

Molekularbiologische Charakterisierung des felinen Foamyvirus (FFV)

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biol. Jacqueline Roy

geboren am 16. Januar 1975 in Osterburg

Gutachter:

Prof. Dr. Gerold Barth

Prof. Dr. Axel Rethwilm

Prof. Dr. Dieter Neumann-Haefelin

Eingereicht am:

Tag der Verteidigung:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät „Carl Gustav Carus“, Technische Universität Dresden, durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Axel Rethwilm, in dessen Labor und Arbeitsgruppe diese Dissertation angefertigt wurde. Ich danke ihm für die Bereitstellung des Themas, für die freundliche Unterstützung, die ich während der ganzen Zeit erfahren durfte sowie für seine stetige Diskussionsbereitschaft und Ermunterung.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Gerold Barth und Prof. Dr. Neumann-Haefelin für das Interesse an dieser Arbeit und für ihre Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Ottmar Herchenröder für die intensive Betreuung bei der Realisierung des Forschungsvorhabens. Er hat mich im Labor in jeder erdenklichen Weise optimal unterstützt und gefördert und mich während der ganzen Zeit freundschaftlich begleitet.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen in Dresden und Würzburg, vor allem bei Sylvia Kanzler, Thomas Juretzek, Martin Heinkelein, Dirk Lindemann, Marc Cartellieri, Wolfram Rudolph und Jacques Rohayem möchte ich mich für die fachliche Hilfe, die gute Stimmung, förderliche Ratschläge aber auch wohlmeinende Kritik bedanken.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich dafür, dass sie mich während der letzten Jahre immer hilfreich unterstützt haben.

Und Thomas, der mich während der ganzen Zeit begleitet, unterstützt und der mir geholfen hat, Tiefs und Frustrationsphasen zu überstehen und Hochs und Erfolge zu feiern.

Zusammenfassung

Die Einteilung der Retroviren erfolgt in die zwei Subfamilien Orthoretroviren und Spumaretroviren. Beide Subfamilien zeichnen sich durch den Aufbau ihres Genoms in Struktur- und akzessorische Gene, die im Provirus von langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTR) begrenzt werden, aus. Retroviren werden charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur reversen Transkription und die Integration des Genoms in die Wirtszell-DNA stellt einen obligaten Schritt der Virusreplikation dar. Die Foamyviren bilden das einzige Genus der Spumaretroviren und nehmen aufgrund verschiedener Merkmale in ihrer Replikationsstrategie eine besondere Stellung innerhalb der Retroviren ein. Zu diesen Merkmalen zählt z.B. die reverse Transkription zu einem späten Zeitpunkt der Replikation oder die Möglichkeit zur intrazellulären Retrotransposition. Allerdings waren diese Merkmale bislang nur für ein prototypisches Primatenfoamyvirus (PFV) gezeigt worden.

Innerhalb dieser Arbeit stand die molekularbiologische Charakterisierung des Felinen Foamyvirus (FFV) im Vordergrund. Obwohl bereits 1997 charakterisiert und sequenziert, war über die Replikationsstrategie dieses Vertreters noch relativ wenig bekannt. Zunächst wurden molekulare FFV-Klone konstruiert, die nach Transfektion in geeignete Zellkulturen zur Freisetzung infektiöser Viren führten. Im Vergleich dieser Klone zeigte sich, dass nur die Transfektion von Zellen mit pChatul-3 nicht aber mit den Vorläuferplasmiden, pChatul-1 und pChatul-2, zu einer sehr effizienten extrazellulären Virusproduktion führte. Als wahrscheinliche Ursache wurden Mutationen im Gen für das Glykoprotein (*env*) und in einem akzessorischen Gen (*bet*) ausgemacht.

Bei der Untersuchung der Pseudotypisierung, d.h. der Umhüllung von Viruskapsiden durch heterologe Glykoproteine, wurde die effiziente Freisetzung von infektiösen Viren nach Kotransfektion von Zellen mit Plasmiden für FFV-Kapsid und FFV- sowie zwei Hüllproteinen von Primatenfoamyviren (PFV und SFV-1) nachgewiesen. Demgegenüber sind Hüllproteine fremder Viren nicht zur Bildung infektiöser FFV-Kapside in der Lage. Im reziproken Experiment wurden von den untersuchten Foamyviren ausschliesslich die Kapside von FFV und SFV-1 durch das FFV-Hüllprotein pseudotypisiert. Überraschenderweise konnten durch Pseudotypisierungsexperimente mit FFV-Glykoprotein auch infektiöse Viren aus der Gruppe der Orthoretroviren, wie z.B. die Kapside von HIV-1- sowie von MuLV, erfolgreich gebildet werden. Da bislang galt, dass Foamyvirkapside im Unterschied zu denen von Orthoretroviren zur physikalischen Freisetzung der Koexpression eines Glykoproteins bedürfen, wurden entsprechende Experimente in An- bzw. Abwesenheit des homologen Hüllproteins durchgeführt.

Die ersten Untersuchungen weisen auf eine Freisetzung von FFV-Partikeln in Abwesenheit des Hüllproteins hin, ein bisher nicht bekanntes Merkmal der Foamyviren. Um den Einfluss des akzessorischen Proteins Bet auf die FFV-Virusreplikation zu testen, wurden Bet-Deletionen im proviralen Konstrukt pChatul-3 eingeführt. Die vom Bet-defizienten Klon produzierten Virionen konnten nur eine Runde im Replikationszyklus durchlaufen, was für eine essentielle Rolle im Lauf der Virusreplikation spricht.

Wie für PFV konnte auch für FFV gezeigt werden, dass die reverse Transkription spät im Replikationszyklus, also zu einem anderen Zeitpunkt als bei den Orthoretroviren abläuft. Allerdings ergaben sich keine Hinweise dafür, dass FFV zur intrazellulären Retrotransposition, wie sie für PFV beschrieben wurde, in der Lage ist. Das Verhältnis der Nukleinsäuren in extrazellulären Partikeln wurde unter Verwendung der quantitativen kompetitiven PCR sowie der *Real-Time* PCR bestimmt. Zwar handelt es sich beim funktionalen FFV-Genom um DNA, die auch mit Hilfe von Southern Blot-Analysen dargestellt werden konnte, im Vergleich dazu war die Menge an RNA in extrazellulären Partikeln allerdings signifikant grösser. Die infektiöse Natur der isolierten DNA aus FFV-Partikeln konnte mit Hilfe von Transfektionsexperimenten bewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die den Foamyviren gemeinsamen Aspekte ihrer Replikationsstrategie und unterstreichen, dass diese Subfamilie der Retroviren funktional zwischen den Orthoretroviren und den Hepadnaviren anzusiedeln ist.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Retroviren.....	1
1.1.1. Geschichte und Klassifizierung der Retroviren.....	1
1.1.2. Genomstruktur der Orthoretroviren	3
1.1.3. Der Replikationszyklus der Orthoretroviren	5
1.2. Foamyviren.....	10
1.2.1. Genomorganisation und Genexpression der Foamyviren	12
1.2.2. Replikation der Foamyviren.....	16
1.2.3. Das Feline Foamyvirus (FFV).....	18
1.3. Fragestellung	19
2. MATERIALIEN UND METHODEN	22
2.1. Materialien	22
2.1.1. Chemikalien Hersteller/Vertrieb	22
2.1.2. Enzyme und Reaktionspuffer	23
2.1.3. Nukleinsäuren	24
2.1.3.1. Molekulargewichtstandards.....	24
2.1.3.2. Oligonukleotide	24
2.1.4. Plasmide	26
2.1.5. Kompetente Bakterien.....	27
2.1.6. Zelllinien	28
2.1.7. Antiseren und andere Nachweisreagenzien.....	29
2.1.8. Sonstige Materialien.....	29
2.2. Methoden	31
2.2.1. DNA-Methoden	31
2.2.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.2.1.2. Agarosegel-Elektrophorese	31
2.2.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.2.1.4. Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.2.1.5. Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning [®] -Kit (Invitrogen)	33
2.2.1.6. Transformation kompetenter Zellen	34
2.2.1.7. Plasmid-Minipräparation	35
2.2.1.8. Plasmid-Maxipräparation	36

2.2.1.9. Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	37
2.2.1.10. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	38
2.2.1.11. Partielle Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	38
2.2.1.12. Klenow-Reaktion.....	39
2.2.1.13. Abbau überhängender 3'-Enden durch T4-DNA-Polymerase.....	39
2.2.1.14. Dephosphorylierung von DNA.....	40
2.2.1.15. Ethanol-Präzipitation.....	40
2.2.1.16. Phenol-Chloroform-Extraktion.....	40
2.2.1.17. Sequenzierung	41
2.2.1.18. Präparation von DNA aus Zellkulturen	42
2.2.1.19. DNA-Isolierung aus Viruspartikeln.....	42
2.2.1.20. Herstellung markierter radioaktiver Sonden mittels „Random-priming“	43
2.2.1.21. Southern Blot-Analyse	43
2.2.2. RNA-Methoden.....	45
2.2.2.1. RNA-Isolierung aus Viruspartikeln.....	45
2.2.2.2. In-vitro-Transkription (in-vitro-Synthese von RNA)	46
2.2.2.3. RT-PCR mit dem Qiagen [®] OneStep RT-PCR-Kit	46
2.2.2.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	47
2.2.3. Quantitative <i>Real-Time</i> PCR mit dem Light Cycler-System (Roche Diagnostics)	48
2.2.4. Zellkulturmethoden	49
2.2.4.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	49
2.2.4.2. Kalzium-Phosphat-Transfektion.....	49
2.2.4.3. PolyFect-Transfektion	51
2.2.4.4. Gewinnung zellfreier virushaltiger Überstände.....	51
2.2.4.5. Infektion von Zielzellen	52
2.2.4.6. Zellfärbung mit 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -galaktosid (X-Gal)	52
2.2.4.7. Färbung von Friend MuLV (FrMLV)-infizierten Mus Dunni-Zellen	53
2.2.4.8. Titration von Virusüberständen.....	53
2.2.4.9. Aufreinigung von aufkonzentrierten Virusüberständen über ein 20 %iges Saccharosekissen	54
2.2.4.10. Herstellung und Analyse eines kontinuierlichen Saccharose-Gradienten	54
2.2.4.11. FACS-Analyse	55
2.2.5. Proteinnachweis	56
2.2.5.1. Herstellung von Zellysaten für Western Blots.....	56
2.2.5.2. Isolierung von Proteinen aus Viruspartikeln	56
2.2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	57
2.2.5.4. Western Blot-Analyse	58
3. ERGEBNISSE.....	60
3.1. Herstellung von FFV-Klonen genomischer Länge.....	60

