

1. EINLEITUNG	1
1.1. Retroviren	1
1.1.1. Aufbau und Genexpression.....	2
1.1.2. Replikation.....	5
1.1.3. Morphogenese.....	7
1.2. Foamyviren	10
1.2.1. Genexpression und Genprodukte.....	11
1.2.2. Das HFV Hüllprotein.....	14
1.2.3. Besonderheiten der foamyviralen Replikation	16
1.3. Fragestellung.....	19
2. MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1. Material	20
2.1.1. Geräte und Materialien.....	20
2.1.2. Chemikalien.....	21
2.1.3. Enzyme und Kits.....	21
2.1.4. Radiochemikalien.....	22
2.1.5. Protease Inhibitoren	22
2.1.6. Antiseren und andere Nachweisreagenzien	22
2.1.7. Antibiotika.....	23
2.1.8. Bakterienstämme.....	23
2.1.9. Plasmide.....	24
2.1.10. Lösungen	24
2.1.10.1. Bakterienkultur	24
2.1.10.2. Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA	25
2.1.10.3. DNA Transfektion	27
2.1.10.4. Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	28
2.1.10.5. Zellkultur.....	30
2.1.10.6. Standardlösungen und Puffer.....	33
2.2. Methoden.....	35

2.2.1. Analyse und Klonierung von DNA	35
2.2.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	35
2.2.1.2. Transformation	35
2.2.1.3. Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien (Mini-bzw. Midi-Präparation).....	36
2.2.1.4. Isolierung von DNA aus Säugerzellen mit dem Qiamp-Tissue Kit.....	37
2.2.1.5. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.2.1.6. Sequenzierung von Plasmid DNA mit AmpliTaqFS.....	38
2.2.1.7. Sequenzierung von PCR Produkten.....	39
2.2.1.8. Restriktionsverdau	39
2.2.1.9. Agarose Gelelektrophorese	39
2.2.1.10. Präzipitation von DNA.....	40
2.2.1.11. Extraktion von DNA mit Phenol bzw. Chloroform	40
2.2.1.12. Dephosphorylierung von DNA mit CIAP.....	41
2.2.1.13. Auffüllen von überhängenden 5' Enden mit dem Klenow Enzym.....	41
2.2.1.14. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	41
2.2.1.15. Elution von DNA Fragmenten mit dem GeneClean Kit	42
2.2.1.16. Elution von DNA Fragmenten mit dem MERmaid Kit.....	43
2.2.1.17. Ligation linearer DNA Fragmente mit T4 Ligase.....	43
2.2.2. Proteinexpression und Analyse in eukaryotischen Zellen	43
2.2.2.1. CaPO ₄ Transfektion.....	43
2.2.2.2. Herstellung von Zellysaten.....	45
2.2.2.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	46
2.2.2.4. Western Blot.....	47
2.2.2.5. Radioimmunopräzipitation (RIPA).....	48
2.2.2.6. Viruspartikelpräparation aus Zellkulturüberständen	49
2.2.2.7. „Pulse-Chase“ Analyse.....	50
2.2.2.8. EndoH Verdau von Proteinen	51
2.2.2.9. Biotinylierung von Membranproteinen.....	52
2.2.3. Zellkultur.....	53
2.2.3.1. Kultivierung von Säugerzellen.....	53
2.2.3.2. Generierung viraler Überstände zur Transduktion von Zielzellen.....	54
2.2.3.3. Subklonierung eukaryotischer Zellen durch „limiting dilution“.....	55
2.2.3.4. Generierung rekombinanter HFV Überstände	56
2.2.3.5. Titrierung von HF-Virusüberständen.....	58
2.2.3.6. Bestimmung von Infektionseffizienzen nach Transfektion von HFV Vektoren.....	59
2.2.3.7. Fusionsassay.....	59
3. ERGEBNISSE	61
3.1. Rolle des HFV Hüllproteins bei der Viruspartikelfreisetzung.....	61

3.1.1. Analyse der Pseudotypisierbarkeit von HFV Kapsiden.....	61
3.1.1.1. Expressionskonstrukte für heterologe und chimäre Hüllproteine.....	61
3.1.1.2. Zelluläre Expression chimärer und heterologer Hüllproteine.....	65
3.1.1.3. Relative Transduktionseffizienz chimärer und heterologer Hüllproteine	66
3.1.1.4. Analyse der Partikelfreisetzung mit chimäreren und heterologen Hüllproteinen.....	67
3.1.2. Bedeutung C-terminaler Bereiche von HFV Env für die Partikelfreisetzung ..	69
3.1.2.1. Expressionskonstrukte für HFV Env-Deletionsmutanten	69
3.1.2.2. Zelluläre Expression der HFV Env-Deletionsmutanten	70
3.1.2.3. Relative Transduktionseffizienz der HFV Env-Deletionsmutanten.....	71
3.1.2.4. Analyse der Partikelfreisetzung mit HFV Env-Deletionsmutanten.....	72
3.1.2.5. Expressionskonstrukte für heterolog membranverankerte HFV Hüllproteine.....	73
3.1.2.6. Zelluläre Expression heterolog verankerter HFV Hüllproteine	74
3.1.2.7. Relative Transduktionseffizienz heterolog verankerter HFV Hüllproteine.....	75
3.1.2.8. Analyse der Partikelfreisetzung mit heterolog verankerten HFV Hüllproteinen.....	76
3.1.3. Rolle konservierter Aminosäuren innerhalb der MSD von HFV Env bei der Partikelfreisetzung.....	76
3.1.3.1. Expressionskonstrukte von HFV Env-MSD-Punktmutanten.....	77
3.1.3.2. Analyse der Partikelfreisetzung mit HFV Env-MSD-Punktmutanten	79
3.1.3.3. Relative Transduktionseffizienz der HFV Env-MSD-Punktmutanten	81
3.1.4. Stabilität ausgewählter HFV Hüllproteinmutanten.....	82
3.1.5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Partikelmorphogenese.....	84
3.2. Einfluß C-terminaler Mutationen auf Fusionsaktivität und Transport von HFV Env.....	88
3.2.1. Einfluß von Mutationen in der HFV Env-MSD auf die Fusionsaktivität.....	88
3.2.1.1. Assay zur Bestimmung der Fusionsaktivität von HFV Hüllproteinen.....	88
3.2.1.2. Quantifizierung der Fusionsaktivität verschiedener MSD-Mutanten und Deletionsmutanten.....	90
3.2.2. Auswirkungen von Mutationen auf den Transport von HFV Env	92
3.2.2.1. Analyse der Oberflächenexpression verschiedener HFV Hüllproteinmutanten.....	92
3.2.3. Einfluß der Koexpression von HFV-Gag/Pol auf die Fusionsaktivität	96
3.2.3.1. Quantifizierung der Fusionsaktivität verschiedener HFV Env-Mutanten mit und ohne Gag/Pol	96
4. DISKUSSION	98
4.1. Rolle des HFV Hüllproteins bei der Viruspartikelfreisetzung.....	100
4.2. Fusionsaktivität des HFV Hüllproteins	105

5. LITERATURVERZEICHNIS	111
6. ANHANG	118
6.1. Zusammenfassung	118
6.2. Summary	120
6.3. Abbildungsverzeichnis	122
6.4. Tabellenverzeichnis	123
6.5. Abkürzungsverzeichnis	124
6.6. Erklärungen	125
6.7. Lebenslauf	126
6.8. Publikationsliste	127