Fragments PBS-Polymerase

Die Primer Binding Site (PBS) stellt im Foamyvirus-Genom die Region dar, die komplementär an das 3' Ende der eukaryotischen  $tRNA_{lys1,2}$  bindet, wodurch die reverse Transkription initiiert wird. Sie ist als 18-bp lange Sequenz hochkonserviert und befindet sich am 3' Ende der 5'LTR. Die Sequenz der PBS (TGGCGCCCAACGTGGGGCTCGA) ist in allen FV vollständig konserviert.

Aus diesem Grund wurde die PBS ausgewählt, um einen Primer für die Amplifikation und Klonierung eines weiteren SFVspm-Fragments zu erstellen. Die PCR wurde mit dem Expand Long Template PCR System mit 100 ng DNA der infizierten Zellen, *PBS s* als Sense-Primer und *Pol seq 2a* als Antisense-

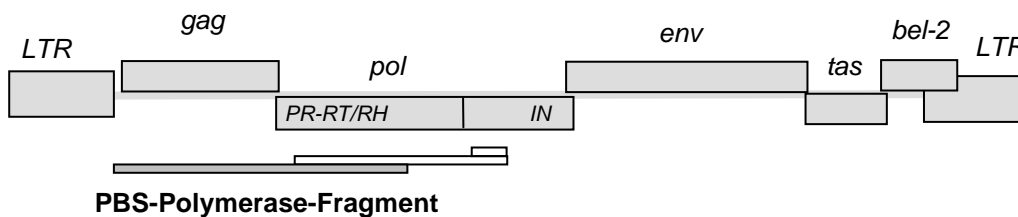
Primer durchgeführt, wobei für das erwartete ca. 3,5 kbp lange Amplifikat eine Elongationszeit von 4 min gewählt wurde. Die Auftrennung im Agarose-Gel zeigte ein Produkt der erwarteten Größe von ungefähr 3500 bp (Abb. 13). Das PCR-Produkt wurde in den pCR XL Topo Vektor kloniert, TOP10 *E.coli* Bakterien transformiert, Einzelklone selektioniert und Plasmidpräparationen angefertigt. Der Erfolg der Klonierung wurde durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI analysiert.



**Abb. 13:** PCR des PBS-Polymerase-Fragments.

1: PCR mit SFVspm-DNA und Primerpaar PBSs / Pol seq 2a. 2-4: PCR mit SFVspm-DNA und anderen Primerpaaren. A1: PCR mit Aqua und Primerpaar PBSs / Pol seq 2a. A2-A4: PCR mit Aqua und anderen Primerpaaren.

Die Plasmidpräparationen wurden schließlich schrittweise mit den Primern *M13 forward*, *M13 reverse*, *pbs seq pra*, *pbs seq 1s*, *pbs seq 1a*, *pbs seq 2s*, *pbs seq 2a*, *pbs seq 3s*, *pbs seq 3a*, *pbs seq 4a*, *pbs seq 4s* und *pbs seq 5a* sequenziert, was eine vollständige Entschlüsselung der Sequenz des amplifizierten Fragments ergab. Dies umfasste das gesamte *gag*-Gen und Abschnitte des *pol*-Gens (Abb. 14).



**Abb. 14:** Position des PBS-Polymerase-Fragments im Genom von SFVspm.

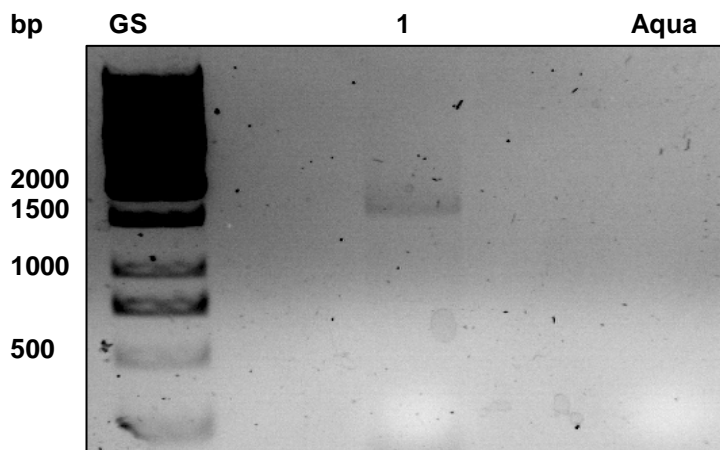
### 3.1.7 Klonierung des LTR-Fragments

Eine charakteristische Eigenschaft von Foamyviren und generell der Gruppe der Retroviren ist die Integration des viralen Genoms in das zelluläre Genom. Die Klonierung des LTR-Fragments nahm sich dieses Prinzip zur Grundlage. Zunächst soll im Folgenden die Klonierungsstrategie erläutert werden:

Die Sequenz von SFVsp<sub>m</sub> *gag* war durch die vorausgehenden Klonierungen bekannt. Es war außerdem bekannt, dass die LTRs verschiedener Foamyviren eine Größe von 1300 bp bis 1800 bp besitzen. 350 Nukleotide 3' der PBS war im SFVsp<sub>m</sub> *gag*-Gen eine HindIII-Schnittstelle zu finden. Da HindIII-Schnittstellen ca. alle 4000 bp im Genom von *Homo sapiens* vorkommen, in das das virale Genom nach Infektion der humanen Fibroblasten integriert hatte, war bei einem Verdau mit HindIII ein Fragment mit einer Größe von 1650 bis 6000 bp wahrscheinlich. Ebenso war es möglich, dass in der LTR selbst eine HindIII Schnittstelle enthalten war. Dies hätte zur Folge, dass bei einem Verdau mit HindIII ein Fragment mit einer Größe zwischen 350 bp und 2150 bp herausgeschnitten werden würde. In beiden Fällen könnten diese Fragmente mittels PCR amplifiziert werden. Allerdings bestand die Schwierigkeit, dass kein geeigneter Sense Primer zu Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde der Sense-Primer *LTR s* so gewählt, dass er sich genau vor der HindIII Schnittstelle in *gag* befand. Der Antisense-Primer *LTR a* wurde nun einige Basenpaare upstream (5'wärts) des Sense-Primers ebenfalls in SFVsp<sub>m</sub> *gag* gelegt. Mit diesem Primerpaar konnte aus einer zirkulären DNA ein PCR-Fragment amplifiziert werden.

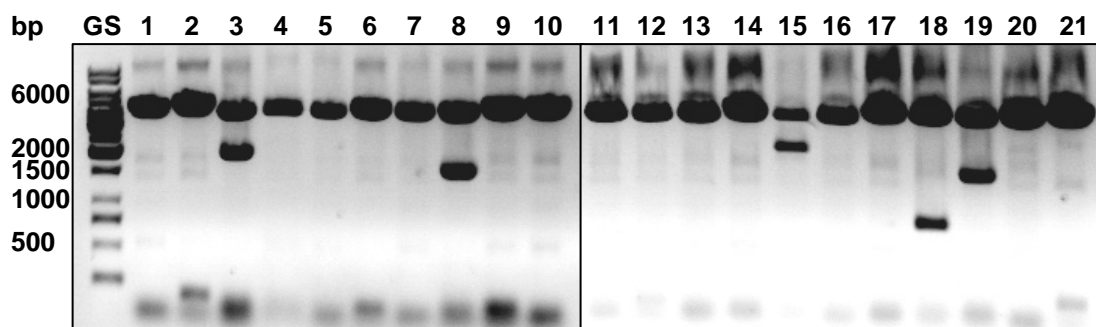
Ca. 800 ng der DNA der infizierten Zellen wurden mit HindIII geschnitten und im Anschluss durch eine Fällung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Durch eine Ligationsreaktion wurden die geschnittenen Fragmente relegiert, so dass sich zirkuläre DNA-Strukturen ausbildeten. In einer PCR mit den Primern *LTR s* und *LTR a* und ca. 400 ng DNA des Ligationsansatzes wurden schließlich jene zirkulären Fragmente amplifiziert, die Sequenzen des SFVsp<sub>m</sub> *gag*-Gens enthielten. Es konnte ein ca. 1600 bp großes PCR-Produkt vervielfältigt werden (Abb. 15). Dieses wurde aus einem Crystal-Violet gefärbten Gel ausgeschnitten und in den Topo XL Vektor kloniert. In einem

Restriktionsverdau mit EcoRI ergab sich, dass nur vier von 30 Plasmidpräparationen ein Fragment der etwaigen Größe von 1600 bp enthielten (Abb. 16).



**Abb. 15:** PCR des LTR-Fragments.

1: PCR mit SFVspm-DNA und Primerpaar LTRs / LTRa. Aqua: PCR mit Aqua und Primerpaar LTRs / LTRa.



**Abb. 16:** Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen des LTR-Fragments.

1-21: Plasmidpräparationen nach Verdau mit EcoRI. 3, 8, 15, 19 wurden nachfolgend sequenziert.

Die genannten vier Klone wurden mit den Primern *M13 forward* und *M13 reverse* sequenziert. Dabei fand sich in zwei der Klone die bekannte SFVspm *gag*-Sequenz in einer Länge von 260 bp wieder. Durch weitere Sequenzierung mit den Primern *LTR a2*, *LTR s4*, *LTR a4* und *LTR a5* wurde eine Gesamtlänge des PCR-Produktes von 1550 bp ermittelt, an dessen Anfang sich die Sequenz des *LTR s* Primers befand. Allerdings war die erwartete HindIII-Schnittstelle

nicht mehr zu finden. Stattdessen fand sich in direktem Anschluss - mit zwei Nukleotiden Abstand - der Beginn der LTR.

Diese Beobachtung ließ vermuten, dass nicht das integrierte Virusgenom während des HindIII-Verdau geschnitten wurde, sondern nicht-integrierte DNA des SFVspm. Während der Ligation wurde das Blunt-Ende der 5'LTR wahrscheinlich mit dem HindIII-Überhang im *gag*-Gen von SFVspm verbunden, so dass sich eine Ringstruktur des Fragments ausbildete. Diese zufällige Form der Ligation war auch bei der Klonierung der LTR von PFV zu beobachten gewesen (Rethwilm, 1987).

Mit dieser Klonierungsstrategie war es möglich, die gesamte Sequenz der 5'LTR des SFVspm mit einer Länge von 1251 bp zu ermitteln. Die Abbildung 17 stellt dies graphisch dar.

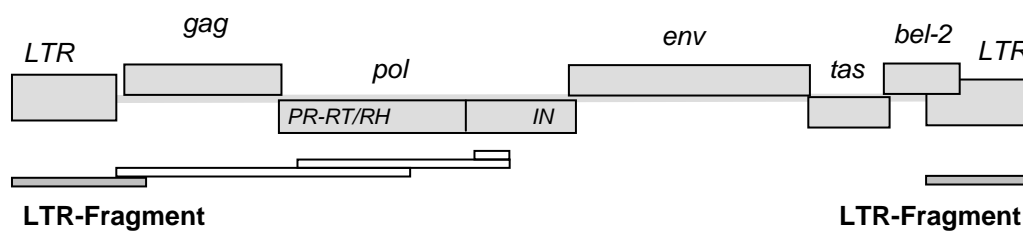


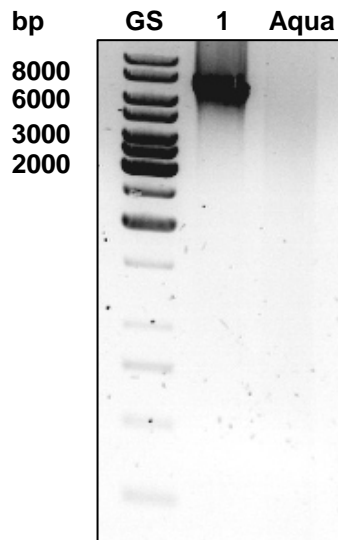
Abb. 17: Position des LTR-Fragments im Genom von SFVspm.

### 3.1.8 Klonierung des Integrase-LTR-Fragments

Das foamyvirale Genom wird sowohl am 5'Ende als auch am 3'Ende von der LTR flankiert wird. Daher war es für die Klonierung der 3'Ende nur noch nötig, aus der entschlüsselten LTR-Sequenz geeignete Antisense-Primer zu erstellen, die jeweils in Kombination mit einem in der Integrase gelegenen Sense-Primer den 3'Anteil des SFVspm-Genoms amplifizieren konnten. Nachteilig war hierbei die erwartete Größe von 6000 bis 8000 bp, die eine erfolgreiche Amplifikation und Klonierung erschwerte.

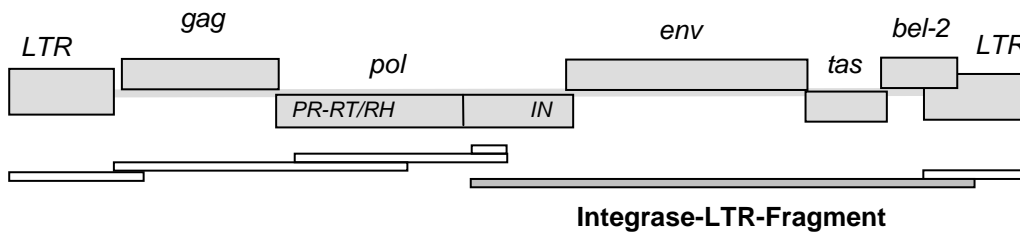
Eine PCR mit den Primern *int sense* und *LTR a1* aus ca. 100 ng DNA der infizierten Zellen war erfolgreich, ein ca. 7000 bp großes DNA-Fragment aus der DNA der infizierten Zellen zu amplifizieren (Abb. 18). Dieses sollte nach Aufreinigung aus einem Crystal-Violet-Gel in den pCR XL Topo Vektor kloniert werden, was jedoch nicht gelang. Auch nach einem Verdau des aufgereinigten PCR-Produktes mit BamHI, wodurch kleinere Fragmente der Größen 1600,

1800 und 4000 bp entstanden, und nach Ligation in einen mit BamHI geschnittenen puc18 Vektor gelang die Klonierung nicht. Aus diesem Grund wurde direkt das aufgereinigte PCR-Produkt mit den PCR-Primern *int sense* und *LTR a1* sequenziert. Dabei konnte SFVspm-spezifische DNA im Amplifikat nachgewiesen werden. Es folgte eine schrittweise Sequenzierung mit den Primern *Sfv8-int*, *SFV8-ltrseq a*, *seq env a 1-13*, *seq env s 1-13* und *int s3*, wodurch dem PCR-Produkt eine Länge von 6000 bp zugeschrieben werden konnte (Abb. 19).



**Abb. 18:** PCR des Integrase-LTR-Fragments.

1: PCR aus SFVspm-DNA und Primerpaar *int sense* / *LTRa1*. Aqua: PCR aus Aqua und Primerpaar *int sense* / *LTRa1*.



**Abb. 19:** Position des Integrase-LTR-Fragments im Genom von SFVspm.



### 3.2 Molekulargenetische Analyse des SFVspm

Die Sequenzen der einzelnen DNA-Fragmente wurden computergestützt mit den Programmen *Cap3* und *Seqman* zu einem zusammenhängenden Genom zusammengesetzt, wobei die Consensus-Sequenz aus mindestens drei unabhängigen Sequenzierungen pro Nukleotid ermittelt wurde. Das Gesamtgenom von SFVspm hat eine Größe von 12212 bp. Es wurden fünf offene Leseraster identifiziert, die den fünf charakteristischen Genen der Foamyviren, *gag*, *pol*, *env*, *tas* und *bet*, entsprechen. Ebenso konnten die LTRs jeweils am 5' und am 3'Ende als flankierende Genomabschnitte ermittelt werden. Anhand von Homologie-Vergleichen mithilfe von *ClustalW* konnten charakteristische Foamyvirus-Motive im SFVspm Genom ermittelt werden (Abb. 20). Diese werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Die Gesamtsequenz von SFVspm, inklusive offener Leseraster und charakteristischer Motive, ist in Abb. 34 (Kapitel 3.3) zu finden. Tabelle 11 vergleicht die ermittelten Genomabschnitte mit denen anderer Foamyviren.

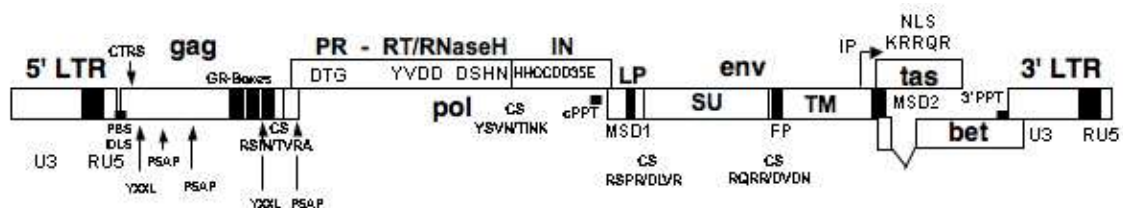


Abb. 20: Genom von SFVspm mit Motiven (Thümer, 2007).

Virus	Größe						
	LTR (bp)	Gag (aa)	Pol (aa)	Env (aa)	Tas (aa)	Bel-2 (aa)	Bet (aa)
SFVspm	1251	623	1148	986	324	268	374
PFV	1767	648	1143	988	300	257	482
SFVcpz	1760	653	1146	988	300	364	490
SFVmac	1621	647	1149	989	308	403	487
SFVagm	1710	643	1143	982	298	388	469
SFVora	1621	624	1145	989	278	321	464
EFV	1449	559	1153	986	249	329	440
BFV	1305	544	1220	990	249	335	435
FFV	1353	574	1156	982	209	313	387

Tabelle 11: Vergleich der Genomschnitte von SFVspm mit anderen FV.

### 3.2.1 Charakterisierung der LTR

Die LTR ist 1251 bp lang. Somit ist sie die kürzeste LTR aller bisher bekannten Foamyviren (siehe Tabelle 11). Die 3'LTR beginnt an Nukleotid 10962 und endet an Nukleotid 12212.

Mit dem Programm *ClustalW* wurden Sequenzvergleiche der bekannten LTRs durchgeführt und die charakteristischen Regionen identifiziert. Die Regionen U3, R und U5 besitzen eine Länge von 930 bp, 164 bp, und 156 bp, wobei die R-Region an Position 931 beginnt, die U5-Region an Position 1095. Anhand der Tabelle 12 wird deutlich, dass die Längen von R und U5 ähnlich derer anderer FV sind. U3 ist jedoch im Vergleich mit anderen Primaten-FV deutlich kürzer und ist bezüglich seiner Länge eher mit den Nicht-Primaten-FV zu vergleichen.

Virus Region	SFVspm	PFV	SFVcpz	SFVora	SFVmac	SFVagm	FFV	BFV	EFV
LTR	1251	1767	1760	1621	1621	1710	1353	1305	1449
U3	930	1423	1426	1286	1321	1333	1070	981	1124
R	164	190	180	177	168	215	134	173	171
U5	157	154	154	158	132	162	149	151	154

**Tabelle 12:** Überblick über die Längen foamyviraler LTRs in bp.

Eine mögliche Lage des U3-Promoters konnte mittels *Promoter2.0PredictionServer* zwischen den Nukleotiden 892 und 942 ermittelt werden. Die für die Transkriptionsinitiierung verantwortliche TATA-Box befindet sich an Position 902, ca. 25 Nukleotide 3'wärts des Transkriptionsstarts an Position 931, was dem Beginn der R-Region entspricht. Der Haupt-Spleißdonor befindet sich an Position 989. Das konservierte Polyadenylierungssignal mit der typischen Sequenz AATAAA lässt sich an Position 1072 bis 1077 (12033-12038) erkennen und die zugehörige Polyadenylierungssite, die den Beginn der U5-Region darstellt, an Position 1095. Die Abbildungen 21 bis 23 zeigen Sequenzvergleiche der LTR-Abschnitte verschiedener FV zur Bestimmung der charakteristischen Domänen.

```

PFV      TATATAGGGATAGTTTCTAGATTGTACGGGAGCTCTTCACTA-----CTCGCTGCGTC
SFVcpz   TATATAGGAATAACAA-TAGATTGTACGGGAGCTCTTCACTA-----CTCGCTGCGTC
SFVagm   TATATAATCCCTGCTT-TAGATTGTACGGGAGCTCACCCTG-----CTCGCTGCGTC
SFVora   TATAAAAGCTTAATGT-TAGATTGTACGGGAGCTCCTCACTG-----CTCGCTGCGTC
SFVspm   TATAAAAGATGTACTCTTAAATTGTACGAGAGCTTCCTCCTCACCCATCTAGCTGCGTC
          **** *                ** ***** ***** **          ** *****
    
```

**Abb. 21:** Vergleich foamyviraler TATA-Boxen und des *Beginns der R-Regionen*.

```

SFVcpz   AATAAACCGACTTG-ATTCGAGAACTCACTCTTATATTATTGTCTCTTTTCATA
PFV      AATAAACCGACTTG-ATTCGAGAACTACTCATATATTATTGTCTCTTTT-ATA
SFVora   AATAAACCGACTTA-ATTCGAGAACTATTCTTATTTTATTGTCTCTTTCTATA
SFVagm   AATAAACCGACTTA-ATTCGAGAACTAGATTATTAGTATTGTCTCTTTCTATA
SFVspm   AATAAACCG-CTTGTATTTCGAGAACTTATTTAATTATTGTTGATGTTTCTATA
          ***** ** ***** * * * * * ** **
    
```

**Abb. 22:** Vergleich foamyviraler Poly-A-Sites und des *Beginns der U5-Region*.

```

SFVspm   ACGGAACTCTCCAGGCTTGTAAGAATTTATATTATATTTT----
PFV      -----ACTCTCCAGGTTTGTAAAGAA---ATATTTTAT-----
SFVora   --GAGACTCTCCAGGCTTGTAAGAAT---TATTTTACTTGATCC
SFVcpz   -----ACTCTCCAGGTTTGTAAAGAAT---TATTTTAT-----
SFVmac   --GAGACTCTCCAGGCTTGTAAGAAA---TATTATAATCTTGT
SFVagm   -----TCTCTCCAGGCTTGTAAGATA--GAACTTTG-----
          ***** ***** * * *
    
```

**Abb. 23:** Vergleich foamyviraler *Spleiß-Donoren*.

### 3.2.2 Charakterisierung weiterer nichtkodierender Genomabschnitte

Zwischen der LTR und dem Beginn von *gag* befindet sich die 18 bp lange PBS (nt 1254–1271), die auch in SFVspm die streng konservierte Sequenz TGGCGCCCAACGTGGGGC besitzt (Abb. 24). In diesem Bereich liegen außerdem die drei Sequenzabschnitte, die für die Dimerisierung der beiden RNA-Moleküle verantwortlich sind (Dimer linkage sites SI - SIII). SI ist überlappend mit der PBS mit der Sequenz TGGCGCCCAACGTGGGGCTCGA (nt 1254-1275). An SII findet sich nicht die wie bei allen anderen Foamyviren beschriebene konservierte Palindromsequenz, sondern mit leichter Abweichung die Sequenz ATTTACCCTAGGGAAGCTTC (nt 1307-1324 in Abb. 25). SIII stellt sich mit der Sequenz AGTAATGGCTCAAGGG (nt 1337-1352) dar.

```

PFV          ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGAAT
SFVora      ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGAAT
SFVmac      ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGAAT
SFVagm      ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGAAT
SFVcpz      ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGAAT
SFVspm      ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGATT
BFV         ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGAGT
FFV         ACAGTTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGATT
EFV         ACAATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCGATA
***

```

**Abb. 24:** Vergleich foamyviraler Primer Binding Sites / Dimer Linkage Sites I.

```

PFV          ATTATCCCTAGGGACCTC
SFVcpz      ATTATCCCTAGGGACCTC
SFVora      ATT-TCCCTAGGGACCTC
SFVagm      ATTATCCCTAGGGACCTT
SFVmac      TTAATCCCTAGGGACCTT
BFV         ACTATCCCTAGGGAACTG
EFV         ATTAACCCTAGGG-TATA
FFV         ATAATCCCTAGGGACCTT
SFVspm      ATTTACCCTAGGGAACTT
*****

```

**Abb. 25:** Vergleich foamyviraler Dimer Linkage Sites II.

Zusätzlich zum Transkriptionsstart in der LTR enthalten Foamyviren einen internen Promoter (IP), der am Ende der *env*-Gensequenz, 5'wärts der zusätzlichen offenen Leseraster *tas* und *bel-2* zu finden ist. Mithilfe von Homologie-Vergleichen und dem *Promoter2.0PredictionServer* konnte der interne Promoter dem Bereich zwischen Nukleotid 9219 und 9269 zugeschrieben werden, mit einem Transkriptionsstart an Position 9259.

Der 3'Polypurintrakt (PPT), der die Synthese der Plusstrang-DNA initiiert, liegt unmittelbar vor der 3'LTR an Position 10953-10961 mit der Sequenz AGGAGAGGG. Ein weiterer zentraler Polypurintrakt (cPPT) mit kongruenter Sequenz AGGAGAGGG, der möglicherweise als interner Startpunkt der

Zweitstrangsynthese fungiert, befindet sich am Ende von *pol* an Position 6392-6400.

Wie bereits oben erwähnt, ist der Hauptspleißdonor (SD) in der R-Region der LTR an Position 988 zu finden. Der Spleißdonor des internen Promoters befindet sich wahrscheinlich laut *Splice-PredictorOnline* an Position 9396, der Spleißdonor in *tas*, der das Bet-Transkript generiert, an Position 9703. Die Spleißakzeptoren (SA) für die mRNAs für Pol, Env, Tas und Bet wurden für die Positionen 2278, 6394, 9478 bzw. 10387 vorausgesagt.

### **3.2.3 Charakterisierung von Gag**

Die folgenden Protein-Motive wurden anhand von Aminosäuren-Sequenz-Homologien, die mit *EMBOSS* und *ClustalW* erstellt wurden, ermittelt. Sie sind in den Abbildungen 27 und 34 (siehe Kapitel 3.3) eingezeichnet.

Das *gag*-Gen beginnt an Nukleotid 1341 und endet an Nukleotid 3209, so dass ein Protein mit einer Länge von 623 Aminosäuren kodiert wird. Am C-Terminus des Proteins befinden sich drei Glycin-Arginin-reiche Boxen (GR I-III), die für die Bindung der Nukleinsäure und die nukleäre Lokalisation von Gag von Bedeutung sein dürften. GR I erstreckt sich von Aminosäure 454 bis 483, GR II von aa 516 bis 534 und GR III von aa 556 bis 583. Am N-Terminus von Gag lassen sich außerdem ein potentielles zytoplasmatisches Ziel- und Retentionssignal (CTRS) an Position 37 und das konservierte Arginin (aa 48), das beim zytoplasmatischen Kapsid-Zusammenbau eine Rolle spielt, identifizieren, sowie ein Motiv hydrophobischer Aminosäuren (aa 128-181), das als sogenanntes coiled-coil Motiv für die Interaktion zwischen einzelnen Gag-Proteinen verantwortlich sein könnte. Die für die Abspaltung des p3-Peptids wichtige C-terminale Schnittstelle kann an der Aminosäuren-Position 583-590 lokalisiert werden und ist durch die Aminosäuren RSIN ↓ TVRA charakterisiert (Abb. 26). Dadurch ergibt sich ein 37 aa langes C-terminales Peptid mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 3,7 kDa. Weitere mögliche Schnittstellen von Gag, die wahrscheinlich während der frühen Infektion von Bedeutung sind, finden sich an den Positionen 279-286 (AQIK ↓ AVIG), 307-314 (EGTF ↓ PTGS) und 320-327 (RVLN ↓ ALLT).

PFV	618	RAVN↓TVTQ	625
SFVczp	623	RAVN↓TVTQ	630
SFVora	596	HAVN↓AVTQ	603
SFVmac	613	RSVN↓TVTA	620
SFVagm	607	RNVD↓TVTA	614
SFVspm	583	RSIN↓TVRA	590
BFV	511	SAVH↓SVRL	518
EFV	528	NTVH↓TVRQ	535
FFV	485	AAVH↓TVKA	492

**Abb. 26:** Vergleich der p68-p3 Schnittstelle in Gag. Position in aa.

FV benötigen für eine effiziente Knospung sogenannte Late-Domänen. Im SFVspm-Genom lassen sich folgende Late-Domain-Motive zuordnen: drei konservierte PSAP Motive, die die Partikelbildung durch Interaktion mit zellulären Exportmechanismen erleichtern könnten, befinden sich an den Aminosäure-Positionen 223-226, 244-247, und 597-600. Letztere befindet sich innerhalb des während der Reifung abzusplittenden 3kDa-Peptids, und es ist fraglich, ob dieses PSAP Motiv auch tatsächlich als Late-Domain fungiert. Außerdem konnten zwei YXXL Motive in SFVspm Gag an Position 107 und 538 gefunden werden, die für einen korrekten Partikel-Zusammenbau essentiell sein dürften. Die folgende Abbildung 27 zeigt den Vergleich der Aminosäure-Sequenzen verschiedener FV-Gag-Proteine mit ihren charakteristischen Motiven.