3.1.1. Herstellung der infektiösen Klone.....	60
3.1.2. Vergleichende Analyse der verschiedenen molekularen infektiösen FFV-Klone.....	64
3.1.3. Sequenzierung von pChatul-3.....	66
3.2. Analyse der Pseudotypisierbarkeit von FFV-Kapsiden.....	67
3.2.1. Herstellung von FFV-Expressionsplasmiden.....	68
3.2.2. Analyse der Pseudotypisierbarkeit von FFV-Expressionsplasmiden.....	69
3.2.3. Untersuchungen zum Partikelexport bei FFV.....	72
3.2.4. Einfluss von FFV-Bet auf die Virusreplikation von FFV.....	74
3.2.5. Herstellung eines FFV-Pol-Expressionsplasmids.....	77
3.3. Replikationszyklus des feline Foamyvirus.....	79
3.3.1. Untersuchungen zum Einfluss von AZT auf die Infektiosität von FFV.....	79
3.3.2. Analyse der intrazellulären Retrotransposition bei FFV.....	83
3.3.3. Quantifizierung von RNA und DNA aus extrazellulären FFV-Partikeln.....	84
3.3.4. Quantifizierung der Nukleinsäuren mit Hilfe der <i>Real-Time</i> -PCR.....	89
3.3.5. Charakterisierung der Nukleinsäuren in extrazellulären FFV-Partikeln.....	91
3.3.6. Nachweis der Infektiosität von FFV-DNA aus extrazellulären Viruspartikeln.....	94
4. DISKUSSION.....	96
4.1. Charakterisierung der infektiösen molekularen FFV-Klone.....	97
4.2. Pseudotypisierung von FFV-Kapsiden.....	99
4.3. Untersuchungen zum FFV-Partikelexport.....	100
4.4. Das <i>bet</i>-Gen ist für die effiziente FFV-Replikation unbedingt erforderlich.....	102
4.5. FFV-Bet hat einen Einfluss auf die Pseudotypisierung von FFV-Kapsiden.....	103
4.6. Die reverse Transkription stellt ein spätes Ereignis im Replikationszyklus von FFV dar.....	104
4.7. Die intrazelluläre Retrotransposition ist kein Merkmal von FFV.....	105
4.8. Extrazelluläre FFV-Partikel enthalten mehr RNA als DNA.....	106
4.9. Extrazelluläre FFV-Partikel enthalten "infektiöse" DNA voller Länge.....	107
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	110
6. ANHANG.....	124

6.1. Abbildungsverzeichnis.....	124
6.2. Tabellenverzeichnis	125
6.3. Abkürzungen.....	126
6.4. Sequenzierprimer für pChatul-2 und pChatul-3	128
6.5. Plasmide.....	130
6.6. Erklärungen	133
6.7. Lebenslauf	134
6.8. Veröffentlichungen	136

1. Einleitung

1.1. Retroviren

1.1.1. Geschichte und Klassifizierung der Retroviren

Die Familie der Retroviren verdankt ihren Namen einer wissenschaftlichen Entdeckung, für die Howard Temin und David Baltimore mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden. Unabhängig voneinander fanden sie heraus, dass bei bestimmten Viren der Fluss der genetischen Information nicht von DNA über RNA in Protein verläuft, sondern entgegen dem zentralen Dogma der Molekularbiologie von RNA auf DNA übertragen wird (Baltimore, 1970, Temin & Mizutani, 1970). Die Retroviren sind Viren, deren Erbsubstanz aus RNA besteht. Sie besitzen ein spezielles Enzym, die Reverse Transkriptase (RT), die es ermöglicht, RNA in eine komplementäre DNA umzuschreiben. Erst seit der weltweiten Ausbreitung von AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*, erworbenes Immunschwächesyndrom) und der Entdeckung von HIV (Humanes Immundefizienzvirus) als dessen infektiöses Agens wird der Untersuchung von Retroviren grösseres wissenschaftliches und breites öffentliches Interesse zu Teil (Gottlieb *et al.*, 1981, Montagnier, 1984).

Die Familie der Retroviren wird in 2 Subfamilien und 7 Genera unterteilt, die genetische Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Vertretern berücksichtigt (Tab. 1). Nach der Struktur des Genoms unterscheidet man einfache Retroviren (Alpha-, Beta- und Gammaretroviren), welche nur die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* enthalten, von komplexen Retroviren (Deltaretro-, Epsilonretro-, Lenti- und Foamyviren), die zur Replikation auf zusätzliche akzessorische Gene angewiesen sind (Abb. 1). Letztere verfügen über die Möglichkeit, die virale Genexpression auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene mittels regulatorischer Proteine zu beeinflussen. Retroviren sind bei vielen Wirbeltierarten sowie beim Menschen beschrieben worden (Vogt, 1997a). Zu den humanpathogenen Retroviren zählt als Prototyp der komplexen Retroviren das Humane Immundefizienzvirus HIV (Cullen, 1991), das eine langsam fortschreitende degenerative Erkrankung hervorruft und zu der Immunschwächekrankheit AIDS führt.

Subfamilie	Genus	Wichtigste Vertreter	Genom
Orthoretroviren	1. Alpharetroviren	Rous-Sarkom-Virus (RSV), Aviäres Leukose-Virus (ALV)	einfach
	2. Betaretroviren	Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV), Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	einfach
	3. Gammaretroviren	Murines Leukämie-Virus (MuLV), Felines Leukämie-Virus (FeLV)	einfach
	4. Deltaretroviren	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV), Bovines Leukämie-Virus (BLV)	komplex
	5. Epsilonretroviren	Walleye Dermal Sarcoma Virus (WDSV)	komplex
	6. Lentiviren	Humanes Immundefizienzvirus (HIV), Affen-Immundefizienzvirus (SIV)	komplex
Spumaretroviren	Foamyviren	Prototyp der Foamyviren (PFV), Felines Foamyvirus (FFV)	komplex

Tab. 1: Einteilung der Retroviren.

Die Einteilung erfolgt in 7 Gattungen mit Angabe der Hauptvertreter, der Virusmorphologie und der Komplexität des Genoms (Vogt, 1997a).

Die Gattung der Foamyviren (oder: Spumaretroviren) zählt aufgrund ihrer Genomstruktur und den allgemeinen Charakteristika ihres Replikationszyklus zu den komplexen Retroviren, unterscheidet sich jedoch in vielen Merkmalen von allen anderen Retroviren (Linial, 1999, Rethwilm, 1996).

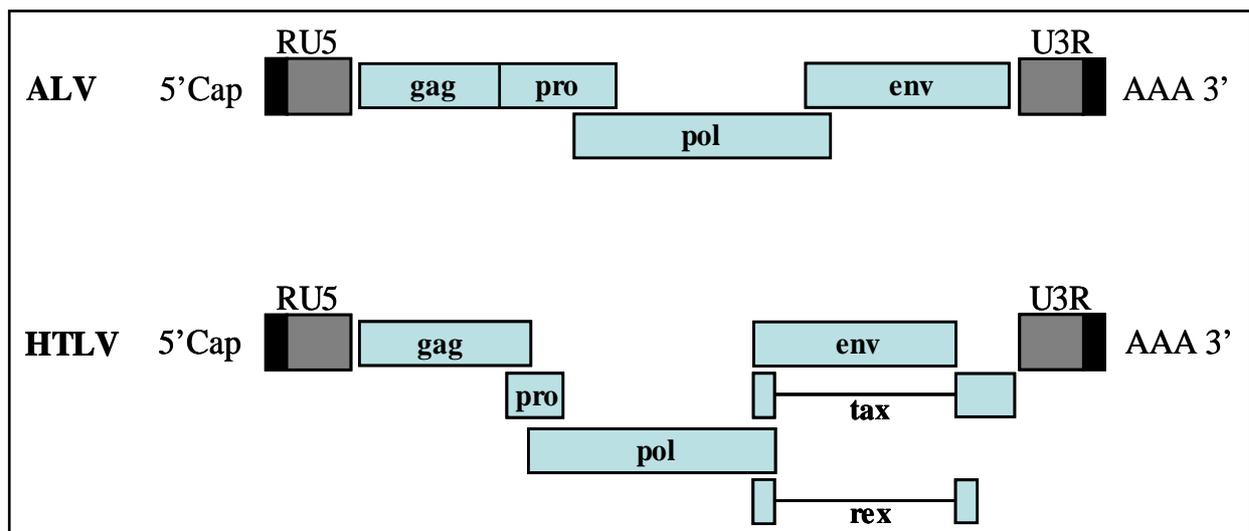


Abb. 1: Darstellung von einfachen und komplexen Retroviren.

Genetische Organisation eines einfachen (ALV: Aviäres Leukose-Virus, oben) und eines komplexen Retrovirus (HTLV: Humanes T-Zell-Leukämie-Virus, unten). Abbildung entnommen aus (Vogt, 1997b).

Die nachfolgende Beschreibung des Replikationszyklus der Retroviren ist daher nicht in jedem Punkt auf Foamyviren übertragbar.

1.1.2. Genomstruktur der Orthoretroviren

Retroviruspartikel sind von einer Hüllmembran umgeben, die von der Zytoplasmamembran der infizierten Zelle stammt und in die viruskodierte Glykoproteine eingelagert sind. Im Inneren eines Retroviruspartikels, das eine ungefähre Grösse von 100 nm besitzt, findet man das Kapsid (Abb. 2). Das Partikel enthält zwei identische Kopien des RNA-Genoms positiver Polarität mit einer Grösse von etwa 7000 (ALV) bis >12000 (WDSV) Basen. Ferner enthält das Viruskapsid enzymatisch aktive Proteine wie Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, die für die Replikation erforderlich sind.

Die RNA eines infektiösen Viruspartikels weist, wie alle eukaryontischen mRNAs, am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende einen etwa 200 Nukleotide langen Poly-A-Schwanz auf (Coffin, 1990). An eine als Primer-Bindungsstelle (PBS) bezeichnete Sequenzfolge von 18 Nukleotiden im 5'-Bereich des Genoms ist ein Molekül zellulärer tRNA hybridisiert, die als Primer für die Synthese von Minus-Strang-DNA benötigt wird. Das Virusgenom wird jeweils von nichtkodierenden Sequenzen flankiert, die identische Sequenzen, so genannte direkte Wiederholungen enthalten. Der Cap-Struktur folgt zunächst die *R*-Region (*R* = repeat), die in identischer Basenfolge und Orientierung auch am 3'-Ende des Genoms vorliegt und bei den verschiedenen Viren zwischen 15 und 240 Nukleotide lang ist. An die *R*-Region des 5'-Endes schliesst sich eine als *U5* (*U* = unique, einmalig am 5'-Ende) bezeichnete Basenfolge an, die wichtige Sequenzen für die Integration in das Wirtsgenom enthält. Zwischen PBS und dem Start der kodierenden Region befindet sich die *Leader*-Region, in der Regel der Hauptsplicedonor (SD), der für die Produktion aller gespleissten mRNA-Moleküle verwendet wird sowie das Verpackungssignal ψ , das für die spezifische Verpackung der genomischen RNA in das Partikel verantwortlich ist.

Die Genome aller infektiösen Retroviren kodieren für die Produkte Gag (Kapsidproteine), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine). Das *gag*-Genprodukt bildet sämtliche internen Strukturproteine des Virus. Dessen Untereinheiten Matrix (MA), Kapsid (CA) und Nukleokapsid (NC) entstehen durch Prozessierung eines Polyproteins durch die virale Protease (PR). Die Matrixproteine sind über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der

Innenseite der Hüllmembran assoziiert. Bei den Lentiviren liegen sie als Trimere vor und bilden miteinander eine netzähnliche Proteinschicht.

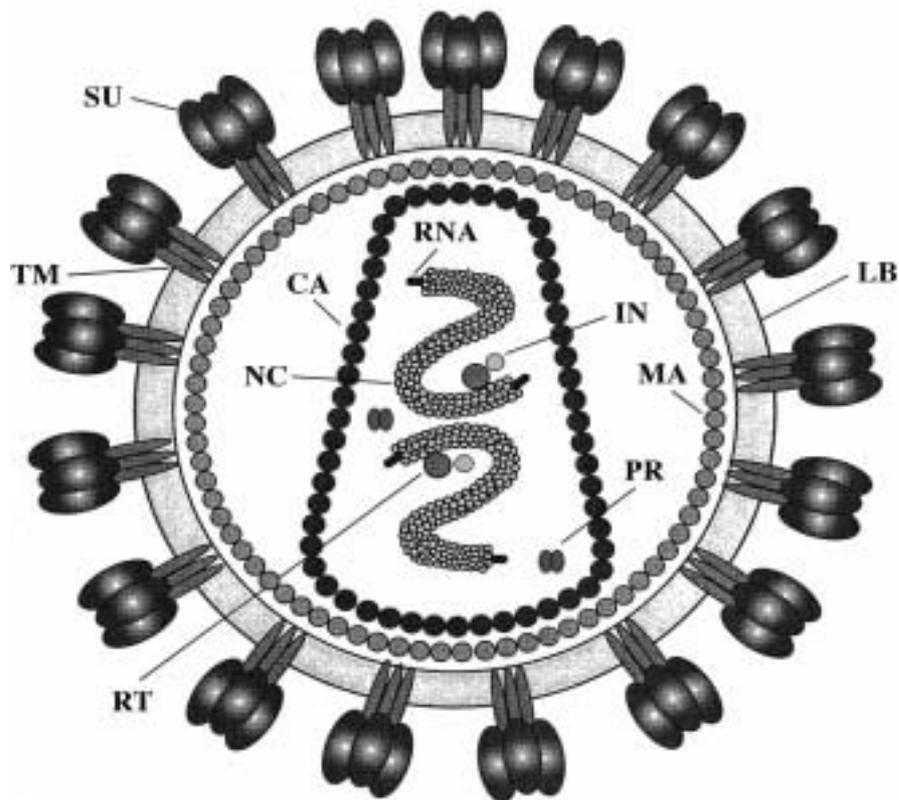


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Retroviruspartikel.

Das virale Hüllprotein ist in einer Lipiddoppelschicht (LB) verankert, die von der infizierten Zelle stammt und in die *env*-kodierte Komponenten (Surface-, SU und Transmembrandomäne, TM) eingelagert sind. Die Strukturproteine Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und Nukleokapsidprotein sind im Inneren des Partikel dargestellt. Vom Kapsid werden die enzymatisch aktiven Proteine Reverse Transkriptase (RT), Protease (PR) und Integrase (IN) zusammen mit dem viralen pseudodiploiden RNA-Genom umschlossen. Abbildung modifiziert nach (Freed & Martin, 2001).

Die Kapsidproteine (CA) formen das Kapsid oder Core, das je nach Virustyp eine zylindrische (z.B. MPMV), eine konusförmige (z.B. HIV, Lentiviren) oder eine sphärische Form (z.B. MLV, ALV) aufweist. Diese Struktur umschließt den Ribonukleoproteinkomplex, in welchem die NC-Proteine über basische Bereiche und ein bis zwei Cys-His-Boxen, die Ähnlichkeit zu nukleinsäurebindenden Zink-Finger-Motiven aufweisen, mit den RNA-Genomen interagieren. Zusätzlich werden in das Viruspartikel zelluläre tRNA-Moleküle, die als Primer für die Reverse Transkription dienen sowie vom viralen *pol* Leserahmen kodierte Enzyme verpackt. Die verschiedenen Vertreter der Retroviren benutzen dabei nur eine spezielle tRNA, wie z.B. tRNA^{T_{rp}} bei ASLV (aviäres Sarkom/Leukose-Virus), tRNA^{Lys} bei HIV-1 oder tRNA^{Pro} bei MuLV (Vogt, 1997b). Für HIV-1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass das zelluläre

Makromolekül Cyclophilin A mit in das Kapsid verpackt wird. Dieses Protein der Chaperon-Gruppe katalysiert die korrekte Faltung der CA-Proteine und das Fehlen von Cyclophilin A hat eine Inhibition der Replikation zur Folge (Braaten *et al.*, 1996, Vogt, 1997a). Die vom Pro-Gen kodierte virale Protease (PR), eine Aspartat-Protease, liegt im Inneren des Kapsids als Dimer aus zwei identischen Proteineinheiten vor (Burstein *et al.*, 1991, Davies, 1990, Kräusslich, 1991). Unmittelbar im Anschluss an die Pro-Sequenz schliesst sich die Pol-kodierende Region an, die die Leserahmen für die Reverse Transkriptase (RT), RNase H (RH) und die Integrase (IN) enthält. Das Vorläuferprodukt des Hüllproteins wird vom Env-Leserahmen kodiert, der sowohl die Sequenzen für das Oberflächenprotein (SU) als auch für das Transmembranprotein (TM) enthält. Erst im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat erfolgt die Spaltung durch eine zelluläre Protease in die Untereinheiten (Vogt, 1997a).

Im Falle der komplexen Retroviren, wie Lenti- und Deltaretroviren existieren weitere Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren. Sie bestehen häufig aus mehreren Exons und werden von mehrfach gespleissten mRNA-Spezies translatiert (Vogt, 1997a).

Der Polypurintrakt (PPT) befindet sich vor dem Start der U3-Region (siehe Abb. 3) und ist eine allen Retroviren eigene Folge von mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten, die für die Initiation der Plus-Strang-DNA bei der reversen Transkription wichtig ist (Telesnitsky & Goff, 1997). Im Anschluss daran folgt die U3-Region (*U* = unique, einmalig am 3'-Ende), die analog zum U5-Bereich nach ihrer Lage am 3'-Ende des Genoms bezeichnet wird. Wie auch die U5-Region enthält sie wichtige Sequenzen für die Integration und trägt zusätzlich noch den viralen LTR-Promotor, der die Genexpression des integrierten Provirus steuert. *cis*-aktive Elemente in diesem Bereich interagieren mit transaktiven, zellulären Proteinen oder bei komplexen Retroviren auch mit viralen Faktoren und steuern so die Transkription und Genexpression (Modrow & Falke, 1997).

1.1.3. Der Replikationszyklus der Orthoretroviren

Der virale Infektionszyklus der Retroviren beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel an die Zielzellen, der durch einen externen Teil des Membranproteinkomplexes vermittelt wird. Der Glykoproteinkomplex der Retroviren setzt sich aus zwei Polypeptiden zusammen, der externen, glykosylierten Oberflächendomäne SU (Surface) und der membranspannenden Domäne TM (Transmembrane). Für die Bindung des zellulären Rezeptormoleküls ist die SU-Domäne des Hüllproteins verantwortlich. Aufgrund dieser Interaktion kommt es zu einem

Konformationswechsel des Glykoproteins, der zur Aktivierung des Fusionspotentials der TM-Domäne führt und das Verschmelzen der Virus- mit der Zellmembran einleitet (Hunter, 1997). Die Spezifität von SU- und Rezeptor-Interaktion bestimmt die Wirtsspezifität sowie den Gewebetropismus des Virus. Demnach sind Viren ohne Glykoprotein nicht infektiös und die Zellen ohne entsprechenden Rezeptor nicht infizierbar (Chan & Kim, 1998). Unmittelbar nach der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran wird das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Erst jetzt wird das virale RNA-Genom als Komplex mit Proteinen freigesetzt („uncoating“) und von der Reversen Transkriptase, die im Viruspartikel inkorporiert war, in doppelsträngige DNA transkribiert. Durch teilweise Duplikationen der LTR-Regionen (*long terminal repeat*) ist das DNA-Produkt an beiden Enden länger als die RNA (Abb. 3).

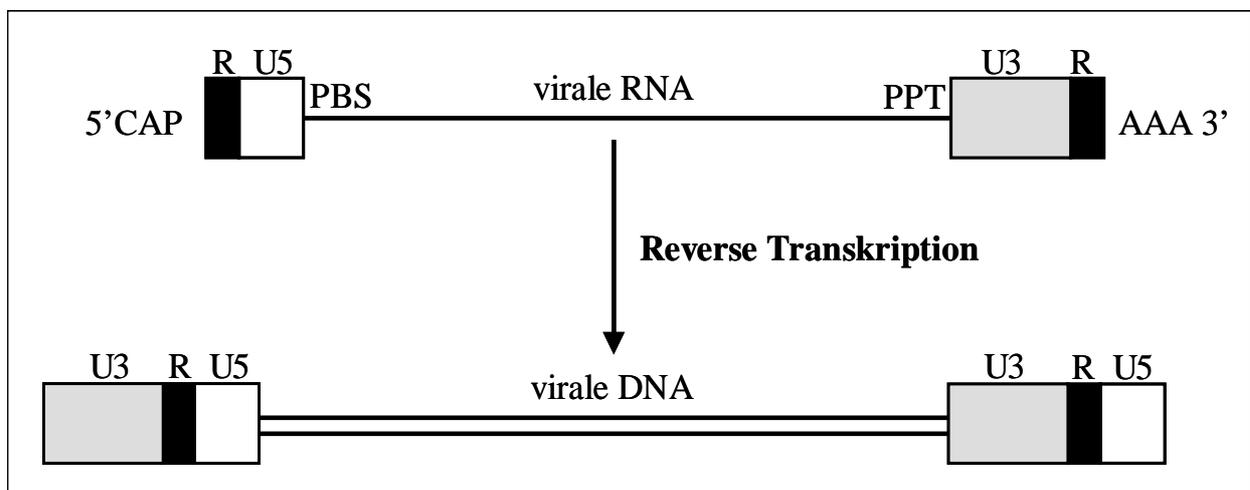


Abb. 3: Reverse Transkription des viralen RNA-Genoms in lineare dsDNA.