	<i>CTRS</i>	<i>Arginin</i>	
PFV	MASGSNVEEYELDVEALVVILDRNIPRNPLHGVEVIGLRLTEGWWGQIERFQMVRILIQD		60
SFVczp	MASGSNVEEYELDVEALVVILDRNIGRNPLHGVEIIGLRLTEGWWGQLERFQMVRILIQD		60
SFVora	MAAQN----FELDVQELLNLFQDNGVTRNPRHLETIGLRMLGGWWGEQERYQSARIILQD		56
SFVmac	----MAAIEGDLVDVQALANLNFNDLGINRNPRHREVIALRMTGGWWGPATRYNLVSLLLQD		56
SFVagm	----MG--DHNLNVQELLNLFQNLGIPRQPNHREVIGLRLMLGGWWGPGTRYILVSIFLQD		54
SFVspm	--MAQGNQPEHIDIGHLTILLRENGLPTNPPHGTEYAVRMTEGWWGDYARFTVIRVAFQD		58
BFV	-----MALND-FDPIALQGYLPAPRVLQHN---DIIICRATSGPWGIGDRYNLIRIHLQD		51
EFV	-----MAQNETFDPVALQGYYPAGGILADN---DIINIRFTSGQWIGDRWLQVRLRLVD		52
FFV	-----MARELNPLQLQQLYINNGLQPNPGHGDIIAVRFTGGPWGPGDRWARVTIRLQD		53
	:: * : . * * * * : : *		

## ERGEBNISSE

### YXXL-Motiv

```

PFV      D-DNEPLQRPRYE---VIQRAVNPHMTFMISGPLAELQLAFQDLDLPEGPLRFGLANGH 116
SFVczp   E-DNEPLQRPRHE---IIPRAVNPHMTFVLSGPLAELQLAFQDLDLPEGPLRFGLANGH 116
SFVora   D-DGEPLQVPRWE---EVLRPVNPLAHFVISAPWDQLRRAFHDLDVGNALRFGLANGN 112
SFVmac   D-QGQPLPQPRWR---AEGRAANPAVMFTLEAPWQDLRLAFDNIDVGEGTLRFGLANGN 112
SFVagm   D-SGQPLQPRWR---PEGRPVNPLVHNTIEAPWGELRQAFEDLDVAEGTLRFGLANGN 110
SFVspm   N-QGNPLRPEWE---YINRDVRPLNDSIIGCTFRQAQAFNNIDLARTPSRYGPLSNGL 114
BFV      P-AGQPLPIPQWEPINRRTANPRTQPYPVVSAPMATLENILNNFHIPHGVSRYGPLEGGD 110
EFV      PNTGQPLAQPEYE---DTGLPAENRGIIVAVSHNAARNIFNNVQPAGGPNRHGPHLDGQ 108
FFV      N-TGQPLQVPGYD---LEPGIINLREDILIAGPYNLIRTAFLDLEPARGPERHGFPGDGR 109
          .:** *                               : . . : :.. *:**: .*
    
```

### Coiled-coil Motiv

```

PFV      YVQGDYSSSYRPVMTAETAQMTRDELEDVLTQSEIEIQMINLLELYEVETRALR---- 172
SFVczp   YVEGDYSSSYRPVMTAETAQMTRDELEDTLNTQSEIEIQMINLLELYEVETRALR---- 172
SFVora   YIPEDYSTSYPVNPQEMAQMORDELEEVLVQGEIQLMIDLIEMQTIETIRGLR---- 168
SFVmac   YIPGDEFSLFLPPAMQEITQMORDELEEVLVQGITMOMNDLIGMQDAQIRGLE---- 168
SFVagm   WIPGDEYSMEFQPPLAQEIAQMORDELEEILDITGQICAQVIDLVDMQDAQIRGLE---- 166
SFVspm   FLITDPEWLTFNPLSAVEIADLDDQETRDFLAHATIVLDNMADVVIQQREIEDLT---- 170
BFV      YQPGEYSQGFQCPVT-----QAEI--ALLNGQHLEEEITILREITHRLMQGVR---- 156
EFV      FQVGDDPSEHFVPIE-----ENLIPQEIIVNLGAARREVRLREMCVRLLVHRRQMMG 160
FFV      LQPGDGLSEGFQIPIT-----DEEIQAEVGTIGAARNEIRLLREALQRLQAGGVG--- 158
          :      : *                               :      :      : :
    
```

```

PFV      ---RQLAERS---STGQGGISPGAPRSRPPVSSFSGLPSLPSIPGIHPRAPSPPRATSTP 226
SFVczp   ---RQLAERS---SIGQGGISPGASHSRPPVSSFSGLPSLPAIPGIHTRAPSPPRATSTP 226
SFVora   ---QLVNELQRERDSGRGASIPGASS-PPPQSYVGLPGMPVSVGLSSLQP---EASSTP 221
SFVmac   ---GQLR-----GLRGNLPVAGTPPPPPSLDLQAAAASSPYVAPAPSAP-AASAAA 216
SFVagm   ---RRIQDRL-----GLRDNLVAGIQAPPSSPIG-QPIASSS-----LQPIP-GSSSSP 211
SFVspm   ---XTNLRRLR---NALASSGTYQPIGMPAQSSPAGPSASVAG----- 207
BFV      -----
EFV      MGM----- 163
FFV      -----
    
```

### PSAP-Motiv

### PSAP-Motiv

```

PFV      GNIPWSLGDSPSSSFPGPSQPRVSFHPGNPFVVEEG-HRPRSQSRERRR-----EILP 280
SFVczp   GNIPRSLGDDNMPSSSFAGPSQPRVSFHPGNPFVVEEG-HRPRSQSRERRRDIPSAPVIS 285
SFVora   -----GGRAPRVSFHPSNPFVVRPPSPERPRARSSER----- 252
SFVmac   ADLGFAGGPGPGS---LDPRLARVAYNPFPLGSPDGS-AAPAQPSAPPVASP--LPSL 270
SFVagm   ADL---DGIWTPRQ---IDPRLSRVAYNPFPLGSSDGSIGSIPVQPSAPPVAVLP--SLPS 263
SFVspm   -----PHMPAMPSVPYISAIPSAPPAPIPVAPAAAPPLGP---LPS 245
BFV      -----PPAVPQGPAPPPPPAQPAPLPAPPVIGP--PPP-----A 188
EFV      -----PGAIQPQPPVGLPAPAPQPPVPPVPPVPPVPPV-----A 197
FFV      -----RPIPGAVLQP----- 168
    
```

ERGEBNISSE

PSAP-Motiv

PFV APVPSAPPMIQYIPVP-----PPPIGTVIPIQHRSVTGEPNPREIPIWLGRNAPA 334  
 SFVczp APVPSAPPMIQYIPVP-----PPPPVGAIVIPIQHRSVTGEPNPREIPIWLGRNAPA 339  
 SFVora IPLPLQPPIQYVVPVLPV-APAPAPSPVIPIQHIRAVTGEVNNPRDIPMWIGRNAPA 311  
 SFVmac LPAQPMQPIQYVHPP-----PINPAQQVIPIQHIRAVTGNAPSNPREIPMWIGRNASA 324  
 SFVagm LPAPVSQPIIQYVAQP-----PV-PAPQAIPIQHIRAVTGNTPTNPRDIPMWLGRHSAA 316  
 SFVspm APAPPVLPVIQPNFTGTDGNGYTAVGVPVLPVIAQIKAVIGEAPTDARQIPLWVAKHAAA 305  
 BFV APAPAPGMPVPVQ-----HLPITHIRAVIGETPANIREVPLWLARAVPA 232  
 EFV PPAPVNPPVPPVQPIH-----HLPITHIRAVIGETPAQIRDVPLWLAQSIPA 244  
 FFV --QPVIGPV-----IPINHLRSVIGNTPPNPRDVALWLGRSTAA 205

\*: \*\*: :\*: \* : \* : \* : :\* : : \*

PFV IDGVFPVTPDLRCRIINAILGGNIGLSLTPGDCLTWDSAVATLFI RTHGTFFMHQLGNV 394  
 SFVczp IDGVFPTTTPDLRCRIINALLGGNLGSLTPGDCITWDSAVATLFI RTYGQYPLHQLGNV 399  
 SFVora IEGVYPVTPDLRARIINALIGGKSGIHLTAPEAVTWASAVAAIFTRTHGSFPMHNSAI 371  
 SFVmac IEGVFIPTSDIRSRVINALLGRQLGLNLDPQHCITWASAIATLYVRTHGSYPLHQLAEV 384  
 SFVagm IEGVFPMTTPDLRCRVNALIGGSLGSLLEPIHCVNWAAVVAALYVRTHGSYPIHELANV 376  
 SFVspm IEGTFPTGSADVRCRVNLALLTSHGGMTLSPNECGTWSLAAAALYQRIYGVIPHLHDLPH 365  
 BFV LQGVYPVQDAVMRSRTVNALTVRHPGLALEPLECGSWQECLAALWQRTFGATALHALGDT 292  
 EFV LTGVYPAMDAGTLTRLVNAITARHPGLALGMNEAGSWHEAVHLIWQRTFGATALHALSDV 304  
 FFV IEGVFPVIVDQVTRMRVNALVASHPGLTLTENEAGSWNAAISALWRKAHGAQAQHELAGV 265

: \* : \* \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

PFV IKGIVDQEGVATAYTLGMMLSGQNYQLVSGIIRGYLPGQAVVTALQQRLDQEIDDQTRAE 454  
 SFVczp LKGIADQEGVATAYTLGMMLSGQNYQLVSGIIRGYLPGQAVVTAMQQRLDQEIDDQTRAE 459  
 SFVora LTGIANGEGVESAYNLGMMLSNQDFNLVYGIVRGLLPGQAAVAYMQRLDAEPSDALRAQ 431  
 SFVmac LRRVSNSEGA AAAWQLGMMLTNQDYNLVGMVRPLLPQAVVTAMQHRLDQEVSDAARIV 444  
 SFVagm LRAVVTQEGVATGFQLGIMLSNQDYNLVWGIIRPLLPQAVVTAMQQRLDQEVNDAARIT 436  
 SFVspm MAEVARREGILVAFNMGMFTTNSFDVWVGIIRPLLPQASVAMLQGYLDQYQGGQKKAQ 425  
 BFV LGQIANS DGIVMAIELGLLFSDDNWDLVWVICRRLPLPGQAVCVAVQARLDPLPNATRIV 352  
 EFV LKGIAQRNGVMALEMGLMFTNDDWDLTWSVIRRLPLPGQASVVTIQARLDALPNQARI 364  
 FFV LSDINKKEGIQTAFNLGMQFTDGNWSLVWGIIRTLPLPGQALVTNAQSQFDLMGDDIQRAE 325

: : : \* : \* : : : : : \* \* \* \* \* : \* : \* : :

GR-Box I

PFV TFIQHNLNAVYEILGLNARGQSIRAS--VTPQPRP---SRGRG-RGQNTSR-----PSQ 501  
 SFVczp TFIQHNLNAVYEILGLNARGQSIRAS--VTPQPRP---SRGRG-RGQSAPE-----PSQ 506  
 SFVora NFIQHHLVYEILGLNHRGQSIRTS--LPTSTRPRGQGRGRG-QGQGSIP-----STP 481  
 SFVmac SFVNHLNAVYELLGLNARGQNLRS--TGGQTTAR-TSAGRGARGRRSQQGTTPGRQSSGQ 501  
 SFVagm SFNGHLNDIYQLLGLNARGQSIARA--QSASTSGNSASAGRGRGRTQQ-----QAGRQ 489  
 SFVspm AFPTLLRRTFETLGLNYLQGSIRSN--QPARTSGSVAGSITQGRGRGQPRS----RPPNR 479  
 BFV MISHIIRDVYAILGLDPLGRPMQQT--LPRRNQPP--RQQPQRRQPPR----TGNQEE 404  
 EFV QAGFIIREVYEVGLDPLGRPLNFPGGLTQRDTAVPVTRGRGRGRTGPRRGVPLPVSSNQ 424  
 FFV NFPRVINNLTYMLGLNIHQGSIRPR-----VQTQPLQTRPRNPGRSQQGQ-----LNQ 373

: . : \* \* \* : \* : :



## ERGEBNISSE

		GR-Box II
PFV	GPANSGRGRQRPASGQSNRGS-STQNQNQDNLNQ-----GGYNLRPRTYQPQRYGGG	552
SFVczp	GPVNSGRGRQCPAPGQNDRGS-NIQNQGEENSSQ-----GGYNLRSRTYQPQRYGGG	557
SFVora	RRPQSGRGLSTPNRGSNNANN-NTQSNVQTETPRRS-----FGGYNLRPNTFRPQRYGGG	535
SFVmac	APPQGRSSSQGQQPRQSESGDQNNQRQLQGNNR-----GGYNLRPRTYQPQRYGGG	553
SFVagm	QQQQTRRTNQGNQ-GQRDNNQRQSSGGNQQRGQ-----GGYDLRPRTYQPQRYGGG	540
SFVspm	<b>ASNRSNNPPRPPPPRSQEQQPSPAGRGSSSSSAPPQ-----</b> <b>RSGYNLRQQINRPQRLGGG534</b>	
BFV	RGQRNRGRQNAQTPRQEGNRLQNS--QLPGPRDCPN--NSNQPRYPLRPNPQQPQRYGQE	460
EFV	RRQETAGGNQPQTQPQQNTFSNQTNRGNQRQWQNRGTDSQRRYFFRPRPSQPQRYGSN	484
FFV	PRPQNRANQSYRPPRQQQHQSDVP--EQRDQRGSPQPPRGSGGGYNFRRNPPQRYG--	429
.		* : * . : * * *

<u>YXXL-Motiv</u>	GR-Box III
PFV	RGRRWWDNTNNQESRPSDQGSQT-PRPNQAGSGVRGNQSQTFRPAAGRGRGNHNRNQRS 611
SFVczp	RGRRWWDNTNNQESRPSDQGSQT-PRPIQAGSGVRGNQSQTFRPAAGRGRGNHNRNQRS 616
SFVora	QGQRR----DSQPDRRSQSSQN-NRP-SAPLESERGEQSRGPGGGGRAGRRNQRNNSGQ 589
SFVmac	RGRRWWD-----QTARADNQRSQSQQPQSEARGEQSRTSGAGREGGGRGNQRNQRS 606
SFVagm	RGRRWWDNQQQQQAQPRSSDQPRSQSQQPQPEARGDQSRTSGAGRGQQGRGNQRNQRN 600
SFVspm	PNP <b><u>YRN</u></b> ----- <b><u>LENRN</u></b> IPRSETVPSRRAETSETNRPNQ <b><u>ARGGQQGS</u></b> SNRNQT 582
BFV	QNRGNNPNPYRQPTPGNGNQNRN-----FSRGPAPVNEQ-----SRGRGRSSQGTNNT 508
EFV	QGP-DNPNPYR-----GRDSTN-----QSQGERQLPQQ-----QQGSRRGPRNTNS 525
FFV	QGP-PGPNPYR--FGDGGNPQQ-----QGPPNRPDQGPDPGGNPRGGGRGQGRNGG 481
.	

<b>p68-p3-Schnittstelle <u>PSAP-Motiv</u></b>	
PFV	SGAGDSRAVNTVTQS-----ATSSTDESSAVTAASGGDQRD 648
SFVczp	SGAGDSRAVNTVTQS-----ATSSTDESSSTTTAAPSGGQGN 653
SFVora	GNESSHAVNAVTQS-----AVTEQQNESPTPPPTSGGRS-- 624
SFVmac	AGENTDRSVNTVTAT--SASISASQNGSSTTPPASGSGNQGN 647
SFVagm	ADANNTRNVDVTATTTSSSTASSQNGSSTTPPASGSRNQGD 643
SFVspm	RS <b><u>INTV</u></b> RASDSQVI <b><u>PSAP</u></b> PAETNPAATAVTPNGPNQHSGRN-- 623
BFV	G-SSAVHSVRLTSAAPP-----IPPQDAGTPPTSSGNQGQSS- 544
EFV	G-NNTVHTVRQVESSQ-----LQQNASPTASPSTNQGGQP- 559
FFV	GSAAAVHTVKASENET-----KNGSAEAVDGGKGGKD- 514
:	

**Abb. 27:** Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von FV-Gag mit Motiven (in aa).

### 3.2.4 Charakterisierung von Pol

Das *pol*-Gen, das die genetische Information für die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase/Ribonuklease H (RT/RNaseH) und Integrase (IN) enthält, umfasst den Genomabschnitt von Nucleotid 3181 bis 6624. Das Pol-Protein hat somit eine Länge von 1149 Aminosäuren.

Im Gegensatz zu anderen retroviralen Pol-Proteinen wird das Pol-Protein der FV nicht vollständig in die einzelnen Enzyme geschnitten. Die einzig bekannte Schnittstelle liegt zwischen der RT/RNaseH und der Integrase. Durch Sequenzvergleiche konnte sie beim SFVspm an den Aminosäuren 744-751 lokalisiert werden, sie trägt das Motiv YSVN / TINK (siehe Abb. 28). Dadurch entsteht ein multifunktionales Enzym PR-RT/RNaseH mit einer Länge von 747 aa und das Enzym Integrase mit einer Länge von 401 aa.

BFV	747	YKVFSNEL	754
EFV	745	YTVFSVQT	752
PFV	748	YVVNCNTK	755
SFVcpz	748	YVVNCNTK	755
SFVora	748	YVVNNIIK	755
SFVmac	748	YVVHCNTT	755
SFVagm	748	YVVNINTT	755
SFVspm	744	<b>YSVNTINK</b>	751
FFV	745	FKVHMTKN	752

**Abb. 28:** Mögliche Schnittstellen RNaseH/IN in Pol.

Das katalytische Zentrum der Protease befindet sich an den Aminosäuren 20 bis 23. Mit seiner Sequenz D<sup>20</sup>TGA<sup>23</sup> hebt es sich von dem konservierten Motiv der anderen Primaten-FV (DSGA) ab und stellt interessanterweise die gleiche Sequenz wie bei EFV und auch bei HIV dar.

Das aktive Zentrum der RT mit dem konservierten Motiv YVDD befindet sich an Position 308 bis 311, die katalytisch bedeutsamen Aminosäuren für die RNaseH Domäne D<sup>665</sup>S<sup>666</sup>H<sup>716</sup>N<sup>732</sup> im Bereich zwischen aa 665 und 732. Das Zinkfingermotiv der Integrase konnte an der Sequenz H<sup>809</sup>-H<sup>813</sup>-C<sup>843</sup>-C<sup>846</sup> lokalisiert werden, ihr aktives Zentrum mit dem DD35E Motiv an der Sequenz

## ERGEBNISSE

D<sup>875</sup> – D<sup>932</sup> und E<sup>968</sup>. Die folgende Abbildung 29 zeigt den Vergleich der Aminosäure-Sequenzen verschiedener FV-Pol-Proteine mit ihren charakteristischen Motiven.

### Aktives Zentrum der Protease

BFV	---MPALRPLQVEIKGNHLKGYWDSGAEITCVPAIYIIEEQVPGKLLITTIHNEKEHDVY	57
EFV	---MQALQPLQVQIKGNSLKGfyDTGAEITCVPAIFLIEEEPIGERTIQTIHGITKEKVY	57
PFV	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWDSGATITCIPESFLEDEQPIKKTLIKTIHGKQQNVY	60
SFVcpz	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWDSGATITCIPESFLEDEQPIKQTLIKTIHGKQQNVY	60
SFVora	MSLQHLLQPLEAEVKGTKLKAHWDSGTTITCIPVFLTDEIPKDVLIKTIHGERRQPAY	60
SFVmac	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWDSGATITCVPEAFLEDERPIQTMLIKTIHGKQQDVY	60
SFVagm	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWDSGATITCVPAFLEEEVPIKNIWIKTIHGKEQPVY	60
SFVspm	----MAQTNI PVEIKGTQLNGFW <u>DTGA</u> QITCIPQSFLLEDEQPIGTTDIETIHGKQKQKLY	56
FFV	---MDLLKPLTVERKGVKIKGYWDSQADITCVPKDLLQGEFPVRQQNVTTIHGTQEGDVY	57
	: .: ** : .: *: : **:* : * *: : ** . . *	
BFV	YVEMKIEKRKVQCEVIATALDYVLVAPVDIPWYKPGPLELTIKIDVESQKHTLITESTLS	117
EFV	YLTFKIQGRKLAAEVIGTQLDYVVIAPSDIPWYKYELELTIKIDIQQQEQQLLHTTNLS	117
PFV	YVTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPDVPWLTQQPLQLTILVPLQEYQEKILSKTALP	120
SFVcpz	YLTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPDVPWLTQQPLQLTILVPLQEYQDRILNKTALP	120
SFVora	YLTFKINGRKVQAEVIASPYDYILLCPADVPWLQQPLQLTVLVPLEYKERILKETALE	120
SFVmac	YLTFKQVGRKVEAEVLASPYDYILLNPSDVPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALP	120
SFVagm	YLTFKIQGRKVEAEVISSPYDYILVSPDIPWLMKKPLQLTTLVPLQEYEEERLLKQTMLT	120
SFVspm	YLKFKVLGRKVEAEVTSSTLAYVILAPIDIPWYKPTPLELTIKLPVQDLKNTLVSQANIG	116
FFV	YVNLKIDGRRINTEVIGTTLDYAIIITPGDVPWILKKPLELTIKLDLEEQQGTLNNSILS	117
	*: *: *: *: * .: * *: * ** *: ** : .: : : :	
BFV	PQGQMLKLLDQYQALWQCWENQVGHRRIEPHKIATGALKPRPQKQYHINPRAKADIQI	177
EFV	SEGKYLKDLFIKYDNLWQKQWENQVGHRRITPHKIATGTLNPKPQKQYRINPKAKADIQI	177
PFV	EDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWHENQVGHRRIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQI	180
SFVcpz	EEQKQQLKALFTKYDNLWQHWHENQVGHRRIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQI	180
SFVora	GQFKQQLQNILSTFDTLWQHWHENQVGHRRIPPHNIATGTHPPRPQKQYPINPKAKESIQI	180
SFVmac	KEQKELLQKFLFLKYDALWQHWHENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQI	180
SFVagm	GSYKEKLQSLFLKYDALWQHWHENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQT	180
SFVspm	KEDKIKLAKLLDKYDDLWQQWQVGNRITPHNIATGTYPKPKQKQYHINPKAKPSIQI	176
FFV	KKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQI	177
	. : * : : . ** * : ** : * * : ** * * * * * * * * * * * * * * * * *	

ERGEBNISSE

BFV VIDDLLRQGVLRQONSEMNTVPVYPVKADGRWRMVLVDYREVNKVTPLVATQNCHSASILN 237  
EFV VIDDLLKQGVLKQQTspmNTPVYPVKPDGRWRMVLVDYRAVNKVTPIATQNCHSASLLN 237  
PFV VIDDLLKQGVLTQNSTMNTVPVYPVKPDGRWRMVLVDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILA 240  
SFVcpz VIDDLLKQGVLTQNSTMNTVPVYPVKPDGRWRMVLVDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILA 240  
SFVora VINDLLKQGVLIQQNSIMNTPVYPVKPDGRWRMVLVDYREVNKTIPLIAAQNHASAGILA 240  
SFVmac VIDDLLKQGVLIQQNSTMNTVPVYPVKPDGKWRMVLVDYREVNKTIPLIAAQNHASAGILS 240  
SFVagm VINDLLKQGVLIQQNSIMNTPVYPVKPDGKWRMVLVDYREVNKTIPLIAAQNHASAGILS 240  
SFVspm VINDLLKQGVLRQSTspmNTPVYPVKPDGKWRMVLVDYRAVNKTIPLIAAQNHASLGILT 236  
FFV VINDLLKQGVLIQKESTMNTVPVYPVKPNGRWRMVLVDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILG 237  
\*\*:\*:\*:\*:\*:\* \* \* \* \* \* :\*:\*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* :\*

BFV TLYRGPYKSTLDLANGFWAHP IKPEDYWITAFTWGGKTYCWTVLPQGFLNSPALFTADV 297  
EFV TLYRGQYKTTLDLANGFWAHP IQESDQWITSFTWNGKSYVWTTLPQGFLNSPALFTADV 297  
PFV TIVRQYKTTLDLANGFWAHP ITPESYWLTAFTWQKQYCWTRLPQGFLNSPALFTADV 300  
SFVcpz TIVRQYKTTLDLANGFWAHP ITPDSYWLTAFTWQKQYCWTRLPQGFLNSPALFTADV 300  
SFVora SIYRGTYKTTLDLANGFWAHP ITPNYSYWLTAFTWQKQHCWTRLPQGFLNSPALFTADV 300  
SFVmac SIYRGKYKTTLDLTNGFWAHP ITPESYWLTAFTWQKQYCWTRLPQGFLNSPALFTADV 300  
SFVagm SIFRGYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQYCWTRLPQGFLNSPALFTADV 300  
SFVspm NLIRHKYKSTIDLSNGFWAHP ITEDSQWITAFTWEGKQHVWTRLPQGFLNSPALFTADV 296  
FFV SLFKGRYKTTIDLSNGFWAHP IVPEDYWITAFTWQKQYCWTVLPQGFLNSPGLFTGDV 297  
. : : \*:\*:\*:\*:\*:\* \* \* \* \* \* :\*:\*\*\* \* : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* .\*\*\*.\* \*

Aktives Zentrum der RT

BFV DILKDI PNQVYVDDVYVSSATEQEHL DILETIFNRLSTAGYIVSLKSKLAKETVEFLG 357  
EFV DLLKDI PNVEVYVDDVYF SNDTEEEHLKTM DLLFQKLQTAGYIVSLKSKLQHTVDFLG 357  
PFV DLLKEI PNQVYVDDIYLSHDDPKHEVQQLKQVQILLQAGYVVSLLKSEIGQKTVEFLG 360  
SFVcpz DLLKEV PNQVYVDDIYLSHDDPHEHIQQLKQVQILLQAGYVVSLLKSEIGQRTVEFLG 360  
SFVora DLMKHI PNQVYVDDIYLSHDDPQEHLQVLQVHLHLDAGYVVSLLKSAIAQKVVEFLG 360  
SFVmac DLLKEI PNQAYVDDIYLSHDDPQEHLQLEKIF SILLNAGYVVSLLKSEIAQREVEFLG 360  
SFVagm DLLKEV PNQVYVDDIYLSHDDPREHLEQLEKVF SLLNAGYVVSLLKSEIAQHEVEFLG 360  
SFVspm DILKEVPGVSVYVDDIYISSPTMEEHFQVLD SIFRKLLETGYIVSLKKSALARYEVNFLG 356  
FFV DLLQGI PNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLG 357  
\*::: :\*. \* . \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \*

BFV FSISQNGRGLTDSYKQKLM DLQPPTTLRQLQSILGLINFARNFLPNFAELVAPLYQLIPK 417  
EFV FQITQTGRGLTDSYKSKLLDITPPNTLQQLQSILGLLNFARNFIPNYSELITPLYQLIPL 417  
PFV FNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAS 420  
SFVcpz FNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAS 420  
SFVora FNITKTGRGLTDAFKEKLLNISPPQNLKQLQSILGLMNFARNFIPNYAERVKPFYSLIST 420  
SFVmac FNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAN 420  
SFVagm FNITKEGRGLTETFKQKLLNITPPRDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFSELVKPLYNI IAT 420  
SFVspm FVISETRGLTSEFRERLQEITPPTTLKQLQSILGFLNFARNFVFNFSSELVQPLYQLIST 416  
FFV FQITNEGRGLTDTFKKLENITAPTTLKQLQSILGLLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPK 417  
\* \*::: \* \* \* \* \* : : \* \* : \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* : : \* \* : \*

ERGEBNISSE

BFV	AKGQCIPWMDHTTQLKTI IQALNSTENLEERRPDVDLIMKVHISNTAGYIRFYNHGGQK	477
EFV	AKGIYIPWETKHTAILQKI IKELNASENLEQRKPDVELIVKVHVSPTAGYIKFANKGSIK	477
PFV	AKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTPSPSAGYVRYYNETGKK	480
SFVcpz	SKGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTPSPSAGYVRYYNESGKK	480
SFVora	AKSNNILWNDELTSQLQELITLLNQADNLEERKPTTRLI IKVNSSSHAGYIRYYNEGSKK	480
SFVmac	ANGKFISWTEDNSQLQHI ISVLNQADNLEERNPETRLI IKVNSSPSAGYIRYYNEGSKR	480
SFVagm	ANGKYITWTTDNSQQQLQNI ISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKR	480
SFVspm	ASGNFIQWTAEHTLRLNELISALNHAGNLEQRRGDSPLVVKVNASDKTGYIRYYNDNSLI	476
FFV	STKNYVPWQIEHSTTLETITLTKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKK	477
	:. : * . : * : * ** : * : * * : : * * : * : * .	
BFV	PIAYNNALFTSTELKFTPEKIMATIHKGLLKALDLSLGKEIHVYSAIASMTKLQKTPLS	537
EFV	PIAYHNVVFSKTELKFTITEKVMTTIHKALLKAFDLAMGQPIWVYSPIHSMTRI QKTPLT	537
PFV	PIMYLNIVFVSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAGMQEILVYSPIVSMTKI QKTPLP	540
SFVcpz	PIMYLNIVFVSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAGMQEILVYSPIVSMTKI QKTPLP	540
SFVora	PILYINIVFVSKAEKFSMLEKLLTTLHKALIKAVDLAMGTEIMVYSPIVSMTKI QKTPLP	540
SFVmac	PIMYVNYIFVSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAGMQEILVYSPIVSMTKI QRTPLP	540
SFVagm	PIMYLNIVYTKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKI QKTPLP	540
SFVspm	PIAYASHVFTAELKFTPELEKLLVTMHRALLKGDIDLAGQPIKVYSPIASMQKLQKTPIP	536
FFV	PISYVSIVFVSKTELKFTTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNI QKTPT	537
	** * . : : . : * ** : ** : . : * : . * : * . * * * . * * * . : : * * .	
BFV	ERKALSIRWLKWQTYFEDPRIKFHHDATLPDLQNLVPPVQDGTGKEMTILPLLHYEAI FYT	597
EFV	ERKALSIRWLKWQTYFEDPRLI FHYDDTLPDLQNL --PQTTLGNEVDILPLSEYEVV FYT	595
PFV	ERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPPELKHI --PDVYTSSQSPVKHPSQYEGV FYT	598
SFVcpz	ERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPPELKHI --PDVYTSSIPPLKHPSQYEGV FCT	598
SFVora	ERKALPVRWITWMTYLEDPRI TFHYDKTLPPELKDV --PSVYQNDIPIVPHPSQYSMV FYT	598
SFVmac	ERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQOI --PNVTEDVIAKTKHPSEFAMV FYT	598
SFVagm	ERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPPELQQV --PTVTDDIIAKIKHPSEFSMV FYT	598
SFVspm	ERKALSTRWVTWLSYLEDPRI TFYYDKTLPDLKHV --PASTDNNIITLLPITEYEAV FYT	594
FFV	AKKALASRWLSWLSYLEDPRI RFFYDPQMPALKDL --PAVDTGKD-NKKHPSNFQHIF FYT	594
	: * * . * * : . * : * : * * * : * : * : * . . : : * * .	
BFV	DGSAIRSPKPNKTHSAGMGI IQAKFEP-DFRIVHLWSFPLGDHTAQYAEIAAFEFAIRRA	656
EFV	DGSSIKSPKKDKQHSAGMGI IAVRYQP-QMNI IQEWSIPLGDHTAQFAEIAAFEFALKQA	654
PFV	DGSAIKSPDPTKSNNAGMGI VHATYKP-EYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKA	657
SFVcpz	DGSAIKSPDPTKSNNAGMGI VHAIYNP-EYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKA	657
SFVora	DGSAIKNPNTKTHSAGMGVVQGFNP-EFQVVNQWSIPLGNHTAQLAEVAAVEFACKQA	657
SFVmac	DGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIP-EYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKA	657
SFVagm	DGSAIKHPNVNKSNNAGMGIAQVQFKP-EFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKA	657
SFVspm	DGSAIKSPKTEQTHSAGMGI VVVYTP-EPNITQQWSIPLGDHTAQYAEISAVEFACKKA	653
FFV	DGSAITSPTKEGHLNAGMGI VYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKC	654
	* * * : * * . * * * : : : * * : * * . * * * * * * : : . : .	

ERGEBNISSE

Aktives Zentrum der RNaseH

BFV TGIRGPVLIVTDSNYVAKSYNEELPYWESNGFVNKKKTLKHISKWKAIAECKNLKADIIH 716
EFV IRKMGPVLIVTDSYVAKSYNQELDFWVSNNGFVNKKKPLKHVSKWWSIADCKKHKADIIH 714
PFV LKIPGPVLIVITDSFYVAESANKELPYWKSNGFVNKKKPLKHISKWWSIAECLSMKPDIT 717
SFVcpz LKVPGPVLIVITDSFYVAESANKELPYWKSNGFVNKKKEPLKHISKWWSIAECLSIKPDIT 717
SFVora LKITGPVLIITDSFYVAESANKELPYWKSNGFVNKKKPLKHVSKWWSIADCLSLKTGIT 717
SFVmac LKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPYWKSNGFLNKKKPLRHVSKWWSIAECLQLKPDII 717
SFVagm LKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKELPYWQSNNGFFNKKKPLKHVSKWWSIADCIQLKPDII 717
SFVspm SLLQGPVLIVTDSYVARSANKELPFWRSNNGFLNKKKPLKHISKWKNISDLSLLKRNI 713
FFV LPLGGNILLVVTDSNYVAKAYNEELDVMASNGFVNRRKKPLKHISKWWSVADLKRLRPDVV 714
\* :\*:\*\*\* \*\* . : \*\* \* \*\*\*\* .\*\*:\* : \* :\*\*\* \*\* : : : . :

Aktives Zentrum der RNaseH Schnittstelle RNaseH/IN

BFV VIHEPGHQPAEASPHAQGNALADKQAVSGSYKVSNELKPSLDAELEQVLTSTGR---PNP 773
EFV VIHEPGHQNDLQSPYAMGNNAADKLAVKASYTVFSVQTLPSLDAELHQLLDKQT---PNP 771
PFV IQHEKGISLQIPVFIKGNALADKLATQGSYVVCNTKKPNLDAELDQLLQGH-----YI 772
SFVcpz IQHEKGHPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVCNTKKPNLDAELDQLLQGN-----NV 772
SFVora IKHEKGHPSHTSVHTEGNALADKLATQGSYVVN-NI IKPSLDAELDQVLLQGN-----LP 771
SFVmac IMHEKGHPMTTLHTEGNALADKLATQGSYVVCNTT-PSLDAELDQLLQGH-----YP 771
SFVagm I IHEKGHP TASTFHTEGNALADKLATQGSYVVCNTT-PSLDAELDQLLQGH-----YP 771
SFVspm IVHEPGHQPSKTSIHTLGNLADKLAVQGSYVNTINKIPSLDAELNQLILEGN-----LP 768
FFV VTHEPGHQKLDSSPHAYGNLADQLATQASFKVHMTKN-PKLDIEQIKAIQACQNNERLP 773
: \*\* \* . \*\* \*\*: \* . . . \* : \* \* . \*\* \* : . :

BFV QGYPNKYEYKLVNGLCYVDRRGEGLKIIPKADRVKLCQLAHDGPGSAHLGRSALLLKL 833
EFV KGYPSKYEYTLRDGQVYVKR--TDGEKIIPSKDDRVKILELAHKGPGSGHLGKNTMYIKI 829
PFV KGYPKQYTYFLEDGKVKVSR--PEGVKIIPPQSDRQKIVLQAHN---LAHTGREATLLKI 827
SFVcpz KGYPKQYTYLEDGKVKVSR--PEGVKIIPPQSDRQKIVLQAHN---LAHTGREATLLKI 827
SFVora KGYPKHFVYTLLEEGKVIIVKR--PEGTKIIPPLADRKLLASQAHK---LSHSGREATLLKL 826
SFVmac PGYPKQYKYTLEENKLIVER--PNGIRIVPPKADREKIISTAHN---IAHTGRDATFLKV 826
SFVagm KGFPKHYQYQLENGQVMVTR--PNGKRIIPKSDRPQIILQAHN---IAHTGRDSTFLKV 826
SFVspm KGYPKQYKYVLKNNELIVQR--PEGDKIIPPKADRLPLVKTAHE---LAHTGREATLLKL 823
FFV VGYPKQYTYELQNNKCMVLR--KDGWREIPPSRERYKLIKEAHN---ISHAGREAVLLKI 828
\*:\*.:: \* \* :. \* \* : : :\*. : \* : \*\* . \* \* :. : :

Zinkfinger Motiv der Integrase

BFV QQKYWWPRMHIDASRIVLNCTVCAQTNSTNQKPRPPLVIPHDTKPFQVWYMDYIGPLPPS 893
EFV LNKYWWPNLIKDISKYIRTCTNCIITNTDNPVNSYIVQEKTLQPFQKYMDYIGPLPPS 889
PFV ANLYWWPNMRKD VVKQLGRCKQCLITNASNKASGPILRPDRPQKPFDKFFIDYIGPLPPS 887
SFVcpz ANLYWWPNMRKD VVKQLGRCKQCLITNASNKTSGPILRPDRPQKPFDKFFIDYIGPLPPS 887
SFVora SNTYWWPNMRKD VVKVIGQCQCCLVTNPSNLTS GPILRPDRPQKPFDKFFIDYIGPLPPS 886
SFVmac SSKYWWPNLRKD VVKSI RQCKQCLVTNATNLTS PPILRPVKPLKPFDKFYIDYIGPLPPS 886
SFVagm SSKYWWPNLRKD VVKVIRQCKQCLVTNAATLAAPPILRPDRPQKPFDKFFIDYIGPLPPS 886
SFVspm QTTHWWPNMRKDIITVLRQCKPCLQTDSTNLTP IPPVSQPRPVKPFDKFFIDYIGPLPPS 883
FFV QENYWWPKMKKDISSFLSTCNVCKMVNPLNLKPI SPQAI VHPKPFDKFYMDYIGPLPPS 888
:\*\*\*. : \* : \* \* :. . . : \*\* : : :\*\*\*\*\*

ERGEBNISSE

Aktives Zentrum der Integrase

BFV NGYQHALVIVDAGTGFTWLYPTKAQTANATVKALHTLTGTAVPKVLHSDQGPAFTSSILA 953  
EFV DGYHYHLVIVDEGTGYTWLYPTKAQTANATVKALNHLTGTAIPKVLHSDQGSAAFTSATLV 949  
PFV QGYLYVLVVVDGMTGFTWLYPTKAPSTSATVKSLNVLTSIAIPKVIHSDQGAAFTSSTFA 947  
SFVcpz QGYLYVLVIVDGMTGFTWLYPTKAPSTSATVKSLNVLTSIAIPKVIHSDQGAAFTSSTFA 947  
SFVora NGYLHVLVVVDAMTGFVWLYPTKAPSANATVKALNMLTSIAVPKVIHSDQGAAFTSSTFA 946  
SFVmac NGYLHVLVVVDSMTGFVWLYPTKAPSTSATVKALNMLTSIAIPKVLHSDQGAAFTSSTFA 946  
SFVagm NGYLHVLVVVDSMTGFVWLYPTKAPSTSATVKALNMLTSIAVPKVIHSDQGAAFTSATFA 946  
SFVspm HGFSYVLVIVDARTGFTWLYPTKAPSTNATINSLNLLGTAIKPKVLHSDQGSAFTSATFA 943  
FFV EGYVHVLVVVDAATGFTWLYPTKAQTSKATIKVLNHLTGLAIPKVLHSDQGSAAFTSEEFA 948  
. \*: :. \*\*: \*\* \*\*: . \*: \*\*\*\*\* :. \*\*: : \* . \* . \*: \*\*\*\*\* . \*\*\*\*\* : .

Aktives Zentrum der Integrase

BFV DWAKDRGIQLEHSAPYHPQSSGKVERKNSEIKRLLTKLLAGRPTKWYPLIPIVQLALNNT 1013  
EFV AWAKDKGIQMEYSSPYHPQSSGKVERKNSEIKRLLTKLLVGRPTKWYPLIPTVQLALNNT 1009  
PFV EWAKERGIHLEFSTPYHPQSSGKVERKNSDIKRLTKLLVGRPTKWYDLLPVVQLALNNT 1007  
SFVcpz EWAKERGIHLEFSTPYHPQSSGKVERKNSDIKRLTKLLVGRPTKWYDLLPVVQLALNNT 1007  
SFVora DWAKEKGIHLEYSTPYHPQSSGKVERKNSDIKRLTKLLVGRPTKWYDLLSTVQLALNNA 1006  
SFVmac DWAKEKGIQLEFSTPYHPQSSGKVERKNSDIKRLTKLLIGRPAKWYDLLPVVQLALNNS 1006  
SFVagm DWAKNKGIQLEFSTPYHPQSSGKVERKNSDIKRLTKLLVGRPAKWYDLLPVVQLALNNS 1006  
SFVspm EWAKDRSIQLEFSTPYHPQSSGMVERKNKEIKRLITKLLVGRPTKWYPLLPVQLALNNT 1003  
FFV QWAKERNIQLEFSTPYHPQSSGKVERKNSEIKKLLTKLLVGRPLKWYNLISSVQLALNNT 1008  
\*\*\*\*\* :. \*: :. \*: \*\*\*\*\* . \*\*\*\*\* :. \*\*: : \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* :. \*\*\*\*\* :

BFV PNTRQKYTPHQLMYGADCNLPFENLDTLDTREEQLAVLKEVRDGLLDLYSPSPQTARS 1073  
EFV PNAKIGKTPHQLMYGVDCNLPFDLSTLDTREEQLAVLQEIRTALEQPAQHP--TLPK 1066  
PFV YSPVLKYTPHQLLFGIDSNTPFANQDTLDTREEEELSLLQEIRTSLYHPSTPP--ASSRS 1065  
SFVcpz YSPVLKYTPHQLLFGIDSNTPFANQDTLDTREEEELSLLQEIRASLYQPSTPP--ASSRS 1065  
SFVora YSPILKHTPHQLLFGVDANIPFANQDTLDTREEEELSLLQEIRESLIQPPSP--ASSRS 1064  
SFVmac YSPSSKYTPHQLLFGVDSNTPFANSDTLDSREEEELSLLQEIRSSLHQPTSP--ASSRS 1064  
SFVagm YSPSSKYTPHQLLFGIDSNTPFANSDTLDSREEEELSLLQEIRSSLYLPSTPP--ASIRA 1064  
SFVspm YSPRTKLTPHKLLFGVDGNVPFANQDTLDTREEEELSLLAELRSSFLPSASPP--ASSRS 1061  
FFV HVVSTKYTPHQLMFGIDCNLPFANKDTLDWTREEELALLQEIRESLQHPVQPP--TCSG 1065  
\*\*\*: :. \*: \* \* \* \* : . \*\*\* : \*\*\*\*\* : \* \* \* : . \* :

BFV WTPSPGLLVQERVARPAQLRPKWRKPTPIKVLNERTVIDHGLG-QDKVVSIDNLKPAAH 1132  
EFV WTPCPGLLVQERVNRPAQLRPKWKKPTPIKVLNPKTVVIAGPGGQERIVSIDNLKKTTPH 1126  
PFV WSPVVGQLVQERVARPASLRPRWHKPTVVKVLNPRTVVILDHGLGNNRTVVSIDNLKPTSH 1125  
SFVcpz WSPVVGQLVQERVARPASLRPRWHKPTVLEVLNPRTVVILDHGLGNNRTVVSIDNLKPTSH 1125  
SFVora WTPAVGLLVQERVARPASLRPRWHKPKVILEVLNPRTVVILDHGLGNNRTVSVDNLKLKTAN 1124  
SFVmac WSPSVGQLVQERVARPASLRPRWHKPTAILEVVPRTVVIILDHGLGNNRTVSVDNLKLKTAY 1124  
SFVagm WSPSVGQLVQERVARPASLRPRWHKPTVLEVINPRAVVIILDHGLGNNRTVSVDNLKLKTAY 1124  
SFVspm WRPSVGLLVQERVARPSQLRPKWKKPVICELINDRTVVIIVDKAGNKRTVVSIDNLKLTTPH 1121  
FFV WSPVVGQLVQERVYRPSQLRPKWRKPTKVLKILNPRTVVIIVDHLGQRKSVSIDNLKPTAH 1125  
\* \* \* \*\*\*\*\* \*\*: . \*: \*\*\*\*\* : : : \* : \* \* : : \* : \*\*\*\*\* : .

## ERGEBNISSE

BFV	QK----LAQTPDPAEICPSATPCPPNTSLWYDLDTGTWTCQRCGYQCPDKYHQPOCTWSC	1188
EFV	HD----TSNDSTRMDAVEVPTQC-----	1146
PFV	Q---NGTTNDTATMDHLEKNE-----	1143
SFVcpz	Q---NGTTNDTATMDHLEQNEQSS-----	1146
SFVora	Q---NGSTNDSTTMAGLGQNAESQ-----	1145
SFVmac	QD--NGTSNDSGTMALMEEDSSTST-----	1149
SFVagm	QK--DGTPNESAAVVAMEKDE-----	1143
SFVspm	QKNSHGSTPDITGMDVMEQEEEPGNMD-----	1148
FFV	QHNGTRTCDDPEGMDGMECSQTTTETSVDSS-----	1156
	:	
BFV	EDRCGHRWKECGNCIPQDGSSDDASAVAAVEI	1220
EFV	QDQRGHT-----	1153
PFV	-----	
SFVcpz	-----	
SFVora	-----	
SFVmac	-----	
SFVagm	-----	
SFVspm	-----	
FFV	-----	

**Abb. 29:** Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von FV-Pol mit Motiven (in aa).

### 3.2.5 Charakterisierung von Env

Das offene Leseraster für *env* beginnt an Nukleotid 6657 und endet an Nukleotid 9514. Dies ergibt ein Env-Protein mit einer Länge von 986 Aminosäuren.

Wie bei den bisher bekannten FV kann man auch bei SFVspm drei Untereinheiten des Env-Proteins erkennen: das Leader-Peptid (LP), die Surface-Untereinheit (SU) und die Transmembran-Untereinheit (TM), die alle drei im Virion zu finden sind. Den Schnittstellen konnten anhand von Homologien folgenden Sequenzabschnitten des Env-Proteins zugeordnet werden: die LP/SU-Schnittstelle befindet sich C-terminal von R<sup>126</sup>SPR<sup>129</sup> /, die SU/TM-Schnittstelle C-terminal von R<sup>568</sup>QRR<sup>571</sup>/. Beide Schnittstellen stellen Motive für eine Abspaltung durch Furin-ähnliche Proteasen dar. Somit besitzt LP eine Länge von 129 aa, SU von 443 aa und TM von 415 aa. Tabelle 13 zeigt die Größen der drei Env-Untereinheiten von SFVspm im Vergleich zu anderen FV.



	SFVspm	PFV	SFVcpz	SFVora	SFVmac	SFVagm	FFV	BFV	EFV
<b>Env</b>	986	988	988	989	989	982	982	990	986
<b>LP</b>	129	126	126	126	126	126	127	123	122
<b>SU</b>	442	445	445	446	447	441	434	449	441
<b>TM</b>	415	417	417	417	416	415	419	418	423

**Tabelle 13:** Größenvergleich der Env-Untereinheiten verschiedener FV in aa.

Außerdem konnten den jeweiligen Env-Proteinen spezifische Domänen zugeordnet werden. So befindet sich ein Gag-Interaktionsmotiv im LP an Aminosäure-Position W<sup>11</sup> und W<sup>13</sup>, das eine bedeutende Rolle beim Partikel-Zusammenbau spielt. Die Signalsequenz des LP, welche das Env-Protein zum rER dirigiert, konnte im Bereich der Aminosäuren 69 bis 86 identifiziert werden. Die hydrophobe membrandurchspannende Region, die den N-terminalen zytoplasmatischen Teil des LP vom C-terminalen extrazellulären Teil abtrennt, befindet sich an den Aminosäure-Positionen 59 bis 95. Dieser Bereich wurde durch eine Analyse der Hydrophobizität vorausgesagt, ebenso konnte das hydrophobe Fusionspeptid (FP) im TM-Protein und dessen membrandurchspannende Domäne (MSD) ermittelt werden. Das FP erstreckt sich von den Aminosäuren 572 bis 589, die MSD von 949 bis 973 (siehe Abb. 30). Am C-Terminus von TM konnte schließlich das ER Retentionssignal mit dem konservierten Dilysin-Motiv an Position K<sup>982</sup>RK<sup>984</sup> nachgewiesen werden. Dieses ist für die Knospung vom ER von zentraler Bedeutung. Abbildung 31 zeigt den Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der FV-Env-Proteine mit ihren charakteristischen Motiven.

	<i>Schnittstelle LP/SU</i>		<i>Schnittstelle SU/TM</i>	
<b>BFV</b>	123	RLRR / AIHL 130	569	RTRR / SINN 576
<b>EFV</b>	122	RLRR / AVHL 129	560	RRKR / GDNF 567
<b>PFV</b>	123	RIAR / SLRM 130	568	RKRR / SVDN 575
<b>SFVcpz</b>	123	RIAR / SLRM 130	568	RKRR / STDN 575
<b>SFVora</b>	123	RLAR / SIRT 130	568	RNRR / SLDN 575
<b>SFVmac</b>	123	RLAR / SIRV 130	570	RKRR / SVNN 577
<b>SFVagm</b>	123	RLTR / SLKV 130	564	RRKR / STNI 571
<b>SFVspm</b>	126	<b>RSPR</b> / DLVR 133	568	<b>RQRR</b> / DVDN 575

## ERGEBNISSE

FFV 124 RRRR / DIQY 131 559 RQRR / SVST 566

**Abb. 30:** Vergleich der Schnittstellen innerhalb foamyviraler Glykoproteine.

<b>LP-Gag-Interaktionsmotiv</b>		
BFV	--MAPPMTLQQWLQWRYNLETTNLLQMNPKMESVCLPDFDPPGDEEV-----SLRIRCKY	53
EFV	--MTPPMTLPEWMQWRYYRQNVNKIREAIPDVQ-IDLPVYNPDMTKPL-----PLCLRIKY	52
PFV	--MAPPMTLQQWIIWKKMNKAHEALQNTT'TVTEQQKEQIILDIQNEE--VQPTRRDKFRY	56
SFVcpz	--MAPPMTLQQWIIWNKMNKAHEALQNST'TVTDQQKEQIILEIQNEE--VRPTRKDKIRY	56
SFVora	--MAPPMTLQQWLVWDRMQKANEALKSTTAVSEEEKEHLILEIQNEE--IIPTKVDRVKY	56
SFVmac	--MAPPMTLEQWLLWKKMSQAHALENVTTLTEEQKQQVIIDIQHED--VVPTRMDKLY	56
SFVagm	--MAPPMNLQQWLLWKKMNETHLALENISLTEEQKQQVIEIQQEE--VIPTRMDRVKY	56
SFVspm	--MAPPLTQEWMLWKKRNLETWTNNSALTSEAKQMLLDEAEDINNKGKPTLKHRSY	58
FFV	MEQEHVMTLKEWMEWNAHKQLQKLQSTHPELHVDIPEDIPLVPEKVP-----LKMRMRY	54
	.: * : * : : . . : . : *	
<b>Hydrophobe membranedurchspannende Region mit <u>Signalsequenz vom LP</u></b>		
BFV	WIYLCCATSTRIMAWIVFILTVLSILLISVLIIVFRLQWKGAIESPGPILVWN-NSNSIN	112
EFV	WMYLLCATSPRVMAWLLFVCLVLSVMIIAVIVTVFRMQWKAIDVPGPVLFWN-HTDVLV	111
PFV	LLYTCCATSSRVLAWMFLVCILLIIVLVSCFVTISRIQWNKDIQVLGPVIDWN-VTQRAV	115
SFVcpz	LLYTCCATSSRVLAWMLLVCVLLIVLVVSCFLTISRIQWNRDIQVLGPVIDWN-VTQRAV	115
SFVora	LLYTCCAT'TRRTLAWLFLFCVLLIVVLVTCFITIARIQWNQDIQVYGPVIDWN-ISHQAI	115
SFVmac	LAYSCCATSTRVLCWIVLVCVLLLVVVISCFVTMSRIQWNKDIIVFGPVIDWN-VSQQAV	115
SFVagm	LAYACCATSTRVMCWLFLICVLLIIVFVSCFVTVARIQWNRDINVFGPVIDWN-VTHQAT	115
SFVspm	<b>LCYLACAT'TRIVGWIVFVCLLIIVICITCFVTMARMQWKQAIITHGAVIDWNQ'TTHKII</b>	118
FFV	RCYTLCCATSTRIMFWILFLLCFSIVTLSTIISILRYQWKEAITHPGPVLWSQ-VTNSHV	113
	* **:. * : * : . : : : : * ** : * * : : * : .	
<b><u>Schnittstelle LP/SU</u></b>		
BFV	AQPTTTPHYSRLRRAIHLAQKPVQVNF'TSIPQGLFLEPHPKPIISKERVLGLSQVVMVDS	172
EFV	HVPPVGPVHTRLRRAVHLADRAVNINITHIPQGVFLEPFKPIIDKERVGLISQIVMIDS	171
PFV	YQPLQ'TRRIARSLRMQHPVPKYIEVNMTSIPQGVVYEPHPEPIVVKERVGLSQILMINS	175
SFVcpz	YQPLQ'TRRIARSLRMQHPVPKYIEVNMTSIPQGVVYEPHPEPIVVTERVGLSQVLMINS	175
SFVora	YKPLLMLKRLARSIRTHYPKPNVEVNMTSIPQGVVYEPHPEPIIVKERVGLSQVIMINS	175
SFVmac	IQQIRAKRLARSIRVEHATETVYEVNMTSIPQGVLYVPHPEPIILKERVLGLSQVMMINS	175
SFVagm	YQQLKAARL'TRSLKVEHPHISYISINMSSIPQGVMYTPHPEPIILKERVGLISQVLMINS	175
SFVspm	PVALRSK <b>RSPR</b> DL-VRIVEEKWIEINATGIPQGVYLT'PHPKPIIVKERVLGLSQIVLINS	177
FFV	TMGGNTSSSSRRRRDIQYHKL'PVEVNISGIPQGLFFAPQPKPIFHKERTLGLSQVILIDS	173
	. * : : * : * * * : * * * * . * * * * : : : *	
BFV	STLTQKLNLEGEAKSLLIKTINEELISLQDVVLNFDLPLGDPHTQEEYIAKRCYQHFHGC	232
EFV	GSIAQSMNLDLYMKHLLVDMINEEMVALSNVVL'PFELPVGDPSTQDQYIHKRCYQQFAHC	231
PFV	ENIANNANLTQEVKLLTEMVNEEMQSLSDVMIDFEIPLGDP'RDQEQYIHKRCYQEFANC	235
SFVcpz	ENIANNANLTQEVKLLAEV'VNEEMQSLSDVMIDFEIPLGDP'RDQEQYIHKRCYQEFANC	235
SFVora	ETVANSANLTQEA'KVLLADMVNEELQGLADMIDFEIPLGDP'RDQEQYIHKRCYQEFANC	235
SFVmac	ENIANTANLTQET'KVLLADMINEEMNDLANQMIDFEIPLGDP'RDQEQYIHKRCYQEFANC	235
SFVagm	ENIANVANLSQET'KVLLTDMINEELQDLSNQMIDFELPLGDP'RDQEQYIHKRCYQEFANC	235
SFVspm	ESIASSMEIKQE'HKSLTKIINEEMKSLRDVMLDFELPLDDPKTQKEYIQRCYQEFKDC	237

## ERGEBNISSE

FFV	DTITQGH--IKQQKAYLVSTINEEMEQLQKTVLPDFLPIKDPLTQKEYIEKRCFQKYGHC	231
	.:.. * * . :****: * . :: *::: ** *.:* :*:*. : *	
BFV	YVVHIPGG-KEWPTREIIQDQCPLNNSWLTALHYDYLPWDYYNQPPRQLSLKDFR-KY	290
EFV	YIVWQPGR-RVWPTSEIIQDQCPLPDHPYRPLGYMQONAYDLYLQPPRYGLQNVNLTSLY	290
PFV	YLVKYKEP-KPWPKEGLIADQCPLPGYHA-GLTYNRQSIWDYYIKVESIRPANWTTKSKY	293
SFVcpz	YLVKYKTP-KSWPTEGLIADQCPLPGYHA-GLSYKQSIWDYYIKVEITRANWSSQAVY	293
SFVora	YLVKYKDP-KGWPSEKLIVDQCPIPGVHI-PSIYKYQAIWDYYIPFQMMRPENWKAEDVY	293
SFVmac	YLVKYKTT-KGWPSSTVIADQCPLPGNHP-TVQYAHQNIWDYYVPFEQIRPEGWNSKSY	293
SFVagm	YLVKYKPP-SPWISEGIIVDQCPLPRIHD-PNYYKYQPIWDYYLKIQNIRPQGWTSSKSY	293
SFVspm	YLVKYNTPNKPWPTDYVLQDMCPLP-----GGEYPPQNAWNYLKIQNIRPKDWTSGKYY	292
FFV	YVIAFNGN-KVWPSQDLIQDQCPLPPRFGNLKYRNHTIWKYYIPLPFKVVSSNWTRVESY	290
	*.: * . : : * ** : * : . *	
BFV	NISNNGSRYEAYRLPLQDKIGAVAFCSPTLYSSWNYTQSSREREELFRRKLETFLNP--	348
EFV	GIARIG----AYRVLYPEQYNATIFCSDQLYGNWYLNRTSEQKEETYRKKMLNLTEN--	344
PFV	GQARLGS-FYIPSSLRQINVSHVLFCSQDLYSKWYNIENITIEQNERFLLNKLNLTS---	349
SFVcpz	GQARLGS-FYVPKGIRQNNYSHVLFCSQDLYSKWYNIENSIEQNEKFLNKLNDLTT---	349
SFVora	GQARIES-YYVPKIFQNNNISHVLFCSDRLYNKWYTTENTLLQNEELLIKLTNLTK---	349
SFVmac	EDARIGG-FYIPKWLRRNSYTHVLFCSQDIYGKWNIDLTAQERENLLVRKLINLAKG--	350
SFVagm	GTARMGS-FYIPTFLRNNTVSHVLFCSQDLYGKWYNIENNIQENEQLLTKLYNLT----	348
SFVspm	GSARMGG-FWVPPKQKQNFTHVLFCSNKLYGKWNSTNTVELNENLLLKRLTNLFMNNE	351
FFV	GNIRIGS-FKVPDEFQRN-ATHGIFCSDALYSNWYPRDLPSVQQSFAQAYITKVLMKRK	348
	. *** :*. *: . : : ..	
BFV	QTGCLNPEALPGTWHTLKGGEWFRDLTTYDFCKKPEAVFGLNKTYYSWSLWEGDCGRQGN	408
EFV	NSSILKDRALPPTWTPKQARLFRELNPLDFCTKPEAVMLLNQSYTWSLWEGDCYVYSR	404
PFV	GTSVLKKRALPKDWSSQGKNALFREINVLIDICSKPESVILLNNTSYYSFSLWEGDCNFTKD	409
SFVcpz	GSSLLKKRALPKEWSSQGKNALFKEINVLVCSKPELVILLNNTSYYSFSLWEGDCNFTKN	409
SFVora	KDAQLKERALPPSWSTEGKSLLFREANTLDICNIPEAILLLNTTYNFSLWEGDCGYDYGK	409
SFVmac	NSSQLKDRAMPAEWDKQKADLFRQINTLDVLCNRPEMVFLNNSYEFSLWEGDCGFTRQ	410
SFVagm	TYSKLLKARALPKEWNNQGNARLFRSFNPLDVCNRPEAVLLLNTTYFTYSLWEGDCNYT-T	407
SFVspm	SSSQLKNRAMPREWHSSGQNALFRNITRIDYCMLEAVILLNTTKTDYSLWEGDCNIYTN	411
FFV	KQPTLRDIAFPKELSPVSGMLFRPINPYDICNMRAVLLLNTTYTFSLWEGDCGYQYQH	408
	* . *: * * . *: . * * * . : : * : : *****	
BFV	DTQDYPPECRNYEKD---GVHVGCRYWRTYSQTAHTPDNLSCYLSEDYCLFQPKWDSA	465
EFV	N-ISFPPECINYTRIAN-KTAHPYACRHWRLSTNNEGKDEIKC--SEYGLFYPKYDQF	460
PFV	MISQLVPECDGFYNNKWMHMPYACRFWRSKNEKEETKCRDG---ETKRCLYYPWLDSP	466
SFVcpz	MISQLVPECEGFYNNKWMHMPYACRFWRSKNEKEETKCRPG---EKEKCLYYPYQDSL	466
SFVora	NITNMLTSCKDFYTQAS-KSKHPYACRFWRKYKTEKEETKCYDNK--DKTRCLYFPKWDTA	466
SFVmac	NVTQANSLCKDFYNNKWKQLHPYSCRFWRYKQEKEETKCSNG---EKKKCLYYPQWDTP	467
SFVagm	ALIQLNTECR---QPDRLKLPYACRFWRKYKQEEVKCLGN---EKKKCLYSEYSSP	461
SFVspm	NVTKHP-ACANFDYKDR-PKLHPYTCRHWRLK-EQEQTCLGE---QTNKCIYYPAYSSP	465
FFV	NLTLHP-ACKNFRTR---QDHPYACRFWRNKYDSESVQCYNN-----DMCYRPLYDGT	459

ERGEBNISSE

\* \* \* \* \* \* : . .

BFV	EIRSDLGYLAYLGAFPSPICIEARNLTDQDYKVTSIYAEVCVKQKQYDIIDVTRQLTSKL	525
EFV	ELANDFGFLAYQKMFSPICIQNYSLSTEPYKVQSLYQECIQKGTSYDLEDVINQLLRVL	520
PFV	ESTYDFGYLAYQKNFSPICIEQQKIRDQDYEVVSYLYQERKIASKAYGIDTVLFLSLKNFL	526
SFVcpz	ESTYDFGFLAYQKNFPAPICIEQQEIRDKDYEVVSYLYQECKLASKVHGIDTVLFLSLKNFL	526
SFVora	EELYDFGFLAYLGHFSPICIKEHKIKEVKYSVVSLYQECINKASTYGIGNVVEGIKELL	526
SFVmac	EALYDFGFLAYLNSFPSPICIKNQTIREPEYKISSLYLECMNASDRHGIDSALLALKTF	527
SFVagm	EAQDFDFGLSYLNAFPGLKYIENQTVREPEYEVVSYLYMECMNSAEKYGIDSVLFALKTF	521
SFVspm	EYLWDFGWLAYNGNFPSPVCEQQEKIREPKYELYSYLYGECMRATEQLSLEQVLLGLHGFI	525
FFV	ENTEDGWLAYTDSFPSPICIEEKRIWKKNYTLSSVLAECVNQAMEYGIDEVLSKLDLIF	519

\* \* \* : \* \* : : \* : \* : \* : . : . : :

Schnittstelle SU/TM

BFV	TRRGVFLGDLPADRAFSLTDFSLPASYQNKTDGRRKVCSSKRTRRS----	INNWRRLQ	581
EFV	QNNGIDLKGPASRAFTPFYN-QMPVSYK-KRDVTKRKSCG-RRKRG-----	DNFRKLQ	571
PFV	NYTGTPVNEMPANARAFVGLIDPKFPPSYPNVTREHYTSCNNRK-RRSV----	DNNYAKLR	581
SFVcpz	NHTGRPVNEMPANARAFVGLVDPKFPSPYPNVTREHYTSCNNRK-RRST----	DNNYAKLK	581
SFVora	NSTGTPVNEMPANARAFVGLVNPDPFPLYKNKTSQERESCFNRRNRSL----	DNNYVKLR	582
SFVmac	NFTGQSVNEMPLARAFVGLTDPKFPPTYPNITRES-SGCNNNRKRRS----	VNNYERLR	582
SFVagm	NFTGTPVNEMSTARAFVGLTDPKFPPTYPNITKEQ-KRCNNLKRKRRS----	TN-IEKLR	575
SFVspm	RFQHDPIITQMPKERAFIGLDSPKWPPIYPNVTGETRASCPSK <b>RQRDV</b> ----	<b>DNNWNKLO</b>	581
FFV	GN----LTHQSADEAFIPVNNFTWP-RYEKQNKQKTSKERKKGRRQRSVSTENLRIQ		574

: . . . \* \* . . \* \* : : : : :

Hydrophobes Fusionspeptid

BFV	ITGQSMNQAITTLTKLSDLNENLAAGIHLLQDHIVTLMEATLHDVSLLGHMSTIQHLHT	641
EFV	TSGLSMNQAISTLAKISDLNENLAAGIHLLQEHIVTLMEATVHDISMLEAAHGLQILHT	631
PFV	SMGYALTGAVQTLISQISDINDENLQQGIYLLRDHVITLMEATLHDISVMEGMFAVQHLHT	641
SFVcpz	SMGYALTGAVQTLISQISDINDENLQQGIYLLRDHVITLMEATLHDISVMEGMFAVQHLHT	641
SFVora	SMGYSLTGAVQTLISKISDINDENLQQGLYLLRDHLVTLMEATLHDISLMEGLAVQHLHT	642
SFVmac	SMGYALTGAVQTLISQISDINDERLQHGIVLLRDHVITLMEALHDVSIIMEGLAIQHVHT	642
SFVagm	SMGYSLTGAVQTLISQISDINDERLQQGVSLRDHVITLMEALHDITIMEGLAIQHVHT	635
SFVspm	<b>KAGYAITN</b> SVKQIAQISDLNDESIVSGLYLLRDHVITLMEATLHDVSALEDSIAIQHFHT	641
FFV	EAGLGLANAITTVAKISDLNDQKLAKGVHLLRDHVITLMEANLDDIVSLGEGIQIEHIHN	634

\* . : : : : \* \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* .

BFV	HLATFKNLLIGNRVDWSVLENKWIQEELKYTDEVMNVIRRTARSITYDVQNVKNTSDSTM	701
EFV	HLSTLRLLLTENRVDWNLIDSTWIQQQLQADEALMNVIRRTARSMTYRVIQQINRPDML	691
PFV	HLNHLKTMLLERRIDWTYMSSTWLQQQLQKSDDEMVKIKRIARSLVYVYVQTHSSPTATA	701
SFVcpz	HLNHLKTMLLERRIDWTYMSSTWLQQQLQKSDDEMVKIKRIAKSLVYVYVQTYNSPTATA	701
SFVora	HLNHFKTMLLERRIDWTFINSDWLQQQLQQPTDHMKIIRRTARSLVYVYVEQTSNSPTATS	702
SFVmac	HLNHLKTMLLMRKIDWTFIRSDWIQQQLQKTDDEMKLIRRTARSLVYVYVTQTSNSPTATS	702
SFVagm	HLNHLKTILLMRKIDWTFIKSNWIKEQLQKTEDEMKIIRRTAKSLVYVYVTQTSNSPTATS	695
SFVspm	HLMQLKLLLMENRVDWSYIDTQWIKTQLQLNDEDMKVLRRRTARALVYNIDHIEDTKTSTI	701
FFV	HLTSLKLLLTLENRIDWRFINSDWIQEELGVSDNIMKVIKRTARCIYPYVNVKQTRNLNSTA	694

ERGEBNISSE

\*\* :: : .:\*\*\* : \*:: :\* \*::: : \* : : . \*

BFV	WEIYIYYELILPERIWIRNWQVANLGHLLTHNSGYLTHVTIHHPYEIVNQDCEELTFLHLV	761
EFV	WELGIYYELIIPKKVWLTNWKIQNIGHLLKNAGHLARVELQHPYEIVNQDCEQLTYLELK	751
PFV	WEIGLYYELVIPKHIYLNWVNVNIGHLVKSAGQLTHVTIAHPYEIINKECVETIYLHLE	761
SFVcpz	WEIGLYYELTIPKHVYLNWVNVNIGHLVQSAGQLTHVTIAHPYEIINKECTETKYLHLK	761
SFVora	WEVGIYYEIIIPKHIYLNWQIKNIGHLLIHSAGQLTHVTIDHPYEILNRECEETKYLHLE	762
SFVmac	WEIGIYYEIVIPKHIYLNWQVINVGHLLESAGHLTHVKVKHPYEIINKECSDTQYLHLE	762
SFVagm	WEIGIYYEITIPKHIYLNWQVINIGHLVESAGHLTLIRVKHPYEVINKECTYEQYLHLE	755
SFVspm	WEIAMYYEIIIVPSVIYSTNWNVQNVGHLIASAGSLTLVKVKHPYEIINQECGIIKYLHIE	761
FFV	WEIYLYYEIIPTTIYTQWNWIKNLGHLVRNAGYLSKVWIQQPFVNLNQECPGNTIYLHME	754
	**:: :***: :* :: **:: *::** .:* *:: : : :***:***: * :* .:	
BFV	DCHEQDYLICEEVMEVEPCGNLTG-SDCPVLAENIQAPYVYLHPLKNGSYLLMASHTDCS	820
EFV	GCQELDYLVCCEEILQHEPCGNQGTG-SDCPVTAQKIKDPYVWIYPLKNGSYLIMSHTDCA	810
PFV	DCTRQDYVICDVVKIVQPCGNSSDTSDCPVWAEAVKEPFVQVNPLKNGSYLVLASSTDCQ	821
SFVcpz	DCRRQDYVICDVVEIVQPCGNSTDTSDCPVWAEAVKEPFVQVNPLKNGSYLVLASSTDCQ	821
SFVora	QCIKQDYVICDIVERVQPCGNNTTGTDDCAVAKAIKSPYTEILPLKNGSYLVLSSTDCSN	822
SFVmac	ECIREDYVICDIVQIVQPCGNATELSDCPVTALKVKTPYIQVSPKNGSYLVLSSTKDCS	822
SFVagm	DCISQDYVICDTVQIVSPCGNSTTTSDCPVTAEKVKEPYVQVSALKNGSYLVLTSTDCS	815
SFVspm	NCQETDYVICDTIEEVQPCGNQGTG-SDCPVLAEPVPDGFHVIESLKNGSYIYMSHYQDCS	820
FFV	ECVDQDYIICEEVMELPPCGNGTG-SDCPVLTCKPLTDEYLEIEPLKNGSYLVLSSTDCG	813
	* **::*: : **** : :*. * : : : : .*****: : : *	
BFV	LPPYEPVVTVNDSLECYGKPLKRPLTS--HTEIKLFAPQIPQLRVRLPHLVGIIAKLKS	878
EFV	IPPYEPVLVTVNDTVRCFGTTLKPLRT--SLETFTFQPHIPQLQVRLPHLVGLIAKIKG	868
PFV	IPPYVPSIVTVNETTSCFGLDFKRPLVA---EERLSFEPRLPNLQLRRLPHLVGIIAKIKG	878
SFVcpz	IPPYVPSIVTVNETTSCYGLNFKKPLVA---EERLGFEPRLPNLQLRRLPHLVGIIAKIKG	878
SFVora	ILPYIPSIVTVNETVECFGLVFKKPLTA---ERKTDYTPHIPPLRLRLLPHLLGIIAKLKN	879
SFVmac	IPAYVPSVTVNETVKCFGVEFHKPLYA---ETKTSYEPQVPHLKLRLPHLTGIIASLQS	879
SFVagm	IPAYVPSIVTVNETVKCFGVEFHKPLYS---ESKVSFEPQVPHLKLRLPHLVGIIANLQN	872
SFVspm	LTPYIPQVVTVNATIKCLGRNLKPPLSQTEAETNLVLTQVPRLKIQLPHLVGVITKLG	880
FFV	IPAYVPVITVNDTISCFDKEFKRPLKQ--ELKVTKYAPSVQLELRVRLTSLIAKIKG	871
	: .* * :***: * . : : ** * : * * .:***: .:***: .:	
BFV	LKIKVTSTWESIKDQIHRSEQELLRLDLHEGDYSDWILQLGNALEDVWPVAASAVSTIGT	938
EFV	LKIEITSTWENIKDQIKRSEAELLRLDLHEGDYAEWTKQLGKALEDIWPAAAQTVSKIGD	928
PFV	IKIEVTSSGESIKEQIERAKAELLRLDIHEGDTPAWIQQLAATAKDVWPAAASALQGIGN	938
SFVcpz	LKIEVTSSGESIKDQIERAKAELLRLDIHEGDTPAWIQQLAATAKDVWPAAASALQGIGN	938
SFVora	IKIEVTSTQENIKDQIERAKAELLRLDIHEGDSPAWIKQLAAATEDVWPTLATGLKSIGN	939
SFVmac	LEIEVTSTQENIKDQIERAKAQLRLRLDIHEGDFPDWLKQVASATRQVWPAAASFIQGVGN	939
SFVagm	LEIEVTSTQESIKDQIERAKSLLRLRLDIHEGDFPAWIQQLASATRQVWPAAARALQGIGN	932
SFVspm	IQVKITSTWETIKDQIDRAQAELLRLDLHEGDSANWLKQLSKATEDIWPAAAATFGKVG	940
FFV	IQIEITSSWETIKEQVARAKAELLRLDLHEGDYPEWLQLLGEATKDVWPTISNWFVSGIGN	931

.....: \* .\*\*\*: \* : : \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* . \* : . \* .\*\*\*: : . : \*

	<b>Membrandurchspannende Domäne des TM</b>	<b>Dilysin Motiv</b>	
BFV	LLEKAAGTLFGNVFSILAYAKPVIIGIILIIILLVIRILRWLAVE--RRRKQE----		990
EFV	FLGKIADGIFGTTFSLLTYAKPVIIGIVVIVLLIILIRILSWLAALGPRRRRREDKGE		986
PFV	FLSGTAQGI FGTA FSLLGYLKPILIGVGVILLVILIFKIVSWIPTK---KKNQ-----		988
SFVcpz	FLSGAAHGIFGTA FSLLGYLKPILIGVGVILLIILIFKIVSWIPTK---KKSQ-----		988
SFVora	FLSDAAQGI FGTA FGILGYVVKPILIGVGIILLIVVIFKII SWIPIK---RKSQ-----		989
SFVmac	FLSNTAQGI FGSAV SLLFYAKPILIGIGVILLIALLFKIISWLP GK---PKKN-----		989
SFVagm	VLSNTAQGI FGTTVSILSYAKPILIGIGVILLIAFLFKIVSWLP GK---KARN-----		982
SFVspm	FLSGTFGGLFGT----LGYIKPIIVGIVILLIIVIVCKILSWLP SK---RKTQ-----		986
FFV	FIKDTAGGIFGTA FSFLGYVVKPVLLGFVIFCIILIIKIIGWLQNT---RKKDQ----		982

Abb. 31: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von FV-Env mit Motiven (in aa).

### 3.2.6 Charakterisierung der akzessorischen Proteine Tas und Bet

Die akzessorischen Proteine Tas und Bet lassen sich auch bei SFVspm voraussagen, da zwei zusätzliche offene Leseraster im Genom existieren. Das offene Leseraster des *tas*-Gens erstreckt sich über den Genomabschnitt von Nukleotid 9487 bis 10461, somit besitzt das Tas-Protein eine Länge von 314 Aminosäuren. Von PFV ist bekannt, dass ein Motiv mit der Sequenz KRPRRR ein nukleäres Lokalisationssignal darstellt und die N-terminale DNA-bindende Domäne von der C-terminalen Aktivierungsdomäne des Transaktivators abtrennt. Ein ähnliches Motiv findet sich bei SFVspm im Bereich der Aminosäuren 243 bis 247 mit der Sequenz KRRQR (Abb. 32). Das Zentrum der Aktivierungsdomäne befindet sich wahrscheinlich zwischen Aminosäure 260 und 312 (Abb. 33).

SFVmac	216	PPTRKRRSKE	226
SFVagm	214	ADRPKRSRWG	224
PFV	214	KPRQKRPRRR	224
SFVcpz	214	KPRPKRSRKR	224
SFVspm	239	TEPPKRRQRG	249

\*\*

Abb. 32: Vergleich der nukleären Lokalisationssignale in Tas.

```

SFVmac  244  STSNGDPMALLSGPCGPHSIQPPSCLLQELPKPEVGSPEMAVAMSGGPFWEVYGDSIFA 293
SFVagm  242  NTSSGDAMALMPGPGPFNMDPPGCLLERVPGSEPGTSEMALAMSGGPFWEQVYRDSISG 291
PFV      240  CASSSDTMANEPGSLCTNPLWNPGLLSGLLEESSNLPNLEVHMSSGGPFWEVYGDSILG 289
SFVcpz  240  CASSGDTVANESGPLCTNTFWTPGPVLQGLLGESSNLPDLEVHMSSGGPFWEVYGDSILG 289
SFVora  221  HPSSGIPLAPGPRQCSTNTSNPPESLLRLLPGNDAISPALAISSGGQIWEEVYNDLLLD 270
SFVspm  260  TFDSGPLEQLVLTHTCAYTTEWPEPKRIHLGDLETVCPALPDPGEGG-----TNSEME 312
    
```

**Abb. 33:** Vergleich der Zentren der Aktivierungsdomäne in Tas.

Das Bet-Protein wird aus einer mehrfach gespleißten mRNA translatiert. Es besteht zum einen aus Aminosäuren des *tas*-Gens, zum anderen aus Aminosäuren des *bel-2*-ORF. Durch computergestützte Analysen konnten der Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor innerhalb des *tas*-ORF an die Nukleotid-Positionen 9792 und 10287 vorausgesagt werden. Das Bet-Protein hat somit eine berechnete Länge von 375 Aminosäuren. Da nur sehr wenige Homologien zwischen den einzelnen Bet-Proteinen der FV bestehen, konnten keine funktionellen Domänen nachgewiesen werden.

### 3.3 Komplette Nukleinsäure-Sequenz des SFVspm

	5'LTR	U3	R	U5	PBS
1	TGTTATGGGAAAAATCAGCACAAAGAACTATCCCTTATTATGATCCATCTCTCCCTATGGATCTCCTTTGATGAAGCCCTAGCAAAAAGGATGAAAGGTATCTG				
101	GACAGGTCAGTGCACAGAGTTACAAAATGTATGACTCCACAGGATTCAGTGGTGGCTAATAGGGCCCTACCTAAAGGATATCAATTAAGTGCACACCT				
201	AGAGGTATAAAAATCAGTGTAGGATCTAAAGTTTCATCCACTAGATGTACTGAAAGAAATTTCTGTACCCCTCAAGCACATGAAATGGGATCCTGATA				
301	ATGAAAAGGTAAGTACTGACTCAGAAATCAGAGGATAGATGACTCAAACTGAAACTTATAAACCACAGGTACTACTATTTACAGTAGCTGTGGGTAGCTCAAT				
401	TGAAAAGTGAGCCTGTCACTTTCCGCTGAGGCCAGCAGTTGTTAGTTCAAAAGGAGCTAGCCGTCTGTAGGAGTGAACCCCAATGAACTTAAACCTT				
501	ATGCTTGTCTTACGCAATATGTTTTGCTATAGGTAAGTAAAGTGTATGAAAATTAATAGTCTCCAAAGTAGTGAATCTGTAAGCAGGAGAGCAC				
601	CATGTTGAA9CATTTTGACTCATGTTTGGTTCGAAATCCCGTCATAACTGTACTGACTCACTCATTTACAGTTTAAAGTGGTTTCAAAACCAACTTTTCATCTGG				
701	GTTGGTGAGGTGGCAAAATCGTCTAAGGGACTATCTgATGTGATGTGGCGCTGGACCAGTCTAGGGAGACGCTAGCTGAAATATATGTTCCGAATCCTCATAA				
801	TCACTGCGGAGCCCTCCGTTTCCAAAACAGTTAAATGAAATTTGAAATAATCAAAATGAAGAAATAAAAATCAAGGAAAATAGTAAATACCTTTTGA				
901	<b>CTATA</b> AAAAGATGACTCTAAATIGTACGAGAGCTTCCCTCCACCCATCTAGTGCCTTAGAGTGAGACGGAACTCTCCAGGCTTGGTAGAAATTTAT				
1001	ATATATATTTGTGGATTTGATTAATGTAATTTGCTCTGCTTAATAATTAATTAATTTGTCATGATCTTgCTATA <b>ATAA</b> CCGCTTGTATTCGAGAACTCTTAT				
1101	TTAAATATTTGTTGATGTTTCTATACTACTTAATAGTAAACAAGACCCCTAACTGAGAGAAAGCCAGGTTAGAGCACCCCTGTGGTGGATTTCTTAGGAAT				
1201	GCTACTAAAAGTGTCTTAACCCCAAGTTCCCTTTGGGTCTTCCACAACA <b>ATGGCGCCCAACCTGGGGCTCGA</b> TATAAGCGGATTA AAAACATTTGGA				
1301	GCTTAATTTTACCCCTAGGGAACCTTCTGTACTGCGGAAGTAAATGGCTCAAGGGAAATCAACCTGAACATATTGATATTTGGTCAATTTAACTAATCTCTTACGA				
Gag	M A Q G N Q P E H I D I G H L T I L L R				
	<b>CTRS</b>				
1401	GAAAAATGGCTTACCACCAATCCTCCTCATGGGACAGATATGCTGTCCGAAATGACTGAAGGATGGTGGGGGATTATGCAAGATTTACTGTGATTAGAG				
Gag	E N G L P T N P P H G T E Y A V R M T E G W G D Y A R F T V I R V				
	<b>Arginin</b>				
1501	TGGCTTTTCAAGATAATCAAGGAAATCCTTTACCCTCGACCAGAATGGGAATATAATTAATAGATGTTAGGCCATTAAATGATTCAAATTAAGGTTGTAC				
Gag	A F Q D N Q G N P L P R P E W E Y I N R D V R P L N D S I I G C I				
	<b>YXXL Motiv I</b>				
1601	TTTTAGACAAGCTCAACAAGCTTTTAAATAATATAGALTTAGCAAGAACTCCATCCAGATATGGCCCTTTATCTAATGGTCTCTTTTAAATAACAGATCCG				
Gag	F R Q A Q Q A F N N I D L A R T P S R Y G P L S N G L F L I T D P				
	<b>Coil-coiled Motiv</b>				
1701	GAAATGGTTAACATTCCTTTATCTGCAGTTGAGATAGCAGATTTAGATGATCAGGAAAATAAGGACATTTTTGGCCCATGCCACTATAGTTTTAGACA				
Gag	E W L T F N P L S A V E I A D L D D Q E I R D F L A H A T I V L D N				
	<b>Coil-coiled Motiv</b>				
1801	ATGTGATGGCTGATGTAGTTATACAAAGAGAAAATGAAAGACTTAAACCaaAAACAAAATTTAAGACTTAGAAAATGCCCTTGGCTAGTTCAGGTACTTATCA				
Gag	V M A D V V I Q Q R E I E D L T K T N L R L R N A L A S S G T Y Q				
1901	GCCTATAGGAATGCCCTATAGCTCAGTCTTCTCCAGCAGGCCCTCTGCGTCAGTAGCAGGACCCCATATGCCGCTATGCCATCAGTACCTTATATTTCT				
Gag	P I G M P I A Q S S P A G P S A S V A G P H M P A M P S V P Y I S				



**PSAP Motiv I**

2001 GCTATAACCTTCGGCTCCAGCACCAATTCAGTTGCTCCTGCTGCAGCTCCTCCTTTGGGACCTTTTGCCATCGGCTCCAGCTCCACCTGTTCTGCCTG  
 Gag A I P S A P P A P I P V A A P A A P P L G P L P S A P A P P A P V L P V

**PSAP Motiv II**

2101 TTATACAGCCAAAATACATTTGGAACTGATGGCAATGGATATACTGCAGTAGGACCTGTGCCAGTTTTTACCATTGCTCAAAATAAAAGCTGTAATAGGGGA  
 Gag I Q P N T F G T D G N G Y T A V G P V P L P I A Q I K A V I G E

**SA<sup>pol</sup>**

2201 AGCCCCCTACTGATGACAAAATCCCCCTTGTGGGTAGCTAAACAATGCTGCAGCTATTGAAGGTACTTTCCCTACAGGCTCAGCCCGGATGTGAGGTGTAGA  
 Gag A P T D A R Q I P L W V A K H A A A I E G T F P T G S A D V R C R

2301 GTTTTAAATGCCCTATTAAACCAGTTCATGGGGTATGACCTTGTCTCCAAAATGAATCGGCACATGGTCCCTAGCTGCAGCTGCTCTTTTATCAAAGAATAT  
 Gag V L N A L L T S H G G M T L S P N E C G T W S L A A A L Y Q R I Y

2401 ATGGGGTCATACCATTACATGACTTACCACATACTATGGCGGAAGTGGCTAGAAGAGAAGGTATTTTAGTCGGCTTCAATAATGGGTATGACCTTTACTAA  
 Gag G V I P L H D L P H T M A E V A R R E G I L V A F N M G M T F T N

2501 TAAATTCCTTTGATGTAGTGTGGGGATCATAAGACCTCTTTTGCCTGGACAAGCCTCAGTGGCTATGCTTCAAGGTTATTTAGATCAGTACCAGGGCCAA  
 Gag N S F D V V W G I I R P L L P G Q A S V A M L Q G Y L D Q Y Q G Q

2601 CAACAAAAGCACAAGCTTTTCCGACGTTGTACGACGAACCTTTTAAACTTTAGGTCTAAATTTTAGGACAAAAGTATTAGATCTAATCAACCAGCAA  
 Gag Q K A Q A F P T L L R R T F E T L G L N Y L G Q S I R S N Q P A R

**GR-Box I**

2701 GAACTCTGTGTTGTCAGGTAGTATAACCCCAAGGACGAGGAAGGTCAAACCGAGATCTAGACCCCAAGGATAGAGCCTCTAATAAGGCTAATAAACCC  
 Gag T S G S V A G S I T Q G R G Q P R S R P P N R A S N R S N N P

2801 GCCTAGACCTCCCTCGCTCTCAAGAACAGCAACCCTCTCCAGCAGGGCGTGGTTCCCTCTAGTTTCATCAGCACCTCCTCAGAGGTCAGGTTATAAT  
 Gag P R P P P R S Q E Q Q P S P A G R G S S S S A P P Q R S G Y N

**YXXL-Motiv II**

2901 TTAAGGCAGCAAATTAATAGACCTCAAAGACTTTGGAGGGGTCCAAACCCGTTATAGAAAACCTAGAAAAATAGAAAATTTCCAAGAAGTGAACCGGTACCTT  
 Gag L R Q Q I N R P Q R L G G P N P Y R N L E N R N I P R S E T V P S

**Schnittstelle p68-p3**

3001 CCTCTCGGCGAGCTGAGACTTCAGAAAAAAAACCGGCCAAATCAAGCAAGGGCGGACAGCAAGGAAGTTCAAATCGAAAACCAACACACGCTCTATTAAACAC  
 Gag S R R A E T S E T N R P N Q A R G G Q Q G S S N R N Q T R S I N |T

**PSAP Motiv III**

3101 TGTGAGCAAGTGACTCACAAGTACATACCTTCCGCTCCGCGGCTGAAAACAAAACCCAGCTGCTACAGCTGTGACCCCAATGGCCCAACCAACATTC  
 Pol  
 Gag V R A S D S Q V I P S A P P A E T N P A A T A V T P N G P N Q H S

**Aktives Zentrum der PR**

3201 GGTAGAAAATAAAGGGACACAACCTTAAATGGCTTTTGGGATACCTGGAGCCCAAAATACATGTATACCTCAATCCTTTTGTAGATGAACAACCAATTTGGA  
 Pol V E I K G T Q L N G F W D T G A Q I T C I P Q S F L L D E Q P I G  
 Gag G R N \*

3301 ACTACGGATATTGAAACCAATTCATGGAAAAACAGAAAATAATATATTTAAAAATTTAAAGTGTGGGAAGAAAGGTGGAAAGCAGAGGTAACCTTCTT  
 Pol T T D I E T I H G K Q K L Y L K F K V L G R K V E A E V T S S

3401 CCACITTTGGCCATATATATAGCTCCAATTTGATATTTCCCTGGTATAAACCTACACCATTAGAAATTAACCTTAAAGTTACCAGTACAAGATTTAAAAAAA  
 Pol T L A Y V I L A P I D I P W Y K P T P L E L T I K L P V Q D L K N

3501 TACITTTAGTTTCTCAGGCCAACATTTGGTAAAGAGGATAAAAAATAAAGTTTAGCAAAAGTTATAGATAAAATATGATGATCTATGGCAACAATGGGATAAATCAA  
 Pol T L V S Q A N I G K E D K I K L A K L L D K Y D D L W Q Q W D N Q

3601 GTAGGAAACAGGAAAAATTACTCCTCATAATATAGCAACTGGAACTTATCCCCAAAAA CCTCAAAAA CAATATCACATAAAATCCAAAAAGCTAAAA CCTTAGTA  
 Pol V G N R K I T P H N I A T G T Y P P K P Q K Q Y H I N P K A K P S I

3701 TACAAAATAGTTATAAATGATTTGTTAAAAACAAGGGTGTAAAGACAATCTACTAGCCCTATGAATACTCCAGTTTACCAGTTTCTTAAACCAGATGGTAA  
 Pol Q I V I N D L L K Q G V L R Q S T S P M N T P V Y P V P K P D G K

3801 ATGGAGAATGGTATATAGATTTAGATTAAGCAGTAAATAAAAAACCATACCTTTTGATAGCTGCCAAAAATAACAATCTCTAGGAATTTCTACTAAATTAaTTAGA  
 Pol W R M V L D Y R A V N K T I P L I A A Q N Q H S L G I L T N L I R

3901 CATAAaTaCAAAATCAaCAATTTGTCAAAATGGT.TTTTGGGCTCATCCTATAAaCTGAGGACTCCCAATGGATAACAGCATTTCACITTTGGGAAGGTAAAC  
 Pol H K Y K S T I D L S N G F W A H P I T E D S Q W I T A F T W E G K Q

4001 AGCATGTCTGGACACGACTGCCTCAAGGATTTTAAATAGTCCAGCATTTTACAGCTGATGGTTGATATTTTGAAGGAAGTCCCAGGTGTAAGTGT  
 Pol H V W T R L P Q G F L N S P A L F T A D V V D I L K E V P G V S V

**Aktives Zentrum der RT**

4101 ATATGTGGATGATATTTACATCAGTTTCCACTACTATGGAAGAACAACCTTTCAAGTTTTAGACTCAATCTTCAGAAAAATTTAGAAAAACAGGATACATAGTG  
 Pol Y V D D I Y I S S P T M E E H F Q V L D S I F R K L L E T G Y I V

4201 TCTTTGAAAAAATCAGCTCTAGCCAGATATGAGGTTAACTTTCTCGGGTTTGTAAATTTCAGAAAAACAGCCGAGCCCTAACCTCAGAGTTTAGAGAGAGAC  
 Pol S L K K S A L A R Y E V N F L G F V I S E T G R G L T S E F R E R L

4301 TACAGGAAATTAACCCGCAACACGTTGAAAACAGCTGCAAAAGTATCTTAGGTTTCTTAAATTTTGTAGGAATTTTGTGCCCAATTTCTCAGAAATTTGGT  
 Pol Q E I T P P T T L K Q L Q S I L G F L N F A R N F V P N F S E L V

4401 CCAACCACCTTTATCAGCTGATTTCAACAGCGGTCTGGGAACTTCATACAATGGACCGCAGAACATACCTTTGAGGTTAAAATGAGTTAAATCTCAGCATTGAAT  
 Pol Q P L Y Q L I S T A S G N F I Q W T A E H T L R L N E L I S A L N

4501 CACGGGGTAAATTTAGAACAGAGACGAGGTGATTCACCACCTTGTGGTTAAAGTCAATGCATCTGATAAAAACCTGGATATATTAGATATTATAATGATAATA  
 Pol H A G N L E Q R R G D S P L V K V N A S D K T G Y I R Y Y N D N S

4601 GTTTAAATCCAATAGCTTATGCTTCACATGTTTTTAGTACTGCTGAGTTAAAAATTTACTCCATTTGGAAAAATTTGTAGTTACAAATGCACAGAGCCCTTACT  
 Pol L I P I A Y A S H V F S T A E L K F T P L E K L L V T M H R A L L

4701 TAAAGGAATAGATTTAGCALTAGGCCAaCCAATTTAAAGTATATAGTCCAATAGCTTCTATGCAAAAAATACAAAAAACACCCATACCTGAAAAAGAAAAGCT  
 Pol K G I D L A L G Q P I K V Y S P I A S M Q K L Q K T P I P E R K A

4801 CTGTTACAAGATGGTTACCTGGCTAAGTTATTTAGAAGATCCTAGGATTAACCTTTTATGATAAAAAACATTAACAGACTTAAAAACATGTGCCTGCAT  
 Pol L S T R W V T W L S Y L E D P R I T F Y Y D K T L P D L K H V P A S

4901 CTACTGATAATAATCAATTACTTTGTTACCTATTACTGAATATGAAGCAGTATTTTATATACTGATGGATCAGCAATTAAGTCTCCTAAAACTGAACAAAAC  
 Pol T D N N I I T L L P I T E Y E A V F Y T D G S A I K S P K T E Q T

5001 TCATTTCTGCAGGAATGGAAATAGTCATGGTAGTATATACACCAGAAACCTAAATATACGCAACAATGGTCCATTTCTTTAGGAGACCATACTGCTCAATAT  
 Pol H S A G M G I V M V Y T P E P N I T Q Q W S I P L G D H T A Q Y

5101 GCTGAAATATCTGCTGTTGAAATTTGCTTGTAAAGAGGCTAGCTTATTACAAGGGCCCTGTATTAATAAGTTACAGATAGTGATTATAGTAGCAAGAAGTGCTA  
 Pol A E I S A V E F A C K K A S L L Q G P V L I V T D S D Y V A R S A N

5201 ATAAAGAGTTACCCTTCTGGAGGTCAAATGGTTTTCTAAATAATAAAAAGAAGCCACTGAAAACATAATAAGTAAAATGAAAAAATATTTTCAGATTCCTTCT  
 Pol K E L P F W R S N G F L N N K K K P L K H I S K W K N I S D S L L

5301 CCTCAAGAGGAATATCACTATTGTCCATGAGCCCTGGACACCAGCCCTTCCAAAAACAAGTATTCATACCCTGGGTTAAATCTCTTGTGATAAGTTGGCAGTC  
 Pol L K R N I T I V H E P G H Q P S K T S I H T L G N S L A D K L A V

5401 CAAGGTAGTTATTTCAGTTAAATACAATAAATAAAAAATTTCCAAGCCCTGGATGCaGagCTTaaTcaAATCCTTGAAGGAAAATTTACCAAAAaGGCTATCCCTAAaC  
 Pol Q G S Y S V N | T I N K I P S L D A E L N Q I L E G N L P K G Y P K Q

5501 AaTATAAATATGTATTGAAAAaTaATGAGCTTATTGTaCaCGTCCtGaGGGAGATAAAAaTcaTCCCCCaaAGGGGATAGACTtCCGCTGGTtAAAAaC  
 Pol Y K Y V L K N N E L I V Q R P E G D K I I P P K A D R L P L V K T

**Aktives Zentrum der RNaseH**

**Aktives Zentrum der RNaseH**

**Aktives Zentrum der RNaseH**

**Schnittstelle RNaseH-IN**

**Zinkfingermotiv der IN**

5601 aGCTCaTGAAaTTGGCaCATAcAGGAAGAGAAgCTACTTTATTTGAAGTTGCAAAcAACTCACTGGTGGCTAAATATGAGAAAAAGACATTAATACTGTTTTTA  
 Pol A H E L A H T G R E A T L L K L Q T T H W W P N M R K D I I T V L

**Zinkfingermotiv der IN**

5701 AGACAAATGTAAGCCATGCCTGCAAACTGATAGTACAAAATTTAACTCCTATTCCTCCTGTTTCTCAGCCAAggCCTGTTAAAACCTTTTGAATAAGTTCTTTTTA  
 Pol R Q C K P C L Q T T D S T N L T P I P P V S Q P R P V K P F D K F F I

**Aktives Zentrum in IN**

5801 TTGACTATATTGGGCTTTGGCCACCATCTCATGGCTTCTCATATGTGTGGTCAATTTGGTCAATTTGATGCACGCACAGGCTTTTACATGGTTATACCCCACTAAAGC  
 Pol D Y I G P L P P S H G F S Y V L V I V D A R T G F T W L Y P T K A

**Aktives Zentrum der IN**

5901 TCCTTCTACCAATGCAACAAATTAATAGTCTCAATTTACTACTTTGGTACTGCAATTCCTTAAAGGTGTTGCAATTCGATCAAGGATCAGCATTCACCTCTGCA  
 Pol P S T N A T I N S L N L L G T A I P K V L H S D Q G S A F T S A

**Aktives Zentrum der IN**

6001 ACTTTTGTGAATGGCTAAAGACAGAAAGTATACAAATTTGGAATTCAGTACTCCTTACCACCCCAAAAGTAGTGAATGGTGAATAAGGAAAAACAAGGAAA  
 Pol T F A E W A K D R S I Q L E F S T P Y H P Q S S G M V E R K N K E I

6101 TAAAACGACTAAATAAACTAATTTGGTAGGAAGACCTACAAAAGTGGTATCCATTTATTCCTACGGTTCAATTTAGCCTTAAAACAACACATATAGCCCCC  
 Pol K R L I T K L L V G R P T K W Y P L L P T V Q L A L N N T Y S P R

6201 TACAAAGCTAACCCCGCATAAAATTTATTTCCGGTGTGGATGGAATGTTCCCTTTTGCAAAATCAAGATACACTTGACTCACTAGAGAAAGAACTCTCT  
 Pol T K L T P H K L L F G V D G N V P F A N Q D T L D L T R E E L S

6301 CTTTTAGCAGAACTAAGAAGTTCTTTTCTGCCCTCCGCTCCCTCCTCGTTCCCTGGCGTCCCTTCTGTTGGCCTTCTGTTCCAGGAGAGGG  
 Pol L L A E L R S S F L P S A S P P A S S R S W R P S V G L L V Q E R V

**cPPT und SA<sup>env</sup>**

6401 TAGCACGGCTTCTCAGCTAAGACCTAAATGGAAGAAACCTGTGATTTTGTGAATTTGATCAATGACAGAACTGTGGTAAATTGTGGACAAGGAGGCAA  
 Pol A R P S Q L R P K W K K P V I I C E L I N D R T V V I V D K A G N

**Gag-Interaktions-Motiv**

6501 CAAAAGAACTGTGAGTATAGACAACTTGAAATTAACCCCTCACCAGAAAAACAGTCATGGCTCCACCCCTGACATTAACAGGAATGGATGTTATGGAAACA  
 Pol K R T V S I D N L K L T P H Q K N S H G S T P D I T G M D V M E Q

Env M A P P L T L Q E W M L W N K

6601 GAAGAGGAACCTGGAAAACATGGACTAAATAATTCCTCTGCACATAACATCTGAAGCTAAAACAGATGTTATTAGATGAAGCAGAAAGATATTAATAATCTAGGT  
 Pol E E P G N M D \*

Env K R N L E T W T N N S S A L T S E A K Q M L L D E A E D I N N L G

**Signalsequenz des LP**

6701 AAACCAACTTTAAAAACATAGGTTTTTCATACCTTATGTTTATTTGGCCCTGTGCAACAACACTACTAGGATTTGGATGGATAGTCTTTTGGTTTATTAATTG  
Env K P T L K H R F S Y L C Y L A C A T T T R I V G W I V F V C L L I A

6801 CTGTTATTTGTATAAACCTGTTTTGTTACCATGGCTCGAATGCAGTGGAAAGCAAGCTATTACTCATGGTGTCTCATGTGGAATCGAACAACACA  
Env V I C I T C F V T M A R M Q W K Q A I I T H G A V I D W N Q T T H

**Schnittstelle LP-SU**

6901 TAAAAATTTCCCTGTGGCCCTTAAGAAAGTAAAGGTCACCAAGGGATTTAGTTAGAAATTTAGAGGAAAAAATGGATTGAATCAATGCCACTGGTATACCT  
Env K I I P V A L R S K R S P R | D L V R I V E E K W I E I N A T G I P

7001 CAAGGAGTATATTTAACTCCACATCCAAAACTTATATAGTTAAAGAAAAGAAATTTTAGGTCCTTTCCAAAATAGTTTTGATTAATTTGAAAGCATTTGCTT  
Env Q G V Y L T P H P K P I I V K E R I L G L S Q I V L I N S E S I A S

7101 CCAGCATGGAAATAAAAACAGGAACATAAAATCTTTATTAACATAAAATCATCAATGAAGAAAATGAAAAAGTTAAAGAGATGTGATGTTAGATTTTGAACCTTCC  
Env S M E I K Q E H K S L L T K I I N E E M K S L R D V M L D F E L P

7201 TCCTTGATCCTAAAACTCAAAAAGGAATACATTCACAAAAGATGTTTTCAGGAATTTAAGGACTGTTATCTAGTTAAATATAATACACCCAAATAAGCCA  
Env L D D P K T Q K E Y I Q Q R C F Q E F K D C Y L V K Y N T P N K P

7301 TGGCCACCCGATTTATGTTTACAAGATATGTGTCTTTGCCAGGAGGAGAAATATCCTCCTCAAAAATGCTTGGAAATTACTATCTTAAAGATACAGAATATCA  
Env W P T D Y V L Q D M C P L P G G E Y P P Q N A W N Y Y L K I Q N I R

7401 GACCTAAGGATTTGGACATCTGGTAAAATATATGGATCTGCCAGAAATGGCGGATTTTGGGTTCCACCTAAAATTAACCAAAAATTTTACGCATGTCCT  
Env P K D W T S G K Y Y G S A R M G G F W V P P K L K Q Q N F T H V L

7501 CTTTTGTAGTAATAAATTTGTA TGGAAAAATGGTATAAATTTACTAATAACGGTAGAACTAAAATGAAAACTTTTATTAATAAAGACTTACTAATCTTTTATG  
Env F C S N K L Y G K W Y N S T N T V E L N E N L L L K R L T N L F M

7601 AATAATGAATCATCTAGTCAACTAAAGAACAGAGCAATGCCCTAGAGAAATGGCATAGTTCAGGTCAAAAATGCTCTATTTCAGAAAATATTACTAGAAATTTGATT  
Env N N E S S Q L K N R A M P R E W H S S G Q N A L F R N I T R I D Y

7701 ACTGTATGTTACCTGAAGCAGTAATAATTTGTTAAATACTACTAAAAACAGATTTATTTCTTTGTTGGGAAGGTGATTGCAATAATATATACTAATAACGTTTACCAA  
Env C M L P E A V I L L N T T K T D Y S L W E G D C N I Y T N N V T K

7801 ACATCCTGCCCTGCTAAATTTTGATTTATAAAGACAGGCCCTAAGTTACATCCTTATACCTGTAGACATTTGAGGTTAAAAAGAAACAAGAAACCAACCAAGTGT  
Env H P A C A N F D Y K D R P K L H P Y T C R H W R L K E Q E Q T K C

7901 TTAGGAGAACAACTAATAAATGTTATATCTGCATATAGTTCCAGAAATATTTATGGGATTTTGGCTGGTTAGCATATAAATGGTAAATTTTCCTA  
 Env L G E Q T N K C I Y Y P A Y S S P E Y L W D F G W L A Y N G N F P S

8001 GTCCCTGTGTGAGCAACAAGAGAAAAATAGGGAACCAAAAATGAACTATATCCCTGTATGGAGAAATGTATGAGGGCCACTGAAACAAATATCATTTAGA  
 Env P V C E Q Q E K I R E P K Y E L Y S L Y G E C M R A T E Q L S L E

8101 ACAAGTTTTATTAGGGTTACATGGATTTATTAGATTTCCAACATGATCCCTATAAATGCCCAAGGAGGGCTTTTATTGGATTAGATAGTCCCTAAA  
 Env Q V L L G L H G F I R F Q H D P I T Q M P K E R A F I G L D S P K

8201 TGGCCTCCTATTTATCCTAATGTTACTGGAGAAAACAAGAGCTTCCTGTCCCTCCAAAAGGCAAGAGAGATGTTGATAATAAATTTGGAATAAATTTACAAA  
 Env W P P I Y P N V T G E T R A S C P S K R Q R R | D V D N N W N K L Q K

**Hydrophobes Fusionspeptid**

8301 AAGCTGGATATGCAATAACCAATTCGTGAAAAACAAATTCAGATTTAAATGATGAGTCAATCGTATCTGGTTTATATCTTTTAAAGAGATCA  
 Env A G Y A I T N S V K Q I A Q I S D L N D E S I V S G L Y L L R D H

8401 TGTGTTACTTATGGAAGCTACATACATGATGTATCTGCATTAGAGGATTCATCGCTATACAACATTTCCATACACATTTAATGCAGTTAAAAATTA  
 Env V V T L M E A T L H D V S A L E D S I A I Q H F H T H L M Q L K L

8501 TTATTAATGGAAAAATAGGGTTGATGGTCTTACATCGATACTCAATGGATAAAAAACAGTTGCAATTAATGATGAAAGATGAAAAGTTCTTAGAAGAA  
 Env L L M E N R V D W S Y I D T Q W I K T Q L Q L N D E D M K V L R R T

8601 CTGCAAGAGCATTGGTGTATAATAATAGATCATAATGAAGATACTAAGACTTCAACAAATATGGGAAAATAGCTATGTACTATGAAAATCAATAGTCCCTAGTGT  
 Env A R A L V Y N I D H I E D T K T S T I W E I A M Y Y E I I V P S V

8701 GATATATCAACAAAATTTGGAATGTTCAAAAATGTAGGACATTTAATAGCCTCAGCAGGAAGTTTAAACATTAGTTAAGGTTAAACATCCCTTATGAAAATTA  
 Env I Y S T N W N V Q N V G H L I A S A G S L T L V K V K H P Y E I I

8801 AATCAAGAATGTGGAATAATAAAGTACTTACATATTTGAGAACTGCCAAGAGACTGATTAATGTAATCTGTGACACAAATAGAAGAAAGTTCAACCTTGTGGCA  
 Env N Q E C G I I K Y L H I E N C Q E T D Y V I C D T I E E V Q P C G N

8901 ACCAGACAGGAAGTGTTCCTGTATTAGCTGAAACCAGTACCAGATGGATTCATGTAATGAAATGAAAGAAATGAAAGTACATCTATATGTCTCA  
 Env Q T G S D C P V L A E P V P D G F H V I E S L K N G S Y I Y M S H

9001 TTATCAAGATTTGTTTTAACACCTTATATACCACAAGTTGTCACTGTGAATGCTACAAATCAAGTGTCTAGGAAGGAACTTAAAAACCACTTCTCAGTCAG  
 Env Y Q D C S L T P Y I P Q V V T V N A T I K C L G R N L K P P L S Q

9201 AAGTCAAGATCACTTCCACATGGGAAA**CTATAA**AAGACCCAAA**TTGACAGAGCA**CAAGCAGAA**CTTCTTCG**ACTGGACTTGCATGAAGGAGATTCTGCAAA  
Env V K I T S T W E T I K D Q I D R A Q A E L L R L D L H E G D S A N **SD<sub>P</sub>**

9301 TTGGCTGAAAACAGCTTTCTAAAGCCACAGAGGATATTTGGCCAGCAGCAGCAACATTTGGTAAAGTAGGGGATTTCCCTCTCTGGAACTTT**TCGTGGGA**  
Env W L K Q L S K A T E D I W P A A A T F G K V G D F L S G T F G G **SA<sub>las</sub>**

9401 CTTTTTGGGACTTTAGGATATATAAAACCCATAATAGTTGGGATTTGTTATTTTACTTTTGTATTTGGCA**AGAT**CTTTGTCAATGGCTTCCCAGCA  
Tas/Bet M A S Q Q

Env L F G T L G Y I K P I I V G I I V I L L I V I V C K I L S W L P S **K**

**Dilysine Motiv**

9501 AGAGAAAACTCAATAGTTCAGAAAGATGATTTTATGGAAAGA**ACTTAGAGCC**TTCTTAGCTGAATTTCCAATTTGCCGAACAACCCCTTGGAA**GATGACGTC**  
Tas/Bet E K N S I V P E D D F M E E L R A F L A E F P I A E Q P L E D D V

Env R **K T Q \***

9601 TTTTCAGCGGAAGGGCAGCAGCCCTCTCAGTTCCCTAGAGGATCCCTGGAGAGGACCTTAGTGGAGCATCAGCTCAGGCTGGGGCTTCATCAGGACCCCCCA  
Tas/Bet F Q A E G Q Q P S Q F L E D P G E G P S G A S A Q A G A S S G P P K **SD<sub>bet</sub>**

9701 AGGTAAGTGGTAAACTATGGAATATGATGGCACACCATCCAAACCGTGGTACCACCTTCCCATGGCCAGATGAACCTCCTACAGGACG**AGAGCC**CCCGCTT  
Tas V S G K L W N M M A H P N R G T T S H G P D E P P T G R E P R L

9801 AAGATGGCTACAAGAAGCAAGAAATGGAAAACGGCTTATATCAGATTTGAAAAAGATCTGGAAAAGTTCTTCCCAACACCAGAAACAACCGTGAGTTTTTTTATT  
Tas R W L Q E A R M E T A Y I R F E K D L E K F F P T P E Q R E F F I

9901 CAAAGAGCTATTA**TACTGCTGGGTATAAACCTGATTTAGCTA**TATATACTGCTCATAAATGGATGGTATGCATGCATACAACCTCACACAGGAGATT  
Tas Q R A I I T A A G Y K P D L A I Y T A H N G W Y A C I Q P H T G D L

10001 TAGAGAAAAATATGAAGTATATTATAAAATGCTTAAATGTGGAATGAACAATGGGACCCCTTTGTTATATGACTGGGACCCCTTCTGTGCTTATGTTTCT  
Tas G E K Y E V Y Y K C L K C G N E Q W D P L L Y D W D P S V L M F L

10101 AAGAGCTTGGTGGAAAAACACCTCATA**CTAGTCCTCACAGCTATGAGAAGC**CATGCTGTATGTCTGGTATAATACTCTGAATTTCTTCCCTCCAGT  
Tas R A W W K T P H T S S P L T A M R R R H D A V C A G I Y S D S S S

**Nukleäres Lokaisationssignal**

10201 ACAGAACTCCAAAAACGCAGGCAAAAGGTTGATCCAGGCCATCGTTGGGAGCGTACAAAAGGACCTTTGATTCAGGTCCTCCCTAGAGCAACTGGTGTCTTA  
Tas T E P P **K R R Q R R Q** R G D P G H R W G A Y K R T F D S G F L E Q L V L T

10301 CCCATACTTGGCCCTACACCAGTGGCCGGAACTTAAGAGAAATTCATCTTGGGATTTAGAGACTGTATGCCGGCACTAC**CAGA**CCCGGGGAAGG  
 Tas H T C A Y T T E W P E P K R I H L G D L E T V C P A L P D P G E G  
 Bet T R G K E

10401 AGGTACCAACTCTGAGATGGAGCCGCGAGTACAGCAGGGTTCCTGGACTTTGATCAGTGAGACTGFACCTGTTCCCTAGATTAGGAGCAATGACATTTAT  
 Tas G T N S E M E P Q Y Q Q G S W T F D Q \*  
 Bet/Bel2 V P T L R W S R S T S R V P G L L I S E T V P P R L G A M T F I

10501 AATTTGTCAAAAAGTATACAGCTATTGTCAITTTGTGGGGAGATGATGGTTTCAAAACAGAAACCAAACTTATTTGCATGTTCCCTCTACTACATGTGCAITTA  
 Bet/Bel2 I C Q K Y T A I V I C G G D D G L Q T E P N L F A C S S T T C A L

10601 ATAATATGGGATTTGCTTATGGATGTAAAAAAGACACACGTCCTTTGGGTACAATCCTTAAGAAAGTATCATGAGCTTGATAGCAGATCCCCATCTAITTA  
 Bet/Bel2 I I W D C F I G C K K D T R P W V Q S L R K Y H E L D S R S P S I R

10701 GACATCAGTCTAATTTACAAGCTCTACTGCCCTCCTGTATATGGAGAACCCAGGTATTTGCTGTTTGCAGGAATATAGAAAAATTCCTAGATACTGTAACCTGG  
 Bet/Bel2 H Q S N L Q A L L P P V Y G E P G I C C L Q E Y R K F L D T V T G

10801 AAAATATGCTTACTCCTCATGTATAAGAAACAAAATGTACTAATTTGGATGACAGGCTTTCACITTAGGTGAAGAACTCCTAGCTCATGAAGGTAAATTTACCT  
 Bet/Bel2 N M L T P H V I R T K C T N W M T G L H L G E L L A H E G K L P

10901 ATAACTATTGCAGAGCTATTTCATGAATATGGAAATCCACAGGACAGCA**TAGAGAGGGG**TTTATGGGAAAAATCAGCACAGAACTATCCTTTATTATG  
 Bet/Bel2 I T Y C R A I H E Y G N P Q D S I E E R V L W E N Q H K N Y P Y D

**3'PPT**

11001 ATCCATCCTGCCCTATGGATCTCCTTGGATGAAGCCCTAGCAAAAAGAGATGAAGGTATCTGGACAGGTCAGTGCCCAAGAGTTACAATAATGTATGACTCC  
 Bet/Bel2 P S C P M D L L D E A L A K E D E G I W T G P V P R V T K C M T P

11101 CACAGGATTGCAGTGGGCTAATAGGGCCCTACCTAAAGGATATCAATTAGTGACACCTAGAGGTATAAAAATCACCTCTAGGAGATCTAAGTTTCAT  
 Bet/Bel2 T G L Q W W A N R A L P K G Y Q L V T P R G I K I T S R R S K F H

11201 CCACATGATGCTGAAGAAGATTTCTGTACCCCTCAAGCACATGAATGGGATCCTGTATAATGAATAACAGGTACTGACTCAGAAATCAGAGGATTAGATGA  
 Bet/Bel2 P L D V T E E D F C T P Q A H E W D P D N E T G T D S E S E D \*

3'LTR



11301	CTCAAACTGAAACTTATAACCCACAGGTACTATTTACAGTAGCTGGGTAGCTCAATTTGAAAAGTGAGCCCTGTCACTCTTTTCGCTGAGGCCCCAGCA	
11401	GTTGTTAGTTCAAAGGGAGCTAGCGTATGCTTGAAGAGCTGACCCCAAATGAACTAACTTATGCTTGTCTTACGCAATATGTTTTTGTCTATAGGTTAAAGG	U5
11501	TAAAGTTGATGGAAAAATTTAATGCTTCCCAAGTAGTGCATCTGTAAAGCAGGAGAGCACCAATTTGTAAGCATTTTGACTCATGTTTTGGTTCGAAATCC	
11601	CGTCATAACTGTACCTGACTCAITTTACAGTTTAAAGTGGTTTTCAAAACCAACTTTTCACTCTGGGTTGGTGAAGTGGCACAAATCGTCTAAGGGACTATCTgAT	
11701	GTGATGTGGCGCTGCACCCAGTCTAGGGGACCGCTAGCTGAAATTAATGTTCCGAACTCCTCAATAATCAGCTGCGGAGCCCTCCGTTTTCCAAAACCCAGTTAAATG	
11801	AAGTTTTGAATAAATCAAATATGAAGAAATAAAAATCAAGCAAATTAGTAAATACTTTTTAGACTATAAAAAGATGTACTCTTAAATTTGTACGAAGAGCTTCCCT	R
11901	CCTCACCCATCTAGCTGCGTCTAGAGTGAACGGAACTCTCCAGGCTTGGTAAAGAAATTTATATAATTTTGTGGATTTGATTTATTTGTAATTTTGTCTCTGC	
12001	TTATAAATTAATTAATTTGTTCAATGATCTTgCTATAATAAACCCTTGTATTCGAGAACTTAAATTAATTTGATGTTTTCTATACTACTTAATAAGTGAA	U3
12101	ACAAGACCCCTAACTGAGAGAAGGCAGGTTAGAGCACCCCTGTTGGTGAATTCCTTAGGAAATGCTACTAAAAGTGCTCTTAAACCCACAAGTTCCCTTTGGGG	
12201	TCTTCCACAACA	

Abb. 34: Komplette Nukleinsäure-Sequenz des SFVspm mit offenen Leserastern und charakteristischen Domänen.

### 3.4 Phylogenetische Analyse des SFVspm

#### 3.4.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen SFVspm und FV

Die strukturellen und akzessorischen Gene der verschiedenen FV wurden in ihre Aminosäuresequenzen übersetzt und untereinander verglichen. Ein Größenvergleich der LTRs und Proteine in Tabelle 11 (Kapitel 3.2) verdeutlicht, dass SFVspm die kürzeste LTR aller bekannten FV aufweist, insbesondere eine für Primaten-FV sehr kurze U3-Region (Tabelle 12, Kapitel 3.2). SFVspm beinhaltet für Primaten-FV spezifische Domänen, wie die drei vorhandenen GR-Boxen im Gag-Protein und die ebenso in Gag enthaltenen PSAP-Motive. Das aktive Zentrum der Protease trägt jedoch im Unterschied zu allen anderen Primaten-FV und ebenso wie EFV das Motiv DTG statt DSG. In Tabelle 14 ist der prozentuale Anteil der Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene zwischen SFVspm und den bisher bekannten FV aufgelistet. Es zeigt sich, dass zwischen SFVspm und den anderen SFV meist höhere Sequenzähnlichkeiten vorliegen, als im Vergleich von SFVspm mit EFV, BFV und FFV. Das Pol-Protein stellt sich mit Ähnlichkeiten zwischen 73,8 % und 79,9 % als das konservierteste unter allen FV-Proteinen dar. Aus diesem Grund wurde es als Referenzsequenz für die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes der Primaten-FV ausgewählt.

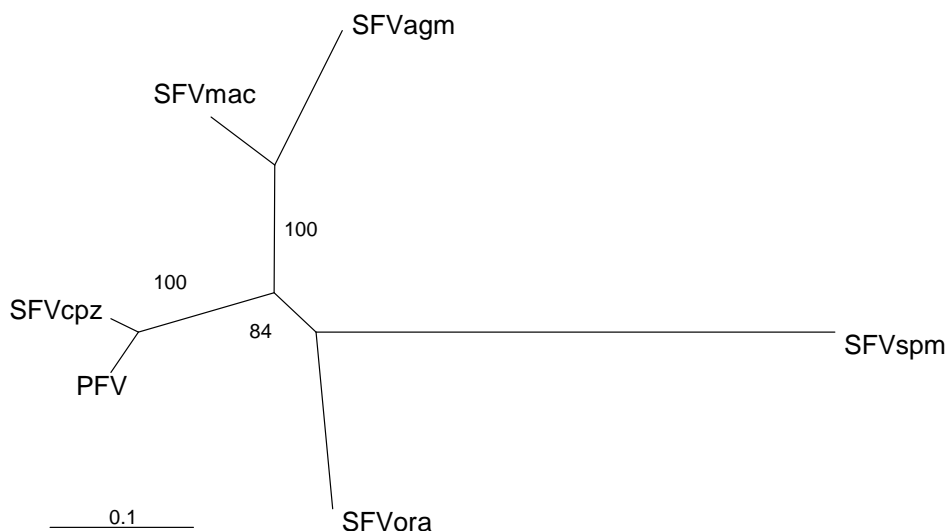
Virus	Prozentualer Anteil der Aminosäure-Ähnlichkeiten					
	Gag %	Pol %	Env %	- LP %	- SU %	- TM %
PFV	49.2	78.8	71.6	64.1	71.1	75.7
SFVcpz	49.8	79.8	71.2	65.0	69.8	76.1
SFVora	49.3	79.1	68.9	62.8	66.7	74.5
SFVmac	47.7	79.9	69.0	62.0	68.8	72.5
SFVagm	47.8	78.7	67.7	59.7	67.0	72.7
FFV	55.9	73.8	62.5	56.1	60.5	71.7
BFV	44.9	75.3	62.5	61.9	55.1	73.9
EFV	45.4	76.2	63.0	56.1	58.0	74.8

**Tabelle 14:** Aminosäure-Ähnlichkeiten zwischen SFVspm und FV. Tas und Bet wiesen keine repräsentativen Homologien auf. Verwendete Software: *EMBOSS*.

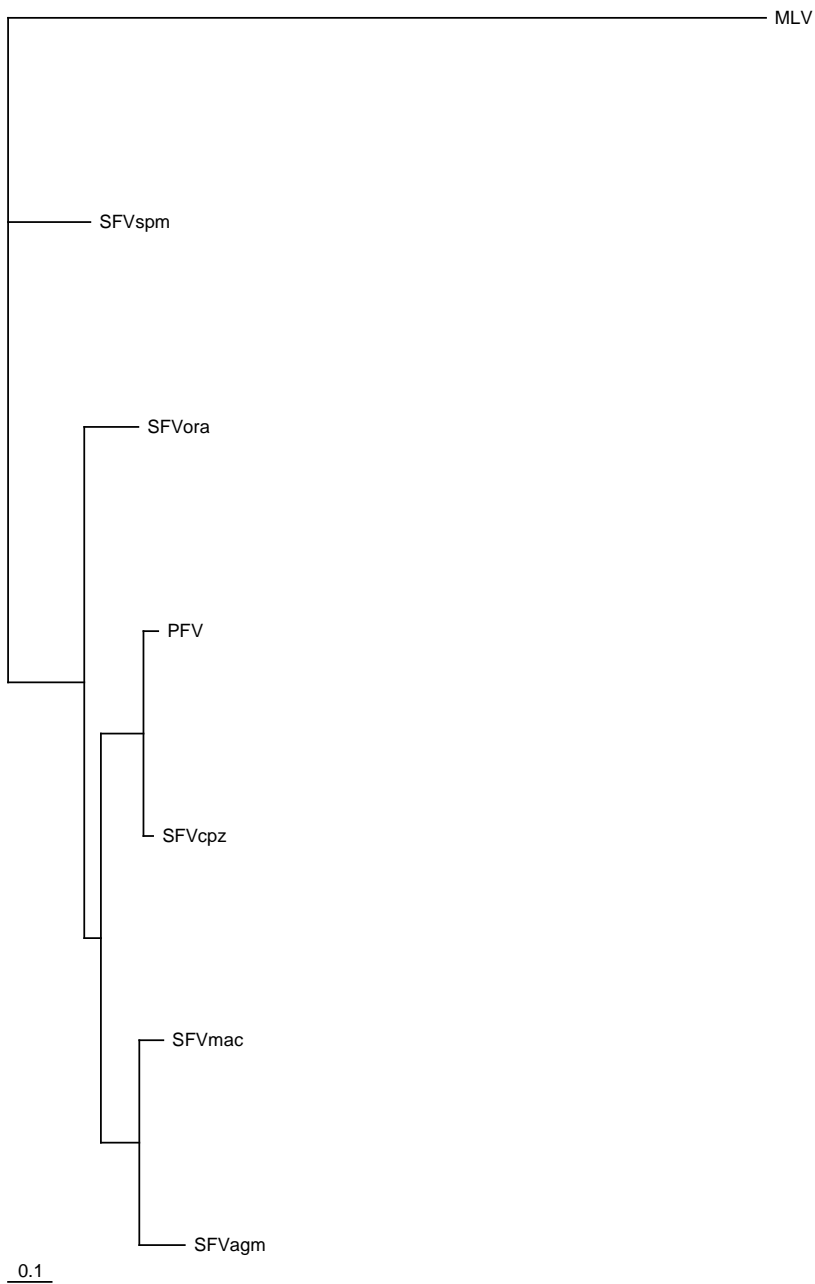
### 3.4.2 Phylogenetische Einordnung von SFVspm

Grundlage des phylogenetischen Stammbaumes war die komplette Aminosäuresequenz des Pol-Proteins von SFVspm und der fünf bekannten SFV: SFVcpz (GenBank Accession-Nummer: U04327), PFV (Y07725), SFVmac (X54482), SFVagm (M74895) und SFVora (AJ544579). Die Sequenzen der Nichtprimaten-FV wurden in die Analysen nicht einbezogen, da ihre Divergenz zu den SFV zu groß war. Der phylogenetische Baum wurde mithilfe der Programme *ClustalW* und *TREE-PUZZLE* erstellt und mit *Treeview* gezeichnet. Er basiert auf der Maximum-Likelihood-Methode und auf dem Algorithmus des Quartet-Puzzlings.

Die Stammbäume in den Abb. 35 und 36 verdeutlichen die phylogenetische Distanz des SFVspm zu den anderen SFV: SFVspm ist das am weitesten entfernte FV aus der Gruppe der Primaten-Foamyviren, deren Sequenz vollständig bekannt ist. Im gewurzelten Baum der Abb. 36, der als Outgroup die Pol-Sequenz des Murinen Leukämievirus (MLV) enthält, gruppiert sich SFVspm als eigener Ast, die anderen SFV entspringen einem anderen gemeinsamen Ast, der sich wiederum in die drei Untergruppen des SFVora, SFVcpz und PFV, sowie SFVmac und SFVagm verzweigt. SFVspm ist im Vergleich zur Gruppe der Altweltaffen-FV außerordentlich divergent.



**Abb. 35:** Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum verschiedener SFV und SFVspm. Die Phylogenien basieren auf der kompletten Aminosäure-Sequenz von foamyviralen Pol-Proteinen. Maximum-likelihood-Methode. Quartet-Puzzling-Algorithmus.



**Abb. 36:** Gewurzelter phylogenetischer Stammbaum verschiedener SFV und SFVspm mit MLV als Outgroup. Die Phylogenien basieren auf der kompletten Aminosäuresequenz foamyviraler Pol-Proteine. Maximum-likelihood-Methode. Quartet-Puzzling-Algorithmus.

### **3.5 Entwicklung eines diagnostischen Tests für SFVspm mittels Western Blot**

Neben der molekularen Charakterisierung des Genoms von SFVspm war es außerdem Ziel der Arbeit, einen diagnostischen Test, der spezifisch für SFVspm reagierte, zu entwickeln. Virusisolation, Detektion von viraler DNA mittels PCR, Immunfluoreszenz-Analysen und Immunoblot-Analysen gegen FV Gag bzw. Bet sind die zuverlässigsten Methoden, um eine Immunität bzw. eine Infektion mit Foamyviren nachzuweisen (Hahn, 1994). In Studien zur Serokonversion bzw. Seroepidemiologie konnte gezeigt werden, dass in Western Blot Analysen eine Seroreaktivität bei FV-infizierten Primaten und Katzen am stärksten gegenüber dem Gag-Protein vorlag (Khan, 1999; Alke, 2000; Hussain, 2003; Romen, 2006). Somit ist das Gag-Protein in diagnostischen Tests Antigen der Wahl.

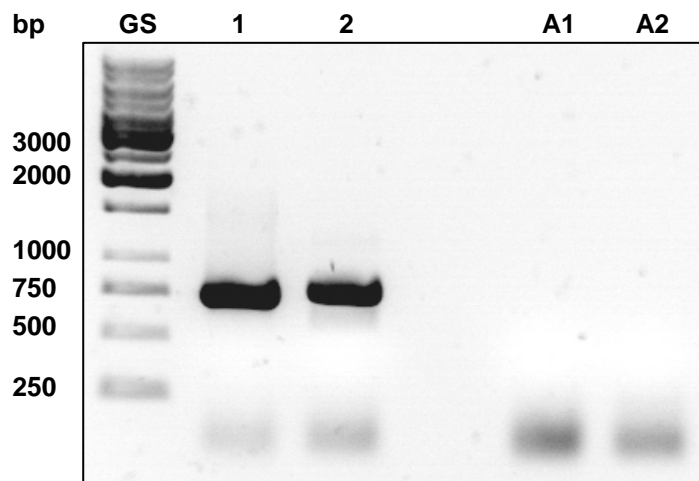
#### **3.5.1 Protein-Expression eines Abschnittes von gag zur Antigengewinnung**

Um eine optimale Protein-Expression von Gag zu erreichen, wurde nicht das Vollängen-Gen für das Antigen ausgewählt, sondern ein Gen-Abschnitt von 765 bp Länge beginnend am Startcodon von *gag* an nt 1341.

Der genannte *gag*-Abschnitt wurde in einen Expressionsvektor kloniert, der N-terminal Thioredoxin mit His-Patches enthielt. Somit wurde ein rekombinantes Fusionsprotein exprimiert, das eine Aufreinigung aufgrund des enthaltenen His-Patches mittels Nickel-NTA-Agarose erlaubte, aufgrund des Thioredoxins eine bessere Löslichkeit des Proteins ermöglichte und im Western Blot mit einem Thioredoxin-Antikörper nachgewiesen werden konnte.

In der PCR zur Klonierung des Gen-Abschnittes fanden die Primer *Gag expr s* und *Gag expr a* mit 100 ng DNA der infizierten MRC-5 Zellen und dem Expand Long Template PCR System im Protokoll XL Anwendung. Abb. 37 zeigt die erfolgreiche Amplifikation des *gag*-Abschnittes. Anschließend wurden die PCR-Produkte entsprechend des Champion pET Directional TOPO Expression Kits in den Expressionsvektor pET102/D-TOPO kloniert und Top10 *E.coli* Bakterien transformiert. Die Analyse der Plasmid-Präparationen mittels PstI-

Restriktionsverdau ergab eine erfolgreiche Klonierung für zwei Klone. In einer Sequenzierung zeigte sich, dass nur einer dieser Klone die korrekte *gag*-Sequenz mit Abweichung einer Aminosäure auf Proteinebene besaß. Diese Variation war auch bei einigen Klonen während der Sequenzierung des Gesamt-Genoms von SFVspm aufgefallen, was auf das Vorliegen zweier verschiedener Klonpopulationen hindeutete.

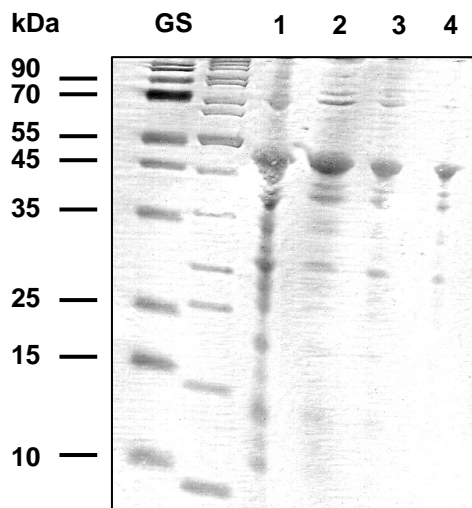


**Abb. 37:** PCR des *gag*-Abschnitts zur Protein-Expression.

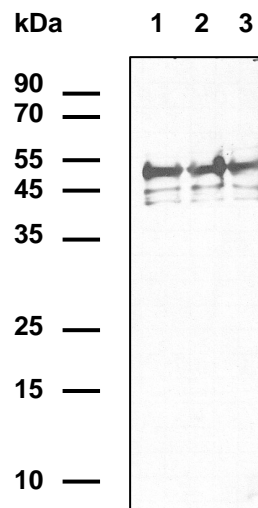
1: PCR mit SFVspm-DNA und Primerpaar Gag expr s / Gag expr a. A1: PCR mit Aqua und Primerpaar Gag expr s / Gag expr a. 2 bzw. A2: analoge PCR mit anderem Primerpaar.

Das PCR-Produkt des *gag*-Abschnittes hatte eine Länge von 765 bp, was einem errechneten Molekulargewicht des translatierten Proteins von ca. 30 kDa entsprach. Zusammen mit Thioredoxin (11,7 kDa) wurde ein rekombinantes Fusionsprotein von ca. 42 kDa erwartet. Zur Expression des Fusionsproteins wurden BL21 Star (DE3) *E.coli* Bakterien mit der aufgereinigten Plasmid-DNA von *gag/pET102* transformiert, Einzelkolonien selektioniert und eine verdünnte Übernachtskultur mit 1mM IPTG induziert. In einem Pilot-Experiment wurden die Bedingungen zur Expression des Fusionsproteins auf eine Inkubationszeit unter IPTG-Induzierung von 6 Stunden optimiert. Die präparative Protein-Expression von SFVspm Gag-Thioredoxin erfolgte schließlich in einem Volumen von 5 Litern angeimpften LB-Medium. Anschließend wurden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert. Für die Protein-Aufreinigung unter Nativ-Bedingungen wurden geladene Nickel-NTA Agarose-Beads verwendet, die mit hoher Affinität

an die Histidin-Patches im Thioredoxin banden. Es wurden vier Protein-Eluate gewonnen, die eine maximale Protein-Konzentration von 3,35 µg/µl enthielten (Bradford-Methode). Anschließend wurde ein SDS-PAGE mit je 3 µg der Protein-Eluate durchgeführt und das Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt. Abb. 38 zeigt das Coomassie-Gel mit 3 µg der Eluate 1-4 des Fusionsproteins Gag-Thioredoxin im Pilotexperiment. Das Molekulargewicht konnte nur schätzungsweise anhand des Markers zwischen 45 und 55 kDa bestimmt werden, was der erwarteten Größe von 42 kDa annähernd entsprach. In einem Western Blot wurde schließlich das Fusionsprotein mit einem Primär-Antikörper gegen Thioredoxin in einer Konzentration von 1:5000 und einem Sekundär-Antikörper Anti-Kaninchen in einer Konzentration von 1:5000 spezifisch nachgewiesen (Abb. 39).



**Abb. 38:** Coomassie-Gel des Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins im Pilotexperiment (Eluat 1-4).

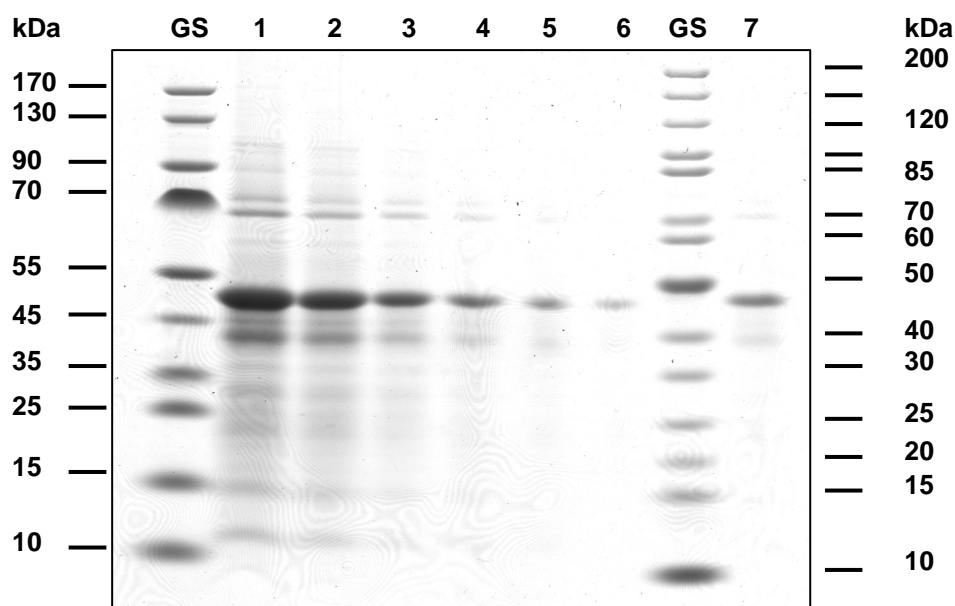


**Abb. 39:** Western Blot des Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins im Pilotexperiment (Eluat 1-3). Primärantikörper: Anti-Thioredoxin 1:5000. Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen 1:5000.

### 3.5.2 Antikörper gegen SFVspm-Gag-Antigen

Ziel war es nun, einen spezifischen Antikörper gegen das exprimierte und aufgereinigte SFVspm-Antigen zu gewinnen. Dies sollte durch Antigen-Injektion in Kaninchen erfolgen, was eine Serokonversion gegen SFVspm-gag zur Folge hatte.

Nach Lagerung des Proteins bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und erneutem Auftauen zeigte sich, dass das Protein präzipitiert hatte und somit nicht einer direkten Verwendung zur Immunisierung der Kaninchen zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde die Protein-Löslichkeit mit 8M-Urea-Lysepuffer erhöht und das Protein in Refolding Puffer gelöst. Eine erneute Analyse der Protein-Konzentration mithilfe eines BSA-Vergleichs im Coomassie-Gel nach SDS-PAGE ergab eine Konzentration von ca.  $1,5 \mu\text{g}/\text{ul}$ . Zur Injektion wurde eine Antigenmenge von  $4 \times 100 \mu\text{g}$  in je 2 Kaninchen verwendet. Abb. 40 zeigt ein Coomassie-Gel des gelösten Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins.



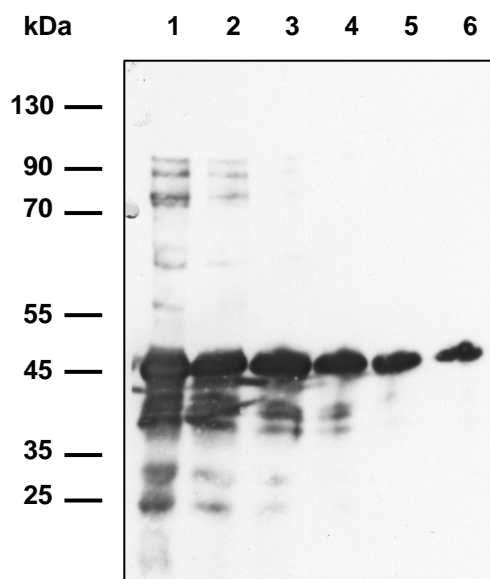
**Abb. 40:** Coomassie-Gel des Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins. 1:  $10 \mu\text{g}$ , 2:  $5 \mu\text{g}$ , 3:  $2 \mu\text{g}$ , 4:  $1 \mu\text{g}$ , 5:  $0,5 \mu\text{g}$ , 6:  $0,25 \mu\text{g}$ , 7:  $1 \mu\text{g}$  Protein.

Die Spezifität und Sensitivität des gewonnenen Antikörpers gegen SFVspm Gag im Kaninchen-Serum wurde in Western Blot - Analysen nachgewiesen. Dazu wurde SFVspm Gag-Antigen in abnehmender Quantität von  $500 \text{ ng}$  bis  $15 \text{ ng}$  in

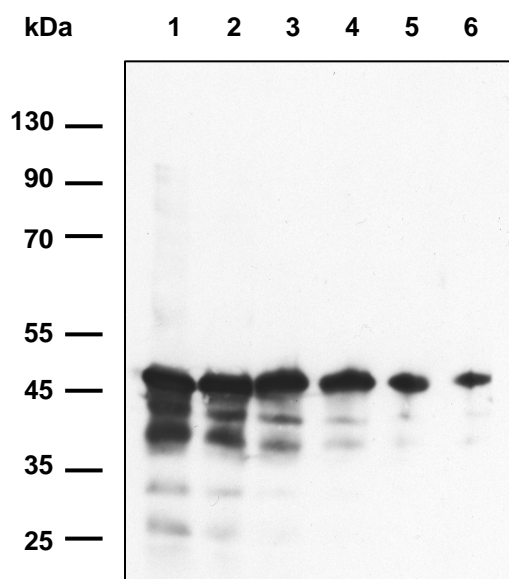


Polyacrylamid-Gelen in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis des Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins erfolgte mit dem generierten SFVspm-Gag-Antikörper in einer Konzentration von 1:10000 des Kaninchen-Serums und als Positivkontrolle und Sensitivitätsvergleich in einem zweiten Western Blot mit einem Thioredoxin-Antikörper in einer Konzentration von 1:10000. Zweitantikörper war in beiden Fällen ein Peroxidase-konjugierter Kaninchen-Antikörper (1:5000).

Die Western Blot – Analysen zeigten eine Sensitivität für Anti-Thioredoxin und auch für Anti-SFVspmGag mit einem sicheren Nachweis von unter 15 ng Antigen (Abb. 41 und 42).



**Abb. 41:** Western Blot des Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins.  
Primärantikörper: Anti-SFVspm-Gag.  
Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen.



**Abb. 42:** Western Blot des Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins.  
Primärantikörper: Anti-Thioredoxin.  
Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen.

In beiden Western Blots: 1: 500ng, 2: 250ng, 3: 125ng, 4: 60ng, 5: 30ng, 6: 15ng Protein.

### 3.6 Untersuchungen zum Nachweis einer Infektion mit SFV in Neuweltaffen

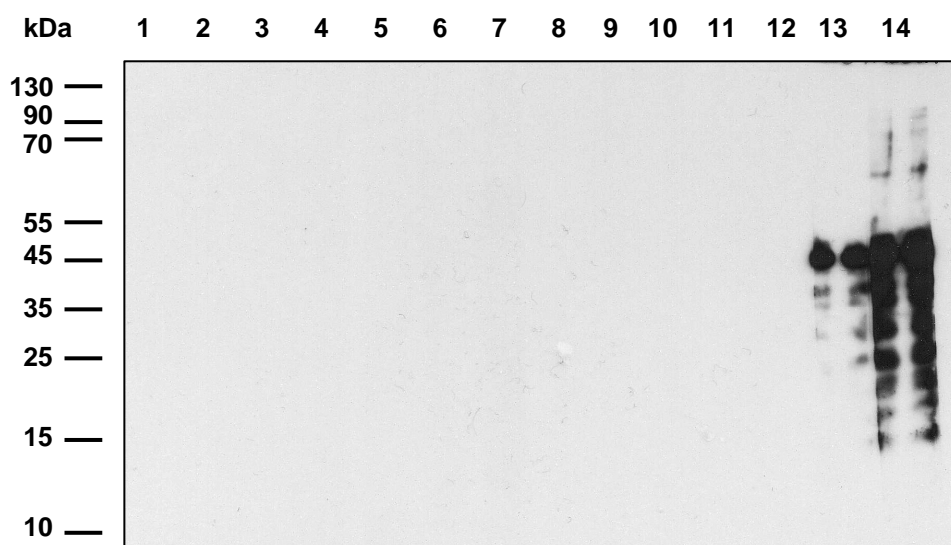
Zur Teilordnung der Neuweltaffen (*Platyrrhini*) und zur Familie der Klammerschwanzaffen (*Atelidae*) gehört der Klammeraffe (*Ateles*, englisch: Spider Monkey), der Wirt des SFVspm, aus dem Hooks et al. 1973 erstmalig SFVspm isolierten (Hooks, 1973). Hooks' Isolat war Quelle des in dieser Arbeit klonierten SFVspm.

Da bisher noch keine komplette Genomsequenz eines Neuweltaffen-FV bekannt war, stellte sich die Frage, ob eine Infektion mit SFV in Büschelaffen (*Callithrix*), die zur Familie der Krallenaffen und zur Teilordnung der Neuweltaffen zählen, mithilfe des entschlüsselten SFVspm-Genoms nachweisbar war. *Callithrix*-Affen sind 18 bis 30 cm große Primaten, die sich aufgrund ihrer Größe gut als Primaten-Modell in der medizinischen Forschung eignen und auch in der Erforschung der Gentherapie eine bedeutende Rolle spielen. Somit ist die Surveillance einer SFV-Infektion bzw. SFV-Immunität erforderlich. Das Arten-spezifische FV für *Callithrix* ist das SFVmar, das 1981 aus einem Büschelaffen isoliert wurde, dessen Sequenz zum Zeitpunkt der Arbeit jedoch noch vollkommen unbekannt war und somit als Grundlage eines diagnostischen Tests nicht zur Verfügung stand. Eine Infektion der *Callithrix*-Affen sollte einerseits mittels Western Blot untersucht werden, das heißt Seren der Affen sollten auf mit SFVspm kreuzreagierende Antikörper getestet werden. Aufgrund der Verwandtschaft von *Ateles* und *Callithrix* innerhalb ihrer Teilordnung war eine Kreuzreaktion der FV-Antikörper von verschiedenen Neuweltaffen wahrscheinlich. Zum anderen war zu untersuchen, ob eine Infektion mit SFV durch Detektion von SFV-DNA in Affen-Lymphozyten und Affengewebe, wie Milz, Leber und Mundschleimhaut, nachgewiesen werden konnte. Die Seren und Gewebeproben wurden durch die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Helmut Hanenberg (Universität Düsseldorf) und Prof. Dr. med. Peter Horn (Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt.

### **3.6.1 Test von *Callithrix*-Seren auf SFV-Immunität mittels Western Blot**

Zum Nachweis einer möglichen Immunität der *Callithrix*-Affen gegen SFV wurden die Seren von zwölf Affen auf kreuzreagierende IgG-Antikörper untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem das zu detektierende Antigen das in dieser Arbeit exprimierte SFVspm-Gag-Protein darstellte und als Primär-Antikörper die Affen-Seren eingesetzt wurden, die gegebenenfalls SFV-IgG-Antikörper enthielten. Sekundär-Antikörper war Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Protein G, ein rekombinantes Protein aus der Zellwand von *Streptococcus sp.* mit hoher Bindungsaffinität für IgG-Immunglobuline der Säugetiere. Als Positivkontrolle wurde als Primär-Antikörper der generierte SFVspm-Antikörper verwendet, in Verbindung mit Protein G bzw. Kaninchen-Antikörper als Sekundär-Antikörper.

Es wurden jeweils 62,5 ng SFVspm-Gag-Protein pro Tasche auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, mit SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die zwölf Seren wurden jeweils in einer Konzentration von 1:100 als Erstantikörper eingesetzt, Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Protein G in einer Konzentration von 1:5000 als Zweitantikörper. Es wurden zwei Positivkontrollen durchgeführt: In beiden Fällen stellte der SFVspmGag-Antikörper in einer Konzentration von 1:10000 den Erstantikörper dar. Als Zweitantikörper wurde in der ersten Positivkontrolle Protein G in einer Konzentration von 1:5000, in der zweiten Positivkontrolle Kaninchen-Antikörper ebenfalls in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Es zeigte sich, dass beide Positivkontrollen das Antigen nachweisen konnten, dass jedoch alle zwölf Affen-Seren kein Antigen detektieren konnten und somit keine kreuzreagierenden Antikörper gegen SFVspm-Gag enthielten (Abb. 43).



**Abb. 43:** Western Blot des Gag-Thioredoxin-Fusionsproteins mit Affenseren (1-12) bzw. Anti-SFVspm-Gag (13 und 14) als Primärantikörper.

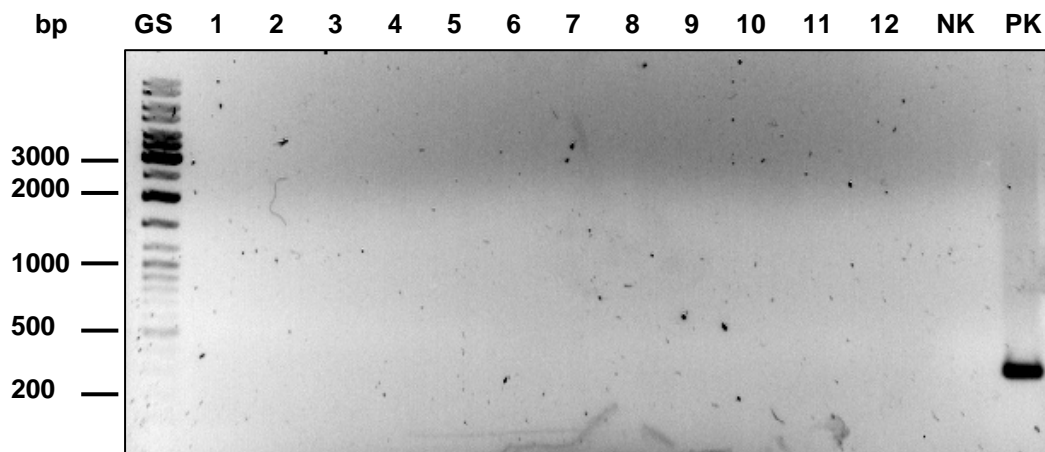
1-12: Affenseren von 12 Affen als Primärantikörper, Protein G als Sekundärantikörper. 13: Anti-SFVspm-Gag als Primärantikörper, Protein G als Sekundärantikörper. 14: Anti-SFVspm-Gag als Primärantikörper, Anti-Kaninchen als Sekundärantikörper.

### 3.6.2 Test von *Callithrix*-Gewebe auf SFV-Infektion mittels PCR

Für die Untersuchungen zum Nachweis einer SFV-Infektion wurden zum einen Lymphozyten ausgewählt, da diese das Hauptreservoir für FV im peripheren Blut darstellen (von Laer, 1996). Zum anderen wurden auch Gewebeproben untersucht, nachdem in *in vivo* Studien zur Virus-Detektion FV-DNA in einer Vielzahl von Geweben nachweisbar war, FV-RNA jedoch nur in Geweben, die mit der Mundschleimhaut assoziiert waren (Falcone, 1999; Murray, 2006). Aus diesen Gründen wurden die gut durchbluteten und somit an Lymphozyten reichen Gewebe der Leber und Milz und außerdem die Mundschleimhaut für die Untersuchungen in dieser Arbeit ausgewählt. Zudem wurde bereits isolierte DNA aus den Lymphozyten der zwölf *Callithrix*-Affen, deren Seren auch im auf Western Blot basierten Test angewandt wurden, verwendet. Im Folgenden sollte aus isolierter *Callithrix*-DNA ein 414 bp großes SFV-DNA-Stück mithilfe des Primerpaars *sfv8 int sense* und *sfv8 int antisense* amplifiziert werden. Das Amplifikat stellte einen Ausschnitt des *pol*-Gens, genauer des Integrase-Gens dar.

DNA wurde aus 2 x 30 mg Marmoset-Lebergewebe, 2 x 10 mg bzw. 2 x 25 mg Milzgewebe, und 2 x 25 mg Mundschleimhaut mit dem DNeasy Tissue Kit extrahiert, wobei alle Gewebeproben aus dem gleichen Tier stammten. Die isolierte Lymphozyten-DNA stammte aus zwölf verschiedenen Tieren. Für die PCR wurden ca. 500 ng Gewebe-DNA bzw. Lymphozyten-DNA und 2 ng DNA einer Plasmid-Präparation des SFVspm-Integrase-Abschnittes eingesetzt. Die PCR erfolgte im Protokoll PCR-XL bei einer Annealing-Temperatur von 51°C und einer Elongationszeit von 2 min.

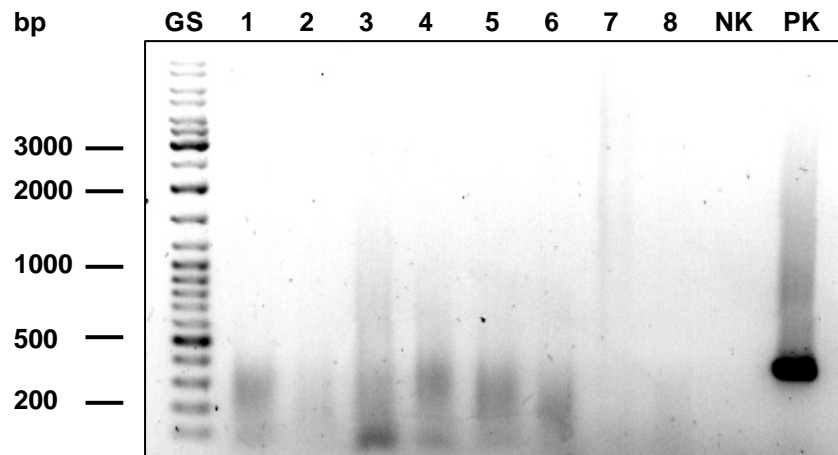
Es konnte keine SFV-DNA aus den Gewebeproben und Lymphozyten amplifiziert werden, Abb. 44 und 45 zeigen die Analyse im Agarose-Gel. Eine Infektion der Callithrix-Affen konnte somit nicht nachgewiesen werden, was im Einklang mit der auf Western Blot basierten Methode stand.



**Abb. 44:** PCR der Affen-Lymphozyten-DNA mit SFVspm-Integrase-Primern.

1-12: PCR mit Lymphozyten-DNA 12 verschiedener Affen. NK: Negativkontrolle, PCR mit Aqua.

PK: Positivkontrolle, PCR mit SFVspm-Integrase-Plasmid.



**Abb. 45:** PCR der Callithrix-Gewebe-DNA mit SFVspm-Integrase-Primern.

1-2: Leber-DNA, 3-6: Milz-DNA, 7-8: Mundschleimhaut-DNA. NK: Negativkontrolle, PCR mit Aqua. PK: Positivkontrolle, PCR mit SFVspm-Integrase-Plasmid.

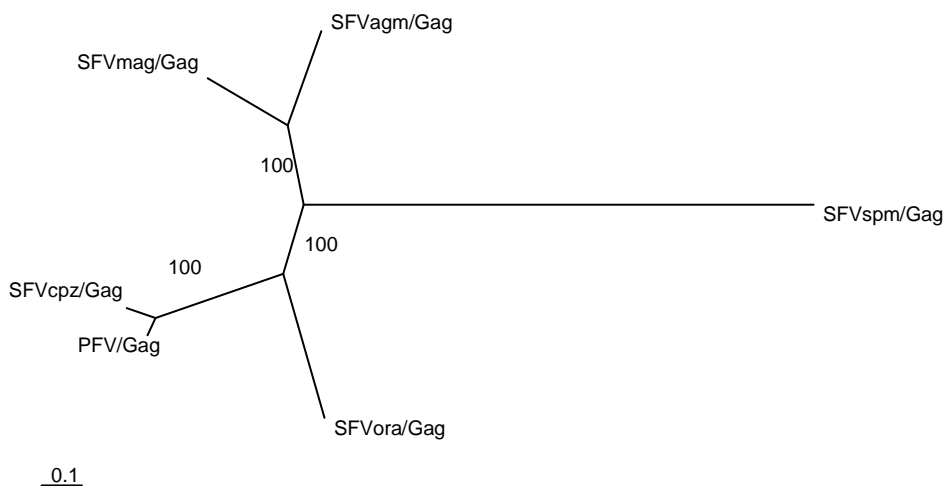
## 4 Diskussion

### 4.1 Molekulare und phylogenetische Analyse des SFVspm

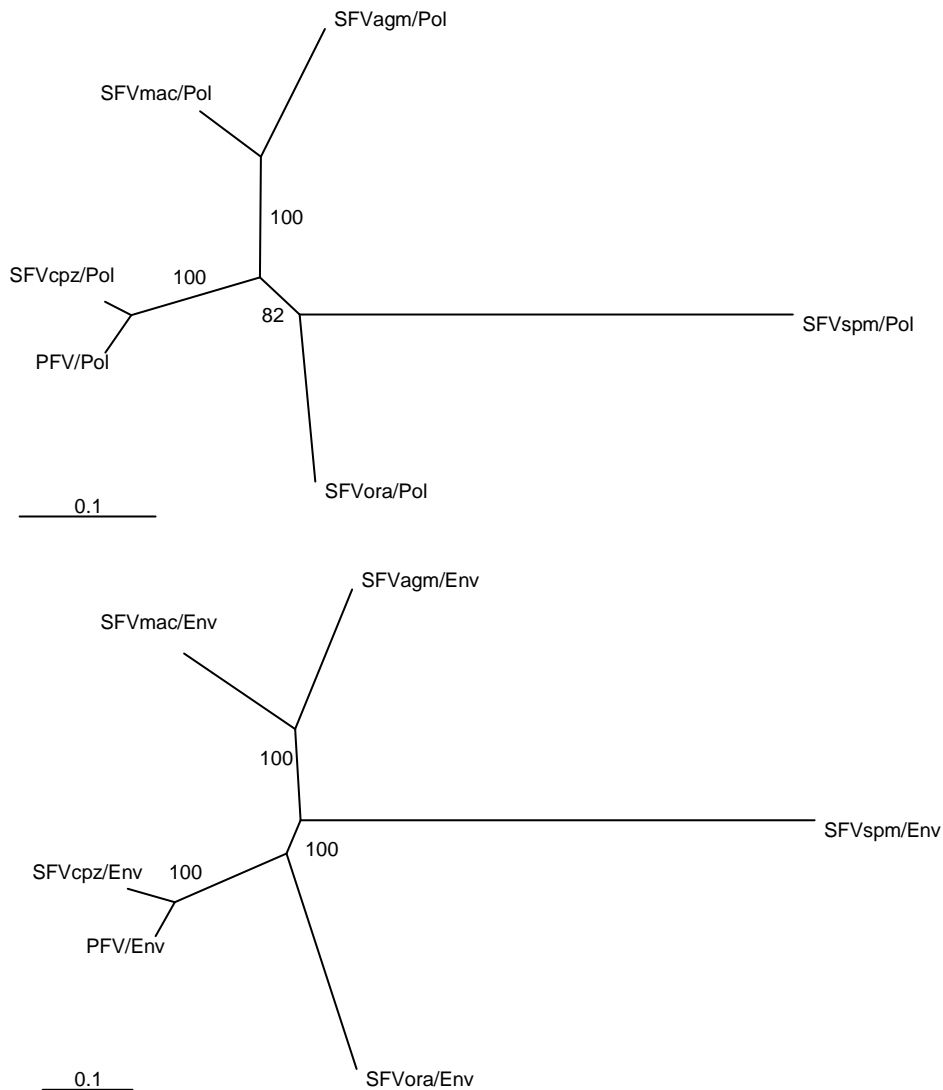
Foamyviren sind als exogene Retroviren in vielen verschiedenen Spezies beschrieben worden. Molekulargenetisch wurden jedoch bisher nur die Primaten-Foamyviren PFV, SFVcpz, SFVora, SFVmac und SFVagm, die alle zur Teilordnung der Altweltaffen-FV zählen, und die Nichtprimaten-Foamyviren BFV, EFV und FFV untersucht. Von Schweizer et al. wurde bereits eine 425 bp lange Sequenz des *pol*-Gens des Neuweltaffen-FV SFVspm beschrieben und phylogenetisch eingeordnet (Schweizer und Neumann-Haefelin, 1995). Diese Sequenz war jedoch für eine präzise phylogenetische Analyse nicht repräsentativ und wurde in neueren Studien zur Evolution der Primaten-Foamyviren nicht einbezogen. Switzer et al. konnten durch Analysen der phylogenetischen Stammbäume sowohl der Altweltaffen-Foamyviren, als auch ihrer Wirte, und durch Vergleiche der Molecular Clock zwischen SFV und Primaten eine gemeinsame Evolution von Foamyviren und ihren Wirten nachweisen (Switzer, 2005).

In dieser Arbeit wurde die komplette Genomsequenz des simianen Foamyvirus des Klammeraffens, dessen Wirt (*Ateles spp.*) zur Unterordnung der Neuweltaffen zählt, entschlüsselt und mithilfe von Homologie-Vergleichen mit bekannten FV molekular charakterisiert. Das SFVspm konnte als komplexes Retrovirus der Unterfamilie der *Spumaretrovirinae* identifiziert werden. Es besitzt fünf offene Leseraster, die für die Proteine Gag, Pol und Env, sowie für die akzessorischen Proteine Tas und Bet kodieren, sowie die charakteristischen Nukleotid- und Proteinmotive, die während des Replikationszyklus von großer Bedeutung sind. Es finden sich außerdem die Primaten-spezifischen Motive im Gag-Protein, wie die GR-Boxen (Schliephake und Rethwilm, 1994) und PSAP-Motive (Stange, 2005), so dass SFVspm eindeutig den Primaten-Foamyviren zugeordnet werden kann. SFVspm stellt somit das erste vollständig sequenzierte und molekulargenetisch charakterisierte Neuweltaffen-FV dar. Die Sequenz wurde in der GenBank unter der Accession-Nummer 68816 katalogisiert.

Da Foamyviren aufgrund ihrer genetischen Stabilität interessante Marker für Untersuchungen der Phylogenie sind, wurden anhand der Kenntnis der Genomsequenz von SFVspm und fünf anderen SFV phylogenetische Analysen mittels Maximum-Likelihood-Stammbäumen durchgeführt und SFVspm evolutionär eingeordnet. Wie in Abb. 46, die die Stammbäume basierend auf den drei Proteinen Gag, Pol und EV darstellt, zu erkennen ist, ist SFVspm das evolutionär divergenteste FV aus der Teilordnung der Primaten-Foamyviren. Im Gegensatz zu den bekannten Altweltaffen-FV gruppiert es sich als separater Ast in den phylogenetischen Stammbäumen. Es sind drei große Cluster in den Stammbäumen erkennbar: eines der SFV der Geschwänzten Altweltaffen (*Cercopithecoidea*) mit SFVmag und SFVagm, ein zweites der SFV der Menschenartigen (*Hominoidea*) mit SFVcpz / PFV und SFVora, deren Wirte ebenfalls zur Teilordnung der Altweltaffen zählen, und ein drittes, weit divergierendes Cluster mit SFVspm, dessen Wirt *Ateles* zur Teilordnung der Neuweltaffen zählt.







**Abb. 46:** Phylogenetische Stammbäume der SFV-Proteine Gag, Pol und Env, basierend auf Aminosäuresequenzen. Maximum-likelihood-Methode. Quartet-Puzzling-Algorithmus.

Der Wirt des SFVspm ist als Vertreter der Neuweltaffen evolutionär ebenfalls außerordentlich divergent zur Gruppe der Geschwänzten Altweltaffen (*Cercopithecoidea*) und Menschenartigen (*Hominoidea*). Dies ist in Abb. 6a (siehe Kapitel 1.3) graphisch dargestellt. Im phylogenetischen Stammbaum, der auf Sequenzvergleichen der mitochondrialen Cytochromoxidase II (CO II) basiert (Switzer, 2005), sind drei große Gruppen der Primaten zu erkennen: die Gruppe der Geschwänzten Altweltaffen mit dem Makaken und der Grünen Meerkatze, die Gruppe der Menschenartigen mit dem Schimpansen und dem Orangutan und schließlich als separate Gruppe der Klammeraffe als Vertreter

der Neuweltaffen. Die Stammbäume der Primaten-Foamyviren aus der Abb. 46 besitzen somit einen sehr ähnlichen Aufbau im Vergleich zum Stammbaum ihrer Wirte.

Switzer et al. interpretierten die große Ähnlichkeiten der Stammbäume von SFV und den Primaten als Indikator einer gemeinsamen Evolution. Allerdings war in ihren Betrachtungen das SFVspm nicht berücksichtigt, da die damals nur 425 bp umfassende bekannte Sequenz des SFVspm-*pol*-Gens für eine repräsentative Phylogenie nicht genügte. Mit der im Rahmen dieser Arbeit entschlüsselten vollständigen Genomsequenz von SFVspm können nun stammesgeschichtliche Betrachtungen zur Evolution der Foamyviren und ihrer Wirte erweitert und das SFVspm als Vertreter der Neuweltaffen-Foamyviren in die Analysen einbezogen werden. Die bemerkenswerte Ähnlichkeit der phylogenetischen Stammbäume aus Abb. 46 im Vergleich zum Stammbaum der Primaten aus Abb. 6a (Kapitel 1.3) bestärkt die Annahme von Switzer et al., dass Foamyviren sich gemeinsam mit ihren Wirten, sowohl Altwelt- als auch Neuweltaffen, entwickelt haben. Die Divergenz der Foamyviren kann anhand des phylogenetischen Baumes auf einen Zeitraum zurückgeführt werden, der der Auftrennung der Primaten gleichzusetzen ist.

Switzer et al. publizierten mithilfe von Berechnungen der Molecular Clock, die auf einem 425 bp großen Sequenzabschnitt des *pol*-Gens der SFV bzw. auf Sequenzen der CO II der Primaten basierten, Substitutionsraten der Foamyviren-Genome von  $1,7 \times 10^{-8}$  Substitutionen pro Site pro Jahr und der Primaten-Genome von  $1,16 \times 10^{-8}$  Substitutionen pro Site pro Jahr. Da diese Substitutionsraten in einer sehr ähnlichen Größenordnung lagen, bestärkten sie die Annahme einer gemeinsamen Evolution von Foamyviren und ihren Wirten. Ebenso zeigte sich, dass FV die niedrigsten Substitutionsraten unter RNA-Viren besitzen, sie ähneln mit einer Größenordnung von  $10^{-8}$  S/SY vielmehr jener der DNA-Viren (Switzer, 2005). Die niedrige Substitutionsrate ist Ausdruck der hohen genetischen Stabilität der Foamyviren. Diese kann wiederum auf die niedrige Replikationsrate zurückgeführt werden, was Untersuchungen zur Präzision der reversen Transkription in PFV bestätigten (Boyer, 2007; Gärtner, 2009). Die genannten Eigenschaften stellen Vorteile für virale Vektoren in der

Gentherapie dar und sollten bei einer Anwendung von foamyviralen Vektoren berücksichtigt werden.

Berechnungen zur Molecular Clock, die Sequenzen des SFVspm einbeziehen, könnten eine gemeinsame Evolution von Foamyvirus und Wirt nachdrücklich bestätigen und wertvolle Hinweise zur foamyviralen Anwendung im Bereich der Gentherapie aufzeigen. Analysen zur Molecular Clock wurden jedoch in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Da diese sehr komplex sind, sollten sie in einem Bioinformatik-Zentrum erfolgen.

Foamyviren sind interessante Marker in der Evolution ihrer Wirte und ihrer selbst. In der vorliegenden Arbeit konnte das SFVspm aufgrund von Sequenz-Homologien und aufgrund von Primaten-spezifischen Motiven im Gag-Protein, wie GR-Boxen (Schliephake und Rethwilm, 1994) und PSAP-Motive (Stange, 2005), den Primaten-Foamyviren zugeordnet werden. Phylogenetische Analysen zeigten eine bemerkenswerte Divergenz der Neuweltaffen-Foamyviren gegenüber den bekannten Altweltaffen-Foamyviren, und ebenso bekräftigten sie die Ko-Evolution von FV und Wirt. Da die Sequenz des stammesgeschichtlichen Vorfahrens des FV des Galagos (SFVgal) nicht bekannt ist, kann eine alternative Möglichkeit der Evolution, wie zum Beispiel eine Deletion spezifischer Elemente im Gag-Protein eines Vorläufer-FV in der Entwicklung der Nichtprimaten-FV nicht ausgeschlossen werden. Ein Vergleich der Substitutionsraten des SFVspm und des Neuweltaffen *Ateles* kann in Bezug auf stammesgeschichtliche Untersuchungen, sowohl der Foamyviren, als auch der Primaten, weitere vielversprechende Resultate liefern.

## 4.2 Diagnostischer Test einer SFV-Infektion in Neuweltaffen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Abschnitt von *gag* als Protein bzw. Antigen exprimiert und ein Antikörper in Kaninchen-Serum generiert. Anschließend wurde ein auf Western Blot basierender diagnostischer Test zum Nachweis einer Immunität gegen SFVspm entwickelt. Dieser zeigte die erwartete Spezifität für SFVspm und eine gute Sensitivität für SFVspm-Gag Antigen bzw. Anti-SFVspm-Gag. Die auf Western Blot basierte Methodik wurde schließlich in Kombination mit einer PCR zum Nachweis einer Infektion mit Neuweltaffen-Foamyvirus in *Callithrix spp.* angewandt. Es wurden Seren und DNA zwölf verschiedener *Callithrix*-Affen untersucht.

Das auf Western Blot basierte System erwies sich als spezifisch und sensitiv mit einem Antigen-Nachweis von mindestens 15 ng. Der primäre Antikörper Anti-SFVspm-Gag wurde als Kaninchen-Serum immunisierter Tiere in einer Konzentration von 1:10000 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper kam entweder Kaninchen-Antikörper oder Protein G in einer Konzentration von jeweils 1:5000 zur Anwendung. In beiden Fällen konnte SFVspm-Antigen zuverlässig und reproduzierbar detektiert werden. SFVspm spezifische DNA konnte mittels PCR mit einer hohen Sensitivität nachgewiesen werden. Aus 300 ng DNA infizierter Zellen bzw. 2 pg DNA einer Plasmidpräparation der SFVspm-Integrase wurde reproduzierbar ein 415 bp großes Stück der Integrase von SFVspm amplifiziert. Insbesondere die Kombination von Western Blot und PCR stellt ein aussagekräftiges System zum Nachweis einer Infektion mit SFVspm dar (Schweizer, 1995; Winkler, 1998; Khan, 1999; Hussain, 2003). Antigen der Wahl war, wie bereits in Studien zum Nachweis einer Foamyvirus-Infektion in Primaten und Katzen beschrieben worden war (Winkler, 1997; Alke, 2000; Hussain, 2003; Romen, 2006), das Gag-Protein bzw. ein Abschnitt dessen.

Anschließend wurden beide Systeme zum Nachweis einer Infektion mit Neuweltaffen-FV in *Callithrix* eingesetzt. Bisher standen nur Methoden zur Verfügung, die mit Antikörpern oder Oligonukleotiden von Altweltaffen-Foamyviren arbeiteten (Hussain, 2003). In dieser Arbeit wurden Systeme zum

Nachweis von DNA bzw. Antikörpern gegen Neuweltaffen-Foamyviren entwickelt. Sie setzen jedoch eine Kreuzreagibilität mit SFVspm innerhalb der Neuweltaffen-Foamyviren voraus, da die Methoden aus der Sequenz des SFVspm abgeleitet wurden. So wurden im PCR-Test SFVspm spezifische Integrase-Primer verwendet. Im Western Blot waren SFVspm-Gag primärer Antikörper und Protein G sekundärer Antikörper. Zum Test der Systeme standen DNA aus Lymphozyten sowie Seren zwölf verschiedener *Callithrix*-Affen zur Verfügung. Außerdem wurde DNA, die aus Gewebeproben der Milz, Leber und Mundschleimhaut eines *Callithrix*-Affen isoliert wurde, eingesetzt. Diese stammten jedoch aus nur einem Tier, was eine sehr geringe Probenanzahl darstellte. In den Abbildungen 44 und 45 sind die Ergebnisse der Tests dargestellt: In keinem Affen-Serum konnten Antikörper gegen Neuweltaffen-FV nachgewiesen werden. Ebenso waren alle DNA-Isolate negativ für Foamyvirus-DNA. Im Gegensatz dazu waren die Positivkontrollen positiv, was die Funktionsfähigkeit und Aussagekraft des jeweiligen Systems bestätigte.

Dennoch muss berücksichtigt werden, dass die gewählten Systeme in einigen Punkten Nachteile aufwiesen. So war, wie oben erwähnt, eine Kreuzreaktion der SFV-Antikörper der *Callithrix*-Affen mit SFVspm-Antigenen erforderlich. Eine Kreuzreaktion der Antikörper wurde erwartet, da in Studien zur Infektion von Altweltaffen wiederholt Nachweismethoden auf Kreuzreaktionen innerhalb der Altweltaffen-Foamyviren beruhten und diese zuverlässig eine Infektion bzw. Immunität gegen Foamyviren aufdeckten (Schweizer, 1995). Eine Detektion von Antikörpern ist im Vergleich zur Detektion von foamyviraler DNA wahrscheinlicher, da eine Infektion mit FV persistierend ist und sich durch vorhandene Antikörper-Titer im Serum manifestiert (Meiering und Linial, 2001). Der Nachweis von DNA setzt jedoch eine DNA-Isolation aus den foamyviralen Zielzellen bzw. eine aktuelle Replikation des Virus voraus, da nur in diesen Fällen eine ausreichend hohe DNA-Konzentration im Isolat erreicht wird. Die Zielzellen der FV sind noch nicht bekannt. Lymphozyten enthalten bei stattgefundenener Infektion die größten Mengen an FV (von Laer, 1996). Mundschleimhaut assoziierte Gewebe enthalten FV-RNA, was auf den Ort der

Replikation deutet (Falcone, 1999). Die in dieser Arbeit verwendete DNA stammte entweder aus der Mundschleimhaut, aus Lymphozyten oder Lymphozyten reichem Gewebe, wie Milz und Leber. Es wurden somit Gewebeproben ausgewählt, die eine Isolation von foamyviraler DNA bei stattgefundenener Infektion wahrscheinlich machten. Auch die Wahl der kreuzreagierenden Primer wurde nicht als limitierend betrachtet, da in Studien sogar mithilfe von Oligonukleotiden, die von der Integrase der Altweltaffen-FV abgeleitet worden waren, FV aus Neuweltaffen amplifiziert werden konnte (Schweizer und Neumann-Haefelin, 1995).

Größter limitierender Faktor im vorliegenden Test war die geringe Anzahl an Tieren, die für den diagnostischen Nachweis zur Verfügung standen. Eine größere Zahl an Affen, die zudem Tiere aus verschiedenen Populationen umfasst, ist für einen repräsentativen Test notwendig. Da die Prävalenz der Foamyvirus-Infektion in Altweltaffen im Allgemeinen sehr hoch ist (siehe Tabelle 2, Kapitel 1.1), ist eine vergleichbare Prävalenz auch für Neuweltaffen zu erwarten. Grundsätzlich sollten jedoch Seren und Gewebeproben von Klammeraffen (*Ateles*) zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit der Testsysteme verwendet werden. Die Problematik der vorausgesetzten Kreuzreagibilität beim Nachweis einer foamyviralen Infektion des *Callithrix*-Affen kann schließlich nur durch die Entwicklung eines für SFVmar (Foamyvirus des *Callithrix*) spezifischen Testsystems ausgeschlossen werden. Dazu sind analog zur vorliegenden Arbeit die Klonierung und Sequenzierung des SFVmar, sowie die Expression eines SFVmar spezifischen Antigens und die Generierung eines SFVmar-Antikörpers notwendig.

Weiterführend sollten die Nachweismethoden erweitert werden, zum Beispiel durch Virusisolation aus Zellkulturen oder durch eine auf Immunfluoreszenz basierende Methodik. Eine Weiterentwicklung des Systems zur Detektion von foamyviralen Antikörpern, insbesondere die Entwicklung eines Enzyme-linked ImmunoSorbent Assays (ELISA) kann die Verwendung und Untersuchung vieler verschiedener Seren erleichtern. Dieser kann auch zum Screening von menschlichen Seren herangezogen werden, um eine Infektion mit

Neuweltaffen-FV detektieren zu können. Bisher war kein diagnostischer Test, der spezifisch für Neuweltaffen-FV reagierte, verfügbar. Aufgrund der verheerenden Zunahme von Primatenjagd, Tierhaltung und Verzehr von Primatenfleisch und somit der Gefahr einer potentiellen Zoonose mit SFV sollten zuverlässige Möglichkeiten zur Surveillance einer foamyviralen Infektion des Menschen zur Verfügung stehen. In Anlehnung an die Evolution der HIV-Pandemie, die ihren Ursprung in einer Transmission von SIV des Primaten auf den Menschen hatte, sind foamyvirale Infektionen des Menschen als Auslöser neuer Pandemien nicht zu verachten.

Das in dieser Arbeit publizierte Wissen über die Sequenz des Neuweltaffen-Foamyvirus SFVspm, sowie die Strategie der Klonierung kann für eine erfolgreiche Entschlüsselung des Genoms weiterer Neuweltaffen-FV, sowie für die Weiterentwicklung spezifischer diagnostischer Nachweismethoden für Infektionen mit Neuweltaffen-Foamyviren wertvolle Hinweise geben.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die komplette Nukleotidsequenz des Neuweltaffen-Foamyvirus des Klammeraffens (SFVspm) entschlüsselt und molekular charakterisiert. DNA wurde aus SFVspm infizierten Zellen isoliert. Ausgehend von einem 425 bp langen bekannten Abschnitt des Integrase-Gens wurde das foamyvirale Genom mithilfe der Polymerasekettenreaktion in fünf Abschnitten amplifiziert. Die Primer wurden anhand konservierter Sequenzen im SFV-Genom generiert. Die Genomabschnitte des 5'-Endes bis zum Integrase-Gen von SFVspm wurden in Plasmidvektoren kloniert und anschließend sequenziert, die Genomabschnitte vom Integrase-Gen zum 3'-Ende wurden direkt nach der PCR-Amplifikation sequenziert. Die Sequenzen der einzelnen SFVspm-Fragmente wurden zu einem zusammenhängenden Genom zusammengesetzt, wobei die Consensus-Sequenz aus mindestens drei unabhängigen Sequenzierungen pro Nukleotid ermittelt wurde. Anhand von Homologie-Vergleichen konnte das SFVspm mit einer Größe von 12212 bp als komplexes Retrovirus der Unterfamilie der *Spumaretrovirinae* identifiziert werden. Es besitzt alle konservierten Protein-Domänen, die charakteristisch für Primaten-Foamyviren sind. SFVspm stellt somit das erste vollständig sequenzierte und molekulargenetisch charakterisierte Neuweltaffen-FV dar.

Da Foamyviren aufgrund ihrer genetischen Stabilität interessante Marker für phylogenetische Untersuchungen sind, wurden anhand der Kenntnis der Genomsequenz von SFVspm und fünf Altweltaffen-FV phylogenetische Stammbäume basierend auf Nukleotid- und Aminosäuresequenzen und der Maximum-Likelihood-Methode gezeichnet und SFVspm evolutionär eingeordnet. SFVspm zeigte sich als das evolutionär divergenteste Foamyvirus aus der Teilordnung der Primaten-Foamyviren. Dies spiegelt die phylogenetische Auftrennung ihrer Wirte, der Altweltaffen und Neuweltaffen, wider und bekräftigt eine gemeinsame Evolution von Foamyviren und ihren Wirten.



Zur Entwicklung eines diagnostischen Tests zum Nachweis einer SFVspm-Infektion wurde ein 765 bp langer Abschnitt des *gag*-Gens als Antigen exprimiert und ein Antikörper im Kaninchen-Serum generiert. In einem Western Blot zeigte sich für eine Detektion von SFVspm-Gag-Antigen bzw. Anti-SFVspm-Gag eine sichere Spezifität und eine gute Sensitivität. Die auf Western Blot basierte Methodik wurde schließlich in Kombination mit einer PCR des Integrase-Gens zum Nachweis einer Infektion mit Neuweltaffen-Foamyvirus in *Callithrix spp.* angewandt. Es wurden Seren und Lymphozyten-DNA zwölf verschiedener *Callithrix*-Affen, sowie Gewebeproben aus Milz, Leber und Mundschleimhaut untersucht, wobei in keinem Tier eine SFV-Infektion nachgewiesen werden konnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achong, B.G. u. a., 1971. An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 46, 299-307.
- Ali, M. u. a., 1996. No evidence of antibody to human foamy virus in widespread human populations. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12, 1473-83.
- Alke, A. u. a., 2000. Characterization of the humoral immune response and virus replication in cats experimentally infected with feline foamy virus. *Virology*, 275, 170-6.
- Allan, J.S. u. a., 1998. Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14, 821-4.
- An, D.G., Hyun, U. & Shin, C., 2008. Characterization of nuclear localization signals of the prototype foamy virus integrase. *The Journal of General Virology*, 89, 1680-4.
- Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226, 1209-11.
- Bansal, A. u. a., 2000. Characterization of the R572T point mutant of a putative cleavage site in human foamy virus Env. *Journal of Virology*, 74, 2949-54.
- Barré-Sinoussi, F. u. a., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*, 220, 868-71.
- Bauer, T.R. u. a., 2008b. Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors. *Nature Medicine*, 14, 93-7.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-23.
- Boneva, R.S. u. a., 2007. Clinical and virological characterization of persistent human infection with simian foamy viruses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23, 1330-7.
- Boyer, P.L. u. a., 2004. Characterization of the polymerase and RNase H activities of human foamy virus reverse transcriptase. *Journal of Virology*, 78, 6112-21.

- Boyer, P.L. u. a., 2007. In vitro fidelity of the prototype primate foamy virus (PFV) RT compared to HIV-1 RT. *Virology*, 367, 253-64.
- Brendel, V., Xing, L. & Zhu, W., 2004. Gene structure prediction from consensus spliced alignment of multiple ESTs matching the same genomic locus. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20, 1157-69.
- Brooks, J.I. u. a., 2007. Characterization of blood-borne transmission of simian foamy virus. *Transfusion*, 47, 162-70.
- Brooks, J.I. u. a., 2002. Cross-species retroviral transmission from macaques to human beings. *Lancet*, 360, 387-8.
- Cain, D. u. a., 2001. Palindromic sequence plays a critical role in human foamy virus dimerization. *Journal of Virology*, 75, 3731-9.
- Calattini, S. u. a., 2007. Simian foamy virus transmission from apes to humans, rural Cameroon. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1314-20.
- Care for the wild, 2007. Going to the pot - The Neotropical Bushmeat Crisis and its Impact on Primate Populations. URL: <http://www.careforthewild.com>
- Cartellieri, M., Herchenröder, O. u. a., 2005. N-terminal Gag domain required for foamy virus particle assembly and export. *Journal of Virology*, 79, 12464-76.
- Cartellieri, M., Rudolph, W. u. a., 2005. Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology*, 2, 44.
- Cavazzana-Calvo, M. & Fischer, A., 2007. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 1456-65.
- Charleston, M.A. & Robertson, D.L., 2002. Preferential host switching by primate lentiviruses can account for phylogenetic similarity with the primate phylogeny. *Systematic Biology*, 51, 528-35.
- Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E., 1997: Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.*; ISBN 0-87969-497-1, online zugänglich bei NCBI Bookshelf
- Delelis, O., Saïb, A. & Sonigo, P., 2003. Biphasic DNA synthesis in spumaviruses. *Journal of Virology*, 77, 8141-6.
- Eastman, S.W. & Linial, M.L., 2001. Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly. *Journal of Virology*, 75, 6857-64.

- Enders, J.F. & Peebles, T.C., 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 86, 277-86.
- Enssle, J. u. a., 1999. An active foamy virus integrase is required for virus replication. *The Journal of General Virology*, 80, 1445-52.
- Erlwein, O. u. a., 1997. Identification of sites that act together to direct dimerization of human foamy virus RNA in vitro. *Virology*, 229, 251-8.
- Falcone, V. u. a., 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. & Neumann-Haefelin, D., 2003. Replication of primate foamy viruses in natural and experimental hosts. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 161-80.
- Falcone, V. u. a., 1999. Gamma interferon is a major suppressive factor produced by activated human peripheral blood lymphocytes that is able to inhibit foamy virus-induced cytopathic effects. *Journal of Virology*, 73, 1724-8.
- Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M., 2008. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet*, 371, 2044-7.
- Fischer, N. u. a., 1998. Foamy virus particle formation. *Journal of Virology*, 72, 1610-5.
- Flügel, R.M. & Pfrepper, K.I., 2003. Proteolytic processing of foamy virus Gag and Pol proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 63-88.
- Gärtner, K., 2009. Accurate estimation of foamy virus genome copying. *In press*.
- Gene Therapy clinical trials worldwide, 2008. *The Journal of Gene Medicine Clinical Trial Site*. URL: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
- Glazko, G.V. & Nei, M., 2003. Estimation of divergence times for major lineages of primate species. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 424-34.
- Goepfert, P.A. u. a., 1997. A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 71, 778-84.
- Guinn, B.A. & Mulherkar, R., 2008. International progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 15, 765-75.

- Hacein-Bey-Abina, S. u. a., 2003. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415-419.
- Hahn, H. u. a., 1994. Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins. *The Journal of General Virology*, 75, 2635-44.
- Heinkelein, M. u. a., 2005. Experimental therapy of allogeneic solid tumors induced in athymic mice with suicide gene-transducing replication-competent foamy virus vectors. *Cancer Gene Therapy*, 12, 947-53.
- Heinkelein, M. u. a., 2002. Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *Journal of Virology*, 76, 10069-73.
- Heinkelein, M. u. a., 2003. Retrotransposition and cell-to-cell transfer of foamy viruses. *Journal of Virology*, 77, 11855-8.
- Heneine, W. u. a., 2003. Human infection with foamy viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 181-96.
- Heneine, W. u. a., 1998. Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nature Medicine*, 4, 403-7.
- Herchenröder, O. u. a., 1994. Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology*, 201, 187-99.
- Hill, C.L., Bieniasz, P.D. & McClure, M.O., 1999. Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *The Journal of General Virology*, 80, 2003-9.
- Holmes, E.C., 2003. Molecular clocks and the puzzle of RNA virus origins. *Journal of Virology*, 77, 3893-7.
- Holmes, R.K., Malim, M.H. & Bishop, K.N., 2007. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 118-28.
- Hooks, J.J. & Gibbs, C.J., 1975. The foamy viruses. *Bacteriological Reviews*, 39, 169-85.
- Hooks, J.J. u. a., 1973. Isolation of a new simian foamy virus from a spider monkey brain culture. *Infection and Immunity*, 8, 804-13.
- Houle, A., 1999. The origin of platyrrhines: An evaluation of the Antarctic scenario and the floating island model. *American Journal of Physical Anthropology*, 109, 541-59.

- Huang, X. & Madan, A., 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9, 868-77.
- Hussain, A.I. u. a., 2003. Screening for simian foamy virus infection by using a combined antigen Western blot assay: evidence for a wide distribution among Old World primates and identification of four new divergent viruses. *Virology*, 309, 248-57.
- Huthoff, H. & Malim, M.H., 2005. Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology*, 334, 147-53.
- Josephson, N.C., Trobridge, G. & Russell, D.W., 2004. Transduction of long-term and mobilized peripheral blood-derived NOD/SCID repopulating cells by foamy virus vectors. *Human Gene Therapy*, 15, 87-92.
- Josephson, N.C. u. a., 2002. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8295-300.
- Juretzek, T. u. a., 2004. Foamy virus integration. *Journal of Virology*, 78, 2472-7.
- Kang, Y., Blair, W.S. & 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. *Journal of Virology*, 72, 504-11.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7, 33-40.
- Khan, A.S. u. a., 1999. Sensitive assays for isolation and detection of simian foamy retroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2678-86.
- Khan, A.S. & Kumar, D., 2006. Simian foamy virus infection by whole-blood transfer in rhesus macaques: potential for transfusion transmission in humans. *Transfusion*, 46, 1352-9.
- Kiem, H. u. a., 2007. Foamy-virus-mediated gene transfer to canine repopulating cells. *Blood*, 109, 65-70.
- Knudsen, S., 1999. Promoter2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15, 356-61.
- Kögel, D., Aboud, M. & Flügel, R.M., 1995. Molecular biological characterization of the human foamy virus reverse transcriptase and ribonuclease H domains. *Virology*, 213, 97-108.

- von Laer, D. u. a., 1996. Lymphocytes are the major reservoir for foamy viruses in peripheral blood. *Virology*, 221, 240-4.
- Lehmann-Che, J. u. a., 2005. Protease-dependent uncoating of a complex retrovirus. *Journal of Virology*, 79, 9244-53.
- Leurs, C. u. a., 2003. Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Human Gene Therapy*, 14, 509-19.
- Lindemann, D. & Goepfert, P.A., 2003. The foamy virus envelope glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 111-29.
- Lindemann, D. u. a., 2001. A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *Journal of Virology*, 75, 5762-71.
- Lindemann, D. & Rethwilm, A., 1998. Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *Journal of Virology*, 72, 4088-94.
- Linial, M., 2000. Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends in Microbiology*, 8, 284-9.
- Linial, M.L., 1999. Foamy viruses are unconventional retroviruses. *Journal of Virology*, 73, 1747-55.
- Linial, M.L. & Eastman, S.W., 2003. Particle assembly and genome packaging. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 89-110.
- Löchelt, M., 2003. Foamy virus transactivation and gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 27-61.
- Löchelt, M., Muranyi, W. & Flügel, R.M., 1993. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7317-21.
- Löchelt, M. u. a., 1995. The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity. *Virology*, 206, 601-10.
- Löchelt, M. u. a., 2005. The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7982-7.

- Mannigel, I. u. a., 2007. Correct capsid assembly mediated by a conserved YXXLGL motif in prototype foamy virus Gag is essential for infectivity and reverse transcription of the viral genome. *Journal of Virology*, 81, 3317-26.
- Meiering, C.D. & Linial, M.L., 2001. Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 165-76.
- Meiering, C.D. & Linial, M.L., 2002. Reactivation of a complex retrovirus is controlled by a molecular switch and is inhibited by a viral protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15130-5.
- Mergia, A. & Heinkelein, M., 2003. Foamy virus vectors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 131-59.
- Mergia, A., Leung, N.J. & Blackwell, J., 1996. Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *Journal of Medical Primatology*, 25, 2-7.
- Moebes, A. u. a., 1997. Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *Journal of Virology*, 71, 7305-11.
- Murray, S.M. & Linial, M.L., 2006. Foamy virus infection in primates. *Journal of Medical Primatology*, 35, 225-35.
- Murray, S.M. u. a., 2006. Expanded tissue targets for foamy virus replication with simian immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Journal of Virology*, 80, 663-70.
- Murray, S.M. u. a., 2008. Replication in a superficial epithelial cell niche explains the lack of pathogenicity of primate foamy virus infections. *Journal of Virology*, 82, 5981-5.
- Netzer, K.O. u. a., 1993. Identification of pol-related gene products of human foamy virus. *Virology*, 192, 336-8.
- Page, R.D., 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 12, 357-8.
- Pahl, A. & Flügel, R.M., 1995. Characterization of the human spuma retrovirus integrase by site-directed mutagenesis, by complementation analysis, and by swapping the zinc finger domain of HIV-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 2957-66.
- Perkovic, M. u. a., 2009. Species-specific Inhibition of APOBEC3C by the Prototype Foamy Virus Protein Bet. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 5819-26.



- Peters, K. u. a., 2008. Complex effects of foamy virus central purine-rich regions on viral replication. *Virology*, 373, 51-60.
- Peters, K., 2006. Mechanismus der Polymerase-Inkorporation in foamyvirale Partikel.  
URL: <http://www.opus-bayern.de/uni-wuerzburg/volltexte/2006/1769/>
- Peters, K. u. a., 2005. RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *Journal of Virology*, 79, 7005-13.
- Petit, C. u. a., 2003. Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *Journal of Cell Science*, 116, 3433-42.
- Pfrepper, K.I. u. a., 1999. Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus. *Journal of Virology*, 73, 7907-11.
- Picard-Maureau, M. u. a., 2003. Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *Journal of Virology*, 77, 4722-30.
- Pietschmann, T. u. a., 2000. An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *Journal of Virology*, 74, 4474-82.
- Poiesz, B.J. u. a., 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 7415-9.
- Rethwilm, A., 1995. Regulation of foamy virus gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 193, 1-24.
- Rethwilm, A., 2003. The replication strategy of foamy viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 1-26.
- Rethwilm, A. u. a., 1987. Molecular cloning of the genome of human spumaretrovirus. *Gene*, 59, 19-28.
- Rethwilm, A., 2007. Foamy virus vectors: an awaited alternative to gammaretro- and lentiviral vectors. *Current Gene Therapy*, 7, 261-71.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A., 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics: TIG*, 16, 276-7.

- Rinke, C.S. u. a., 2002. Mutation of the catalytic domain of the foamy virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity. *Journal of Virology*, 76, 7560-70.
- Romen, F. u. a., 2006. Antibodies against Gag are diagnostic markers for feline foamy virus infections while Env and Bet reactivity is undetectable in a substantial fraction of infected cats. *Virology*, 345, 502-8.
- Rothenaigner, I. u. a., 2008. Transduction of human neural progenitor cells with foamy virus vectors for differentiation-dependent gene expression. *Gene Therapy*.
- Rous, P., 1983. Landmark article. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. By Peyton Rous. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 250, 1445-9.
- Russell, D.W. & Miller, A.D., 1996. Foamy virus vectors. *Journal of Virology*, 70, 217-22.
- Russell, R.A. u. a., 2005. Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *Journal of Virology*, 79, 8724-31.
- Saïb, A., 2003. Non-primate foamy viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 277, 197-211.
- Salemi, M. u. a., 2003. Mosaic genomes of the six major primate lentivirus lineages revealed by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*, 77, 7202-13.
- Sandstrom, P.A. u. a., 2000. Simian foamy virus infection among zoo keepers. *Lancet*, 355, 551-2.
- Schliephake, A.W. & Rethwilm, A., 1994. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *Journal of Virology*, 68, 4946-54.
- Schmidt, H.A. u. a., 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18, 502-4.
- Schmidt, M. & Rethwilm, A., 1995. Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology*, 210, 167-78.
- Schrage, C.G. & Russo, C.A.M., 2003. Timing the origin of New World monkeys. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 1620-5.
- Schweizer, M. u. a., 1997. Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *Journal of Virology*, 71, 4821-4.

- Schweizer, M. & Neumann-Haefelin, D., 1995. Phylogenetic analysis of primate foamy viruses by comparison of pol sequences. *Virology*, 207, 577-82.
- Schweizer, M. u. a., 1999. Genetic stability of foamy viruses: long-term study in an African green monkey population. *Journal of Virology*, 73, 9256-65.
- Schweizer, M. u. a., 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 Research and Human Retroviruses*, 11, 161-70.
- Si, Y. u. a., 2008. Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of Fancc-/- stem cells. *Blood*, 112, 4458-65.
- Stange, A. u. a., 2005. Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *Journal of Virology*, 79, 5466-76.
- Stanke, N. u. a., 2005. Ubiquitination of the prototype foamy virus envelope glycoprotein leader peptide regulates subviral particle release. *Journal of Virology*, 79, 15074-83.
- Stehelin, D. u. a., 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260, 170-3.
- Steiper, M.E. & Young, N.M., 2006. Primate molecular divergence dates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 384-94.
- Stenbak, C.R. & Linial, M.L., 2004. Role of the C terminus of foamy virus Gag in RNA packaging and Pol expression. *Journal of Virology*, 78, 9423-30.
- Summers, J. & Mason, W.S., 1982. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 29, 403-15.
- Swindell, S.R. & Plasterer, T.N., 1997. SEQMAN. Contig assembly. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 70, 75-89.
- Switzer, W.M. u. a., 2004. Frequent simian foamy virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *Journal of Virology*, 78, 2780-9.
- Switzer, W.M. u. a., 2005. Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. *Nature*, 434, 376-80.
- Temin, H.M. & Mizutani, S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-3.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-80.
- Thümer, L. u. a., 2007. The complete nucleotide sequence of a New World simian foamy virus. *Virology*, 369(1), 191-7.
- Tobaly-Tapiero, J. u. a., 2001. Human foamy virus capsid formation requires an interaction domain in the N terminus of Gag. *Journal of Virology*, 75, 4367-75.
- Tobaly-Tapiero, J. u. a., 2000. Isolation and characterization of an equine foamy virus. *Journal of Virology*, 74, 4064-73.
- UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic, 2008.
- Vassilopoulos, G. & Rethwilm, A., 2008. The usefulness of a perfect parasite. *Gene Therapy*, 15, 1299-1301.
- Verma, I.M. & Weitzman, M.D., 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 711-38.
- Wang, G. & Mulligan, M.J., 1999. Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of foamy viruses. *The Journal of General Virology*, 80, 245-54.
- Wilk, T. u. a., 2001. Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *Journal of Virology*, 75, 7995-8007.
- Williams, D.A., 2008. Foamy virus vectors come of age. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16, 635-6.
- Winkler, I.G. u. a., 1998. Detection and molecular characterisation of feline foamy virus serotypes in naturally infected cats. *Virology*, 247, 144-51.
- Winkler, I.G. u. a., 1997. A rapid streptavidin-capture ELISA specific for the detection of antibodies to feline foamy virus. *Journal of Immunological Methods*, 207, 69-77.
- Wolfe, N.D. u. a., 2004. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet*, 363, 932-7.
- Woods, N. u. a., 2006. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature*, 440, 1123.

- Young, L.S. u. a., 2006. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *The Journal of Pathology*, 208, 299-318.
- Yu, S.F., Baldwin, D.N. u. a., 1996a. Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271, 1579-82.
- Yu, S.F., Edelman, K. u. a., 1996b. The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *Journal of Virology*, 70, 8255-62.
- Yu, S.F., Sullivan, M.D. & Linial, M.L., 1999. Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *Journal of Virology*, 73, 1565-72.
- Yu, S.F., Eastman, S.W. & Linial, M.L., 2006. Foamy virus capsid assembly occurs at a pericentriolar region through a cytoplasmic targeting/retention signal in Gag. *Traffic*, 7, 966

## DANKSAGUNG

---

Mein Dank gilt allen voran meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Axel Rethwilm des Lehrstuhls für Virologie der Universität Würzburg für die Betreuung und Erstkorrektur meiner Promotionsarbeit und für seinen Enthusiasmus für das Forschungsgebiet der Foamyviren.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Detlev Schindler des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg für die Übernahme der Zweitkorrektur als Koreferent.

Ich möchte einen großen Dank meinem Betreuer Dr. rer. nat. Jochen Bodem aussprechen, der mit seinen wissenschaftlichen Erfahrungen in der Molekularbiologie zum Gelingen dieser Arbeit ganz entscheidend beigetragen hat.

Dr. med. Benedikt Weißbrich danke ich für die Hilfe beim Erstellen und Auswerten der zahlreichen Sequenzierungen und den Mitarbeitern der Virusdiagnostik für die Bereitstellung der humanen Fibroblasten. Mein Dank gilt auch den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Helmut Hanenberg der Universität Düsseldorf und Prof. Dr. med. Peter Horn der Universität Duisburg-Essen, die freundlicherweise die Serum- und Gewebeproben der Primaten zur Verfügung stellten.

In diesem Rahmen möchte ich auch allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden der AG Rethwilm danken, die mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Hervorheben möchte ich Dr. phil. nat. Marc Kirschner für seine Unterstützung bei der Antigen-Gewinnung und Richard Gabriel für die große Hilfe bei der Proteinexpression, sowie Anna Kaczerowsky, Matthias Rammling, Katrin Peters und Heike Wagner für den persönlichen und fachlichen Erfahrungsaustausch.

Nicht zuletzt danke ich sehr herzlich meinen Freunden und ganz besonders meiner Familie, die mich bei meinen Vorhaben immer unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.