Dargestellt sind die Positionen der R-, U5-, und U3-Regionen, der Polypurintrakt (PPT) sowie die Primerbindungsstelle (PBS). Aus dem Prozess der reversen Transkription resultierende Duplikationen führen zu einem verlängerten DNA-Genom. Abb. entnommen aus (Telesnitsky & Goff, 1997).

Für die retrovirale DNA-Synthese sind zwei enzymatische Aktivitäten der Reversen Transkriptase essentiell. Die DNA-Polymerase, die sowohl RNA als auch DNA als Matrize nutzt sowie eine Nuklease (Ribonuklease H, RNase H), die spezifisch den RNA-Strang von RNA:DNA-Hybriden hydrolysiert.

Die Minus-Strang DNA-Synthese wird durch die Bindung des zellulären tRNA-Moleküls an die Primer-Bindungsstelle (PBS) im 5'-Bereich des RNA-Genoms eingeleitet (Abb. 4). Ausgehend von der tRNA synthetisiert die Reverse Transkriptase im 1. Schritt in 5' → 3'-Richtung einen zu den U5- und R-Sequenzen komplementären DNA-Strang. Die RNase H hat die Funktion, den RNA-Anteil des RNA:DNA-Hybrids abzubauen.

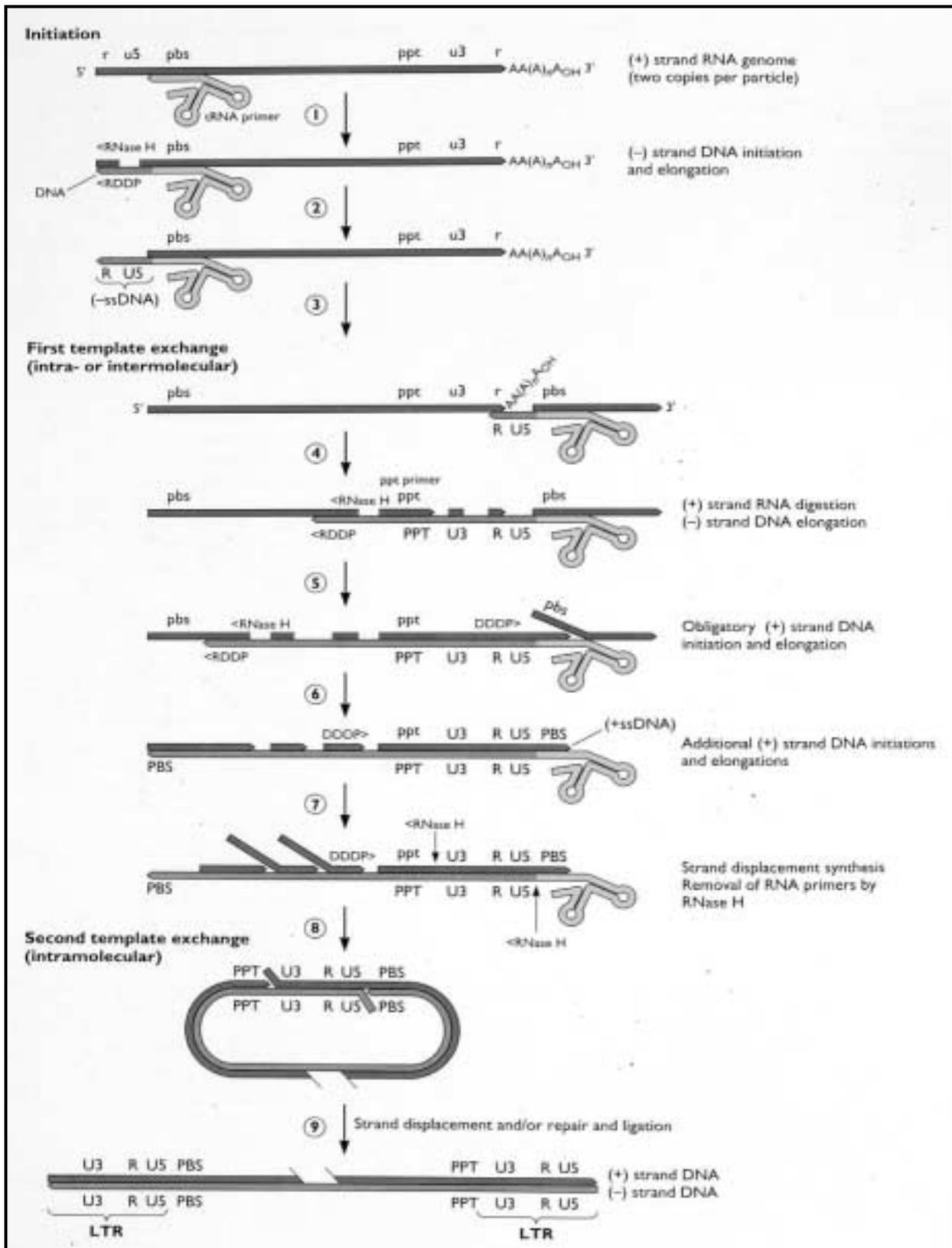


Abb. 4: Reverse Transkription.

Dargestellt sind die Vorgänge beim Umschreiben des ssRNA-Genoms der Retroviren in dsDNA durch die Reverse Transkriptase. Es wurden die üblichen Abkürzungen verwendet, wie sie auch im Text beschrieben worden sind (zusätzlich: RDDP=RNA-abhängige DNA-Polymerisation; DDDP=DNA-abhängige DNA-Polymerisation). Abb. entnommen aus (Flint *et al.*, 2000).

Die entstandene kurze (-) strong-stop DNA (-ssDNA) wird nun an das 3'-Ende des Genoms transferiert, hybridisiert hier an die 3' R-Sequenzen und dient als Primer für die weitergehende Synthese der zum RNA-Genom komplementären Minus-Strang DNA. Der RNA-Anteil des gebildeten RNA:DNA-Hybrids wird wieder durch die RNase H hydrolysiert, wobei jedoch die kurze RNA-Folge des Polypurintrakts (PPT) am 3'-Ende des Genoms resistent gegen diesen Verdau ist (siehe Abb. 4). Das 3'-Ende dieses Abschnitts dient im nächsten Schritt als Primer für die Synthese der Plus-Strang DNA. Einige Viren (HIV und ALVs) benutzen einen weiteren, zentralen Polypurintrakt. Charneau und Mitarbeiter konnten zeigen, dass dieser zentrale PPT für eine optimale HIV-Replikation benötigt wird (Charneau *et al.*, 1992). Mutationen im zentralen PPT bei HIV-1 blockieren die Replikation nach erfolgter reverser Transkription (Charneau *et al.*, 1994).

Nach Beendigung der Synthese des ersten, doppelsträngigen DNA-Abschnitts, der sich über U3, R, U5 und PBS erstreckt, wird die noch immer gebundene tRNA durch die RNase H entfernt. Die Plus-Strang DNA kann nun über komplementäre Sequenzen der PBS mit der langen Minus-Strang DNA in Form eines zirkulären Intermediates hybridisieren. Die beiden Stränge werden vervollständigt und die Enden aufgefüllt, so dass das Virusgenom schliesslich als doppelsträngiges lineares DNA-Molekül vorliegt, bei dem die kodierenden Sequenzen von den LTR-Regionen flankiert werden.

Da die Reverse Transkriptase die Lesegenauigkeit nicht überprüfen kann, werden bei der Synthese der beiden DNA-Stränge mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10^{-4} falsch gepaarte Basen eingebaut. Dieser Umstand führt in Verbindung mit einer hohen viralen Replikationsrate zu einer signifikanten Mutationsrate (Modrow & Falke, 1997, Vogt, 1997b). Das mit den Kapsidkomponenten weiterhin verbundene doppelsträngige DNA-Genom gelangt als so genannter Prä-Integrationskomplex in den Zellkern. Dort katalysiert die Integrase (IN) die Insertion des Provirus in das Wirtszellgenom. Die Retroviren sind die einzigen Viren, deren Replikation essentiell auf die Integration ihres Genoms in das Wirtszellgenom angewiesen ist und die über ein eigenes Enzym verfügen, das diese Aufgabe mit hoher Effizienz erfüllt. Dabei entfernt das Enzym zwei Nukleotide von den 3'-Enden der LTRs, so dass 5'-überhängende, einzelsträngige Dinukleotide entstehen. Die zelluläre DNA wird ebenfalls durch die Integrase an einer zufälligen Stelle geöffnet, so dass überhängende 5'-Enden mit vier bis sechs Basen entstehen. Die 5'-Enden der zellulären DNA werden mit den 3'-Enden des Virusgenoms verbunden, die viralen 5'-Überhänge bleiben dabei frei. Die Ergänzung der Lücken in den Einzelsträngen und der Abbau der viralen 5'-Überhänge erfolgt durch zelluläre Reparatursysteme. In der folgenden Phase der Replikation binden verschiedene zelluläre

Faktoren an die U3-Region der LTR, welche die Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II ermöglichen. Bei komplexen Retroviren werden ausserdem regulatorische Proteine gebildet, die wie Tat bei HIV-1 als virale Transaktivatoren die Genexpression auf transkriptionaler Ebene steuern. So konnten für HIV-1 und HIV-2 Regionen in der LTR identifiziert werden, die für eine effiziente Induktion der Genexpression nach der Bindung von Tat verantwortlich sind. Es handelt sich hierbei um die *trans-activation response* (TAR), die hoch konserviert ist und an die das Tat-Protein direkt binden kann. Der Transaktivator Tat wird von einer gespleisssten mRNA gebildet und kann durch Bindung an das in der R-Region der LTR gelegene TAR-Element (Stamm Schleifen-Struktur auf der initiierten RNA) die Transkription 100 bis 1000fach erhöhen (Dayton *et al.*, 1986, Fisher *et al.*, 1986, Rabson & Graves, 1997).

Die vom Provirus transkribierte mRNA-Kopie in voller Länge dient sowohl als genomische RNA für neue Viren und andererseits als mRNA für die Proteinexpression. Die Gag- und Pol-Proteine werden in Form eines Polyproteinvorläufers (Gag-Pro-Pol) von den Transkripten genomischer Länge translatiert. Die Protease, die im Polyprotein vorhanden ist, spaltet diese Vorläuferproteine in einem autokatalytischen Prozess in ihre Untereinheiten. Da die Retroviren im Verlauf ihrer Replikation eine grosse Menge Gag-Moleküle, jedoch nur eine geringe Menge der Enzyme PR, RT und IN benötigen, verwenden sie zwei verschiedene Mechanismen zur Regulation der Gag und Pol-Expression. Liegen *gag* und *pol* nicht im selben Leseraster, ermöglicht eine Sekundärstruktur in der RNA das „Rutschen“ des Ribosoms um eine Base. Dieser einfache (-1)- Leserasterwechsel am 3'-Ende des *gag*-Gens bewirkt das Überlesen des Gag-Stopkodons und die *pro-pol*-Translation z.B. bei Alpharetroviren und Lentiviren. Bei einigen Retroviren liegt der *pro*-Leserahmen auch separat vor (z.B. MPMV, MMTV, HTLV-1) und zwei (-1)-Leserasterwechsel sind für die Translation des Gag-Pro-Pol-Polyproteins und des Gag-Pro-Fusionsproteins erforderlich (Hatfield *et al.*, 1992, Jacks, 1990, Levin *et al.*, 1993). Der Mechanismus der Terminationssuppression wird hingegen von Viren der MLV-Gruppe genutzt. An Stelle der Translationstermination an einem Amber-Kodon (UAG) wird die Aminosäure Glutamin (Kodon CAG) eingebaut, so dass die weitere Translation des Pol-Leserasters erfolgen kann (Philipson *et al.*, 1978). *Cis*-aktive Sequenzen (Stamm Schleifenstrukturen), die sich stromabwärts der Terminationssignale befinden, sind für deren Suppression verantwortlich (Feng *et al.*, 1992, Honigman *et al.*, 1991, Wills *et al.*, 1991). Da beide Mechanismen nur mit einer Häufigkeit von ca. 5% auftreten, wird ein gleichmässiges Verhältnis an Strukturproteinen (Gag) und enzymatisch aktiven Proteinen (PR, RT und INT) gesichert.

Die Env-Proteine SU und TM werden von einer gespleisssten subgenomischen RNA translatiert. Das Vorläuferprotein trägt am aminoterminalen Ende ein kurzes hydrophobes Signalpeptid und

wird daher in das sekretorische Membransystem (endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat) der Zelle eingeschleust (Lutcke, 1995, Walter & Johnson, 1994, Wolin, 1994). Im Lauf der Passage durch dieses System erfolgen als Modifizierung mehrere Glykosylierungsschritte. Zelluläre Proteasen spalten das Vorläuferprotein in die reifen SU- und TM-Proteine (Dong *et al.*, 1992, Freed *et al.*, 1989, Perez & Hunter, 1987). Über Disulfidbrücken oder nicht-kovalente Interaktionen bleiben SU und TM miteinander verbunden und werden am Ende des Replikationszyklus in die Wirtszellmembran integriert (Hunter & Swanstrom, 1990, Leis *et al.*, 1988, Oroszlan & Luftig, 1990).

Nach erfolgter Translation werden die viralen Proteine und die genomische mRNA zu Viruspartikeln zusammengefügt („Assembly“) und verlassen die Wirtszelle mit einer aus der Zytoplasmamembran gebildeten Lipidhülle, in der das Env-Protein eingebettet ist („Budding“). Domänen in den Vorläuferproteinen reagieren spezifisch mit RNA genomischer Länge, die für die nächste Virusgeneration als Genom verwendet wird. Hierdurch wird sichergestellt, dass nur überwiegend virale RNA in die Viruspartikel verpackt wird. Spezifische Sequenzen der genomischen viralen RNA fungieren als Verpackungssignale ψ (Berkowitz *et al.*, 1996, Linial & Miller, 1990, Rein, 1994). Mindestens ein Verpackungssignal am Beginn der *gag*-Region ist obligatorisch und gewährleistet die Verpackung der viralen genomischen RNA. Die Interaktion zwischen den NC-Proteinen und der viralen RNA mit dem Verpackungssignal führt zur Assoziation von zwei viralen genomischen RNA-Molekülen mit Gag-Proteinen und somit zur Bildung der neuen Kapside. Diese enthalten die Reverse Transkriptase- und Integrase-Moleküle sowie die tRNA-Primer. Durch Knospung an der Zellmembran werden die neuen, noch unreifen Virionen freigesetzt. Erst nach der Prozessierung der Gag- und Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteine in den freigesetzten Viruspartikeln durch die virale Protease entstehen infektiöse, gereifte Partikel (Dickson *et al.*, 1984, Vogt, 1996). Viruspartikel, die diese Prozessierung nicht vollziehen, weisen eine unreife Morphologie auf und sind nicht infektiös.

1.2. Foamyviren

Die Foamyviren bilden eine von zwei Subfamilien der Retroviren. Das Wirtsspektrum dieser Gruppe umfasst Affen, Katzen, Rinder, Seelöwen und Pferde (Linial, 1999). Der Mensch scheint kein natürliches Reservoir für Foamyviren zu sein, jedoch konnten bei Laborpersonal bzw. Tierpflegern mit Kontakt zu Affen akzidentelle Foamyvirusinfektionen bestätigt werden (Schweizer *et al.*, 1997, Schweizer *et al.*, 1995). Bei dem als PFV (Prototyp der Foamyviren)

bekanntem Vertreter handelt es sich um ein Isolat aus einem afrikanischen Patienten mit Nasopharynx-Karzinom (Achong *et al.*, 1971). Aufgrund seines Ursprungs wurde dieses Isolat für lange Zeit als humanes Foamyvirus bezeichnet. Die Sequenzierung des Virusgenoms ergab jedoch eine 86 bis 95 % Identität der Aminosäuren zu SFVcpz (Simian Foamy Virus der Schimpansen), was darauf schließen lässt, dass es sich nicht um ein humanes Virus handelt, sondern um eine Variante von SFV der Schimpansen (Brown *et al.*, 1978, Herchenröder *et al.*, 1994, Meiering & Linial, 2001). Neben den FV-Isolaten der Affen konnten weitere FV Vertreter aus Katzen (FFV), Rindern (BFV) und Pferden (EFV) isoliert werden (Malmquist *et al.*, 1969, Riggs *et al.*, 1969, Tobaly-Tapiero *et al.*, 2000).

Im natürlichen Wirt kommt es trotz hoher Antikörpertiter zu persistierenden Infektionen, die allerdings ohne erkennbare pathologische Folgen bleiben (Linial, 2000). Lediglich für immuninkompetente Nacktmäuse kann die Infektion letal sein (Imrich *et al.*, eingereichte Publikation). Das Fehlen einer klaren Assoziation natürlich vorkommender foamyviraler Infektionen mit einer definierten Krankheit und die seltene Übertragung auf Menschen ist ein wichtiges Kriterium für den denkbaren Einsatz von Foamyviren als Vektoren in der somatischen Gentherapie (Russell & Miller, 1996).

Weiterhin besitzen die Foamyviren die Fähigkeit, *in vitro* ein breites Spektrum von Zellkulturspezies zu infizieren (Hill *et al.*, 1999, Meiering & Linial, 2001, Mergia *et al.*, 1996). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der noch unbekannte FV-Rezeptor nicht nur auf allen untersuchten Säugerzellen zu finden ist, sondern auch auf Zellen von Vögeln und Reptilien. Bei den meisten Zelltypen führt die Infektion zur Synzytienbildung, Vakuolisierung und schließlich zum Zelltod. Transformierte Zellen myeloiden, erythroiden oder lymphoiden Ursprungs können chronisch infiziert werden, so dass eine Persistenz vorliegt (Mergia *et al.*, 1996, Mikovits *et al.*, 1996, Yu *et al.*, 1996c). Für Monozyten konnte gezeigt werden, dass diese zwar infizierbar sind, jedoch keinen zytopathischen Effekt zeigen (Mikovits *et al.*, 1996). Diese chronisch infizierten Zellen resultieren *in vitro* in einer kontinuierlichen Virusproduktion, die nicht den üblichen Zelltod nach sich zieht. Verglichen mit zytopathischen Infektionen sind die produzierten Virusmengen jedoch deutlich geringer (Yu *et al.*, 1996c). Der Mechanismus, der zu einer chronischen Infektion und somit zur Persistenz führt, ist bisher noch nicht geklärt.

1.2.1. Genomorganisation und Genexpression der Foamyviren

Aufgrund ihres Genomaufbaus gehören die Foamyviren zu den komplexen Retroviren. Zusätzlich zu den regulatorischen Elementen in den LTRs und den drei konservierten Genen *gag*, *pol* und *env* besitzen die Foamyviren Gene, die für die akzessorische Proteine Tas und Bet kodieren (Abb. 5).

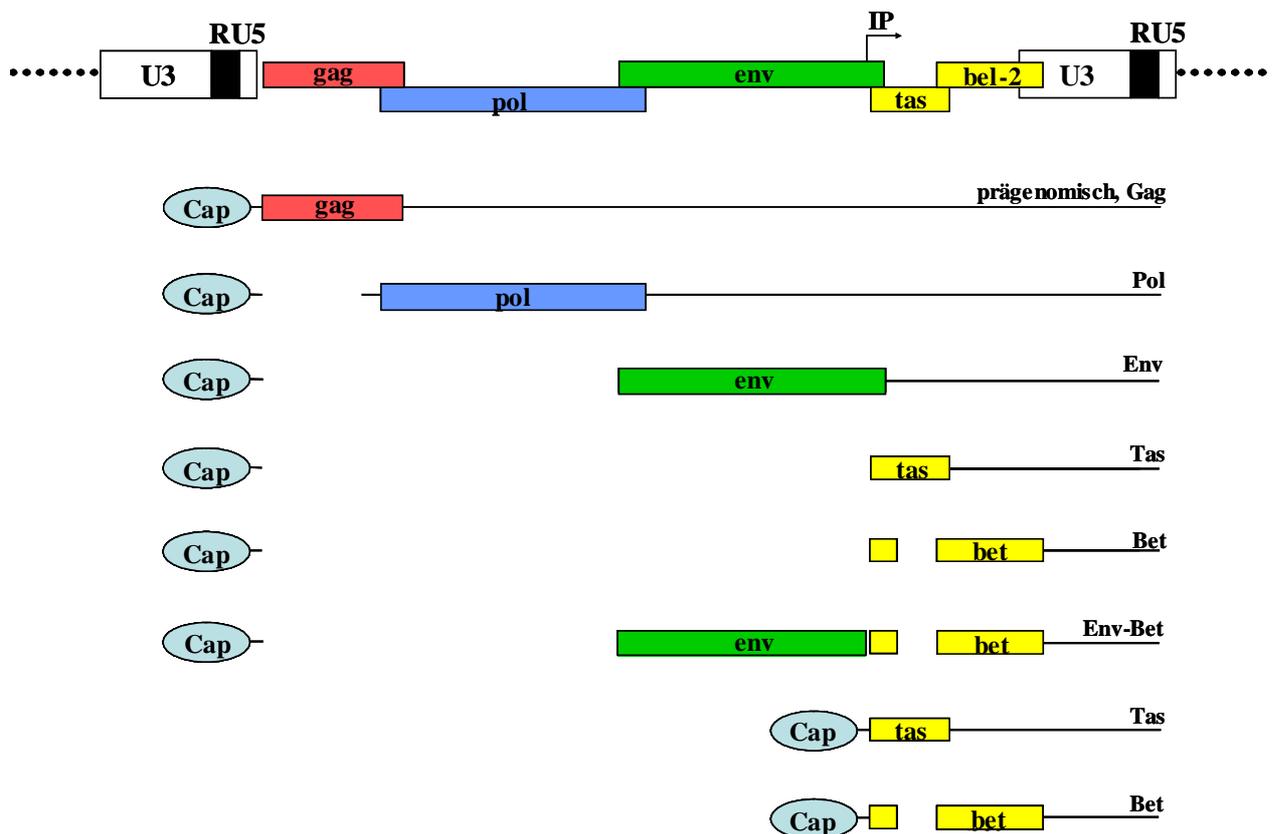


Abb. 5: Schematische Darstellung des Genoms und der Genomexpression der Foamyviren.

Die obere Abbildung zeigt die genetische Organisation des Provirus, flankiert von den LTRs. Neben dem LTR-Promotor ist der interne Promotor (IP) im 3'-Bereich des *env*-Gens dargestellt. Im unteren Bereich der Abbildung sind die RNA-Transkripte dargestellt, die mit einer Cap-Struktur versehen sind und polyadenyliert werden. Unterbrechungen symbolisieren Introns. Die exprimierten Proteine sind durch farbige Rechtecke dargestellt.

Wie auch MMTV (Maus-Mamma-Tumor-Virus), benutzen die FV zwei verschiedene Promotoren zur Initiation der Transkription. Neben dem U3-Promotor besitzen die Foamyviren einen internen Promotor (IP), der im 3'-Bereich des *env*-Gens lokalisiert ist (Campbell *et al.*, 1994, Löchelt *et al.*, 1993, Mergia, 1994, Winkler *et al.*, 1997). Der U3-Promotor ist verantwortlich für die Expression der *gag*-, *pol*- und *env*-Transkripte, der interne Promotor dagegen steuert die Expression der akzessorischen Gene. Die Expression beider Promotoren wird durch den viralen Transaktivator Tas gesteuert. Während der U3-Promotor ohne Tas-

Expression nahezu stumm ist (Baunach *et al.*, 1993, Yu & Linial, 1993), besitzt der interne Promotor eine deutliche Basalaktivität (Yang *et al.*, 1997). Das heisst, in der frühen Phase der Infektion ist der interne Promotor konstitutiv aktiv und steuert die Synthese des viralen Transaktivators. Mit Hilfe von DNA-Bindungsstellen im internen Promotor, die eine wesentlich höhere Affinität zu Tas aufweisen als die DNA-Bindungsstellen im U3-Promotor, wird die Expression von Tas gesteigert (Kang *et al.*, 1998). Ist der Transaktivator in ausreichenden Mengen vorhanden, kommt es schliesslich zur Aktivierung des U3-Promotors und zur Transkription der genomischen RNA und den subgenomischen mRNAs der Strukturproteine.

Im Gegensatz zu den Orthoretroviren verfügen die Foamyviren im 3'-Bereich des *gag*-Gens nicht über die üblichen Cys-His-Boxen, sondern über Glycin-Arginin-Boxen (GR-Boxen), die für die Nukleinsäurebindung sowie für den Transport des FV Gag-Polypeptids in den Zellkern verantwortlich sind (Schliephake & Rethwilm, 1994, Yu *et al.*, 1996b). Solche spezifischen DNA- und RNA-bindenden Argininreste findet man zum Beispiel auch bei den Hepadnaviren. So konnte bei HBV (Hepatitis B-Virus) ein solches Motiv im C-Terminus des Core-Proteins nachgewiesen werden (Hatton *et al.*, 1992, Nassal, 1992). Ein weiterer Unterschied zu den Retroviren ist die fehlende Spaltung des Gag-Vorläuferproteins in Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid-Polypeptide. Bei den Foamyviren findet man dagegen nur zwei Formen von Gag (71 kDa und 68 kDa). Diese Prozessierung zu p71/p68 durch die virale Protease, bei der ein ca. 3 kDa grosses Fragment vom C-Terminus des Proteins abgetrennt wird, ist essentiell für die Infektiosität und Mutationen in der mutmasslichen Spaltstelle führen zur Bildung von replikations-inkompetenten Viren (Enssle *et al.*, 1997, Giron *et al.*, 1997, Zemba *et al.*, 1998).

Im Unterschied zu den *pol*-Genen der Retroviren werden die Genprodukte des *pol*-Leserahmens bei Foamyviren von einem gespleissten Transkript exprimiert (Enssle *et al.*, 1996, Jordan *et al.*, 1996, Yu *et al.*, 1996b). Das Pol-Vorläuferprotein besitzt ein Molekulargewicht von 127 kDa und wird autokatalytisch durch die virale Protease in seine funktionell aktiven Untereinheiten gespalten (Konvalinka *et al.*, 1995, Pfrepper *et al.*, 1998). Dazu gehört die Integrase (IN) mit einer Grösse von ca. 40 kDa und ein Protein mit einer Grösse von ca. 85 kDa, das das PR-RT-RH-Polypeptid repräsentiert (Kögel *et al.*, 1995, Netzer *et al.*, 1990). Bei den Orthoretroviren, wie z.B. HIV, findet man dagegen eine Prozessierung von Pol in drei Proteine: in PR, RT und IN. Die Integrase der FV enthält alle Merkmale, die auch bei Integrasen anderer Retroviren zu finden sind. Dazu gehören ein N-terminales HH-CC Zinkfinger-Motiv, das DD35E-Motiv als aktives Zentrum des Enzyms sowie eine DNA-bindende Domäne (Pahl & Flügel, 1995). Wie auch bei anderen Retroviren ist eine aktive Integrase unentbehrlich für die FV-Replikation (Enssle *et al.*, 1999).

Wie in Kapitel 1.1.3. beschrieben, erfolgt bei den Orthoretroviren die Pol-Expression durch Terminationssuppression bzw. Leserasterwechsel als Gag-Pol-Vorläuferpolyprotein (Swanstrom & Wills, 1997). Diese Kotranslation des Pol-Proteins hat zwei Vorteile. Sie garantiert sowohl ein gerichtetes Verhältnis zwischen Struktur- und enzymatisch aktiven Proteinen als auch den Einbau von Pol-Protein in das Kapsid. Bei den ebenfalls revers transkribierenden Hepadnaviren hingegen ist die Polymerase für die Verpackung der prägenomischen RNA und die Initiation des Zusammenbaus von Kapsidprotein verantwortlich (Nassal & Schaller, 1993). Die Synthese von FV-Pol-Protein von einem gespleissten Transkript ohne Gag-Domäne hat die Frage aufgeworfen, wie dieses Protein in die Partikel verpackt werden. Erst kürzlich konnte von Heinkelein und Mitarbeitern (2002) gezeigt werden, dass die prägenomische RNA für die Verpackung des aktiven Pol-Proteins unentbehrlich ist und dass Protein-Protein-Interaktionen von Pol und Gag für den Partikelzusammenbau nicht ausreichend sind. Es wird vermutet, dass für die Bildung der FV-Kapside die prägenomische RNA sowohl mit Gag als auch mit Pol interagieren muss, und dass verschiedene *cis*-aktive Sequenzen (CAS) in der RNA dafür verantwortlich sind.

Wie bei den Orthoretroviren werden die Env-Proteine der Foamyviren von einer einfach gespleissten RNA synthetisiert. Das 130 kDa-Vorläuferprotein wird durch eine zelluläre Protease in eine Oberflächendomäne (SU), in eine Transmembrandomäne (TM) und in ein Signal- bzw. Leaderpeptid (LP) gespalten. Solche Signalpeptide spielen eine Schlüsselrolle in Transport und Membranverankerung von sekretorischen und Membranproteinen (Martoglio & Dobberstein, 1998). Das Leaderpeptid von PFV (gp18) ist ungewöhnlich lang (Spaltstelle im Env-Protein wahrscheinlich zwischen AS109 und AS125) und essentiell für die Knospung der FV-Kapside an der Zellmembran sowie für deren Freisetzung (Lindemann *et al.*, 2001).

Eine weitere Besonderheit des FV-Env-Proteins ist das so genannte „ER-retrieval-signal“ (ERS) im zytoplasmatischen Teil der TM-Domäne, das den Transport des Hüllproteins an die Zelloberfläche einschränkt und an der Knospung an intrazellulären Membranen beteiligt ist (Goepfert *et al.*, 1999, Goepfert *et al.*, 1997, Goepfert *et al.*, 1995). Während dieses Dilysinmotiv (KK) am C-Terminus des *env*-Leserahmens ansonsten bei allen FV identifiziert werden konnte, so fehlt dieses Merkmal dem erst kürzlich beschriebenen FV der Pferde (EFV: Equines Foamyvirus; (Tobaly-Tapiero *et al.*, 2000). Auch bei der Knospung der Viruspartikel unterscheiden sich die Foamyviren von den Orthoretroviren. Bei den Orthoretroviren ist nur das Gag-Protein für die Knospung der Viruspartikel essentiell. Komplette Deletionen des *env*-Gens haben auf die Freisetzung von membranumhüllten, allerdings nicht-infektiösen Virionen keinen Einfluss (Bour *et al.*, 1996, Ritter *et al.*, 1996). Bei PFV ist die Knospung der Partikel ohne Env-Protein genauso unmöglich wie eine Pseudotypisierung von PFV-Kapsiden mit einem

heterologen Env-Protein (Baldwin & Linial, 1998, Fischer *et al.*, 1998, Pietschmann *et al.*, 1999). Der zelluläre Rezeptor, der als Interaktionspartner für die FV-Env-Protein dient, konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

Wie schon oben angeführt, kontrolliert der interne Promotor IP zwei Leserahmen: *tas* (oder auch *bel-1*) und *bel-2* (Löchelt *et al.*, 1993). Die Bezeichnung „*bel*“ leitet sich von der Lokalisation der Gene (**between *env* and LTR**) ab. Der foamyvirale Transaktivator Tas, der für die FV-Replikation essentiell ist, weist zu anderen retroviralen Transaktivatoren keine Sequenzhomologien auf und aktiviert die FV-Transkription über einen eigenen Mechanismus (Abb. 6; (Linial, 1999).

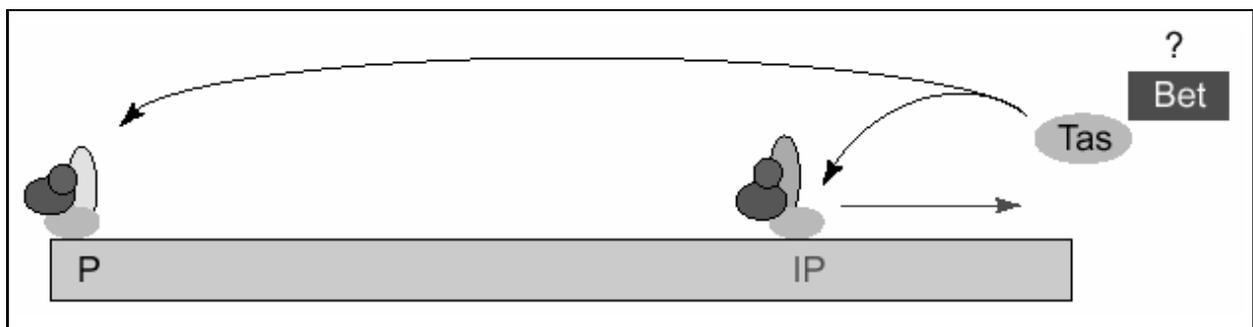


Abb. 6: Tas-gesteuerte Genexpression bei Foamyviren.

In rot sind der interne Promotor IP und dessen Genexpression dargestellt. Die schwarzen Pfeile deuten darauf hin, dass sowohl der interne Promotor als auch der U3-Promotor Tas für eine optimale Expression benötigen. Die übrigen Symbole deuten mutmassliche zelluläre Transkriptionsfaktoren an, die möglicherweise zusätzlich benötigt werden. Die Funktion des Bet-Proteins (gekennzeichnet durch ein Fragezeichen) ist nahezu unbekannt. (Abb. nach Linial, 2000).

So konnten verschiedene Gruppen zeigen, dass das 36 kDa grosse Phosphoprotein über eine Transaktivierungsdomäne im C-Terminus sowie eine zentral lokalisierte DNA-Bindungsdomäne verfügt (Blair *et al.*, 1994, He *et al.*, 1996, Mergia *et al.*, 1993, Venkatesh & Chinnadurai, 1993). He und Mitarbeiter haben ausserdem nachgewiesen, dass in dem LTR-Promotor vorhandene TRE-Sequenzen wahrscheinlich ein oder mehrere Proteine zum LTR-Promotor rekrutieren und dass es erst dort in Verbindung mit dem Tas-Protein zu einer effizienten Induktion der Transkriptionsinitiation kommt.

Das zweite IP-regulierte Protein Bet wird von einer multigespleissten mRNA synthetisiert und besteht aus den ersten 88 Aminosäuren von Tas und der gesamten kodierenden Kapazität von Bel-2 (Muranyi & Flügel, 1991). Die Funktion des Proteins ist bisher nicht geklärt, jedoch konnte von Bock und Mitarbeitern (1998) gezeigt werden, dass Bet-exprimierende Zellen resistent gegenüber einer PFV-Superinfektion sind. Daher wird eine Funktion des Bet-Proteins für die Persistenz des Virus *in vivo* vermutet (Lecellier & Saïb, 2000, Linial, 2000). Möglicherweise spielt Bet eine analoge Rolle zum HIV-1 Vif-Protein (*Viral infectiosity factor*)

und beeinflusst die Infektiosität der Nachkommenviren, da auch hier konservierte Histidin- und Cysteinreste identifiziert worden sind (Flügel, 1991).

Zusätzlich wurde in infizierten Zellen ein weiteres Protein identifiziert (Giron *et al.*, 1998, Lindemann & Rethwilm, 1998). Das 170 kDa grosse Fusionsprotein Env-Bet setzt sich aus Teilen des extrazellulären Hüllproteins und Bet zusammen und wird von infizierten Zellen mit einer Menge von 30 bis 50 % im Vergleich zum Env-Vorläuferprotein sekretiert. Es assoziiert jedoch nicht mit FV-Partikeln und wird auch nicht für deren Infektiosität und Freisetzung benötigt. Mutanten, denen dieses Protein fehlt, replizieren *in vitro* wie Wildtyp-Viren.

1.2.2. Replikation der Foamyviren

Verglichen mit der Replikationsstrategie der Orthoretroviren weist die der Foamyviren einige Besonderheiten auf und ähnelt in einigen Aspekten sogar der Replikationsstrategie der Hepadnaviren (Linial, 1999). Der Prototyp der Foamyviren, PFV, unterscheidet sich von den konventionellen Retroviren z.B. durch den ungewöhnlichen Zeitpunkt der reversen Transkription (Abb. 7). Während bei allen anderen Retroviren die RNA nach Infektion einer Zelle in DNA umgeschrieben wird, erfolgt dieser Prozess bei PFV (analog zu den Hepadnaviren) in einer späten Phase, d.h. grösstenteils vor der Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel (Moebes *et al.*, 1997, Yu *et al.*, 1999). Dies hat zur Folge, dass es sich bei dem funktionalen infektiösen Genom um DNA handelt. Ein Teil der viralen DNA in PFV-infizierten Zellen enthält einzelsträngige Lücken, wahrscheinlich aufgrund der Positiv-Strang DNA-Initiation an zwei Polypurintrakten (Kupiec *et al.*, 1988, Tobaly-Tapiero *et al.*, 1991). Weiterhin konnte von Yu und Mitarbeitern (1999) gezeigt werden, dass reife extrazelluläre Viruspartikel nicht nur DNA enthalten, sondern auch RNA. Da über die Effizienz der reversen Transkription bisher nichts bekannt ist, könnte die virale RNA auf abgebrochene Reaktionen während der reversen Transkription zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu der Integration bei den Orthoretroviren kommt es bei der Integration der FV-DNA zu einer asymmetrischen Prozessierung (Enssle *et al.*, 1999). Diese Prozessierung verursacht eine Spaltung am 3'-Ende, die das terminale CAAT-Motiv bei der Integration zu CA reduziert, dagegen bleiben die Nukleotide am 5'-Ende (TGTG) vollständig erhalten. Vier Basenpaare der zellulären DNA werden verdoppelt. Eine weitere Ausnahme besteht in der Fähigkeit von PFV, zwei verschiedene Replikationswege zu verfolgen (Heinkelein *et al.*, 2000). Nach dem Zusammenbau der Kapside im Zytoplasma stattgefunden hat, verlassen die Virionen die Zelle als infektiöses exogenes Retrovirus.

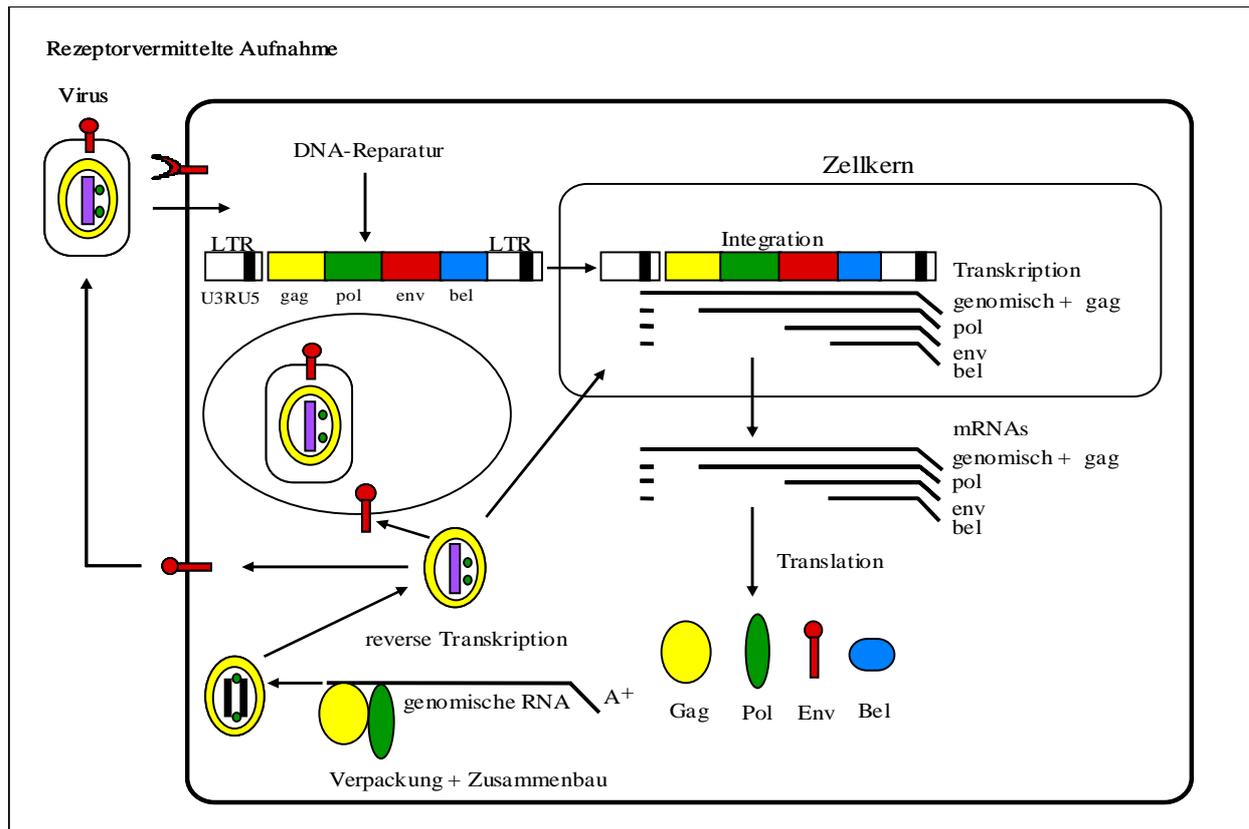


Abb. 7: Replikationszyklus der Foamyviren.

Nach der Adsorption der Viruspartikel an den noch unbekanntem Rezeptor erfolgt die Freisetzung des schon existierenden DNA-Genoms. Die Virus-DNA wandert in den Zellkern und integriert dort in das Wirtszellgenom. Die reverse Transkription erfolgt erst zu einem späten Zeitpunkt des Replikationszyklus (links). Der Knospungsprozess erfolgt im Gegensatz zu den konventionellen Retroviren hauptsächlich an den intrazellulären Membranen (PFV). Nur bei dem kürzlich beschriebenen EFV konnte gezeigt werden, dass die Partikel hauptsächlich an der Plasmamembran knospen. Als „recycling“ ist die intrazelluläre Retrotransposition dargestellt, bei der die viralen DNA-Genome zwar in Kapside eingelagert werden, jedoch nicht exportiert werden sondern stattdessen in den Zellkern zurückwandern, um dort wieder in das Genom zu integrieren (nach Rethwilm, 2003).

Alternativ kann die neu entstandene DNA in den Zellkern importiert werden, um dort in das Wirtszellgenom zu integrieren (Abb. 7). Dieser Mechanismus war bisher nur von den Retrotransposons bekannt (Boeke & Stoye, 1997, Heidmann & Heidmann, 1991, Wilkinson *et al.*, 1994). Weiterhin ähnelt diese Art des Replikationsmechanismus dem der Hepadnaviren, die ebenfalls ihr Genom in den Zellkern rezirkulieren können, allerdings normalerweise nicht ins zelluläre Genom integrieren (Ganem, 1996, Nassal & Schaller, 1993).

1.2.3. Das Feline Foamyvirus (FFV)

Früher auch als *Feline Syncytium-Forming Virus* (FSFV) bezeichnet, wurde FFV erstmals 1969 aus gesunden und erkrankten Hauskatzen isoliert (Riggs *et al.*, 1969). Da experimentelle Infektionen von Hauskatzen mit dem Virus nicht zum Auftreten von klinischen Symptomen führen, gilt FFV generell als apathogen. Erstmals vollständig kloniert und sequenziert wurde FFV 1997 (Helps & Harbour, 1997, Winkler *et al.*, 1997).

Auch FFV verfügt über die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* und über die akzessorischen Gene, wie sie für Primaten-FV beschrieben sind. Die Expression von FFV-Gag erfolgt wie bei den FV der Primaten von einer ungespleissten genomischen mRNA (Bodem *et al.*, 1998a), das Protein ist jedoch mit 514 AS kleiner als die Gag-Proteine der Primaten-FV (Winkler *et al.*, 1997). Ähnliche Proteingrößen weisen nur die Gag-Proteine von BFV (Bovines FV) und EFV (Equines FV) auf (Tobaly-Tapiero *et al.*, 2000). Der aminoternale Bereich des FFV-Gag-Proteins weist im Vergleich zu den Gag-Proteinen von PFV und BFV mehrere konservierte Regionen auf. Die Funktion einer Prolin-reichen Sequenz, die in den FV der Primaten vorhanden ist, jedoch nicht in FFV, ist noch unbekannt. Denkbar ist, dass innerhalb der FV diese Bereiche unterschiedlich prozessiert werden (Winkler *et al.*, 1997). Die drei GR-Boxen wie sie für PFV beschrieben wurden, sind im FFV- oder BFV-Gag nicht konserviert (Schliephake & Rethwilm, 1994, Winkler *et al.*, 1997, Yu *et al.*, 1996b). Ähnlich wie bei PFV erfolgt die Prozessierung von FFV-Gag zu p51 und p48. Das kürzere Protein entspricht dabei dem prozessierten Gag-Vorläuferprotein, von dem ein kleines Protein (p3) abgespalten wurde (Alke *et al.*, 2000, Zemba *et al.*, 2000). Die genaue Lage der Spaltstelle in FFV-Gag ist jedoch noch unbekannt.

Auch die Synthese des FFV-Pol-Proteins verhält sich wie die der Primaten-FV. Das FFV-Pro-Pol-Vorläuferprotein besitzt ein Molekulargewicht von 127 kDa und wird durch die virale Protease in seine Untereinheiten prozessiert. Neben den oben genannten Proteinmotiven weist die FFV-Protease jedoch ein ungewöhnliches katalytisches Zentrum auf. Während das aktive Zentrum der bekannten FV die Sequenz Asp-Ser-Gly-Ala besitzt, findet man bei FFV Glutamin statt Glycin (Winkler *et al.*, 1997). Jedoch findet sich in der Prozessierung von FFV Gag und Pol im Vergleich zu PFV kein Unterschied. Eine genaue Analyse der Spaltstellen und Domänengrenzen in Pol ist bisher für FFV noch nicht durchgeführt worden, es ist aber aufgrund der relativ hohen Sequenzhomologie von ca. 60 % zu PFV zu vermuten, dass diese an ähnlichen Positionen lokalisiert sind.

Das FFV-Env-Protein ist in Grösse und Struktur der Domänen dem PFV sehr ähnlich und wird von einem gespleissten Transkript exprimiert (Bodem *et al.*, 1998a). Die Oberflächendomäne

(SU) ist 37 bis 40% und die Transmembrandomäne (TM) 49 bis 53% identisch zu den korrespondierenden Domänen der anderen FV. Bei dem 16,5 kDa-Leaderpeptid handelt es sich wie bei PFV um ein Virus-assoziiertes Protein (Wilk *et al.*, 2001). Wilk und Mitarbeiter konnten unter anderem zeigen, dass *in vitro* die N-terminale Region des Leaderpeptids mit der N-terminalen Region des Gag-Proteins interagiert. Für diese Interaktion sind zwei Tryptophanreste im N-terminalen Bereich des Leaderpeptids verantwortlich.

Der FFV-Transaktivator Tas weist zu den übrigen foamyviralen Transaktivatoren nur eine Sequenzhomologie von 17 bis 23% auf (Winkler *et al.*, 1997). Das Protein besteht aus 209 Aminosäuren und ist um 100 Aminosäuren kleiner als PFV-Tas. Wie auch bei PFV beschrieben, sind die FFV-Promotoren absolut auf die Transaktivierung durch das homologe Tas angewiesen (Baunach *et al.*, 1993, Löchelt *et al.*, 1991, Yu & Linial, 1993). Das *bel-2*-Gen weist zu den korrespondierenden Regionen in PFV und SFV nur eine Homologie von ca. 18% bzw. 23% auf. Das Protein besteht aus 313 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 36 kDa. FFV Bet besteht aus 388 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 43 kDa und das Protein ist für eine effiziente Virusreplikation entscheidend. So bewirken Mutationen in den Genen *bel-2* und *bet* bei FFV im Unterschied zu PFV eine deutliche Reduktion der viralen Infektiosität (Alke *et al.*, 2001). Die Funktionen von Bel-2 und Bet sind dessen ungeachtet bis heute noch nicht geklärt.

1.3. Fragestellung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, nehmen die Foamyviren eine besondere Rolle innerhalb der Gruppe der Retroviren ein. So unterscheiden diese sich nicht nur in Bezug auf die Replikationsstrategie, sondern auch in Aufbau des Genoms und Zeitpunkt der reversen Transkription. Seit der Charakterisierung von FFV durch Winkler und Mitarbeiter sowie Helps und Harbour (1997) sind nicht nur Gemeinsamkeiten mit den übrigen Foamyviren entdeckt worden (Tab. 2).

In dieser Arbeit wurde neben der detaillierten Untersuchung der Replikationsstrategie von FFV auch das funktional relevante Virusgenom identifiziert. Dazu wurde nach der Herstellung von molekularen infektiösen FFV-Klonen die Infektiosität dieser Konstrukte *in vitro* analysiert und mit den molekularen Klonen von PFV und SFV-1 verglichen. Mit Hilfe von Pseudotypisierungsexperimenten wurden Aussagen über die Verpackung von FFV-Kapsiden in Gegenwart des homologen bzw. heterologer Hüllproteine getroffen.

Merkmale	PFV	FFV
virale Nukleinsäure	dsDNA < RNA 1:10	?
Funktionales Genom	DNA	?
Promotoren	LTR und IP	LTR und IP
Transaktivierung der Genexpression	Tas induziert Expression von IP und LTR	Tas induziert Expression von IP und LTR
virale Proteine	Gag, Pol, Env, Tas und Bet	Gag, Pol, Env, Tas und Bet
<u>Merkmale der Proteine:</u>		
Gag	648 AS (nukleär)	514 AS (perinukleär)
Gag-Reifung	p71 und p68	p51 und p48
NS-bindende Motive in Gag	3 GR-Boxen	keine konservierten GR- reichen Regionen
Pol	Katalyt. Zentrum der Protease: DSGA	Katalyt. Zentrum der Protease: DSQA
Env	Protein für den Partikelexport essentiell	?
Bet	Für die Virusreplikation nicht erforderlich	Benötigt für eine effiziente Virusreplikation
Intrazelluläre Retrotransposition	ja	?

Tab. 2: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen PFV und FFV.

Mit Fragezeichen versehene Felder demonstrieren bisher unbekannte Merkmale, die im Verlauf dieser Arbeit geklärt werden sollen.

Um Hinweise auf den physikalischen Partikelexport in An- oder Abwesenheit eines Hüllproteins zu bekommen, wurden entsprechende Experimente durchgeführt und die diesbezüglichen Daten denen von PFV und SFV-1 gegenübergestellt. Da über die Funktion des Bet-Proteins noch relativ wenig bekannt ist, wurde ein möglicher Einfluss dieses Proteins auf die FFV-Replikation untersucht. In Anlehnung an durchgeführte Analysen bei PFV wurde der Zeitpunkt der reversen Transkription bestimmt werden sowie die Fähigkeit zur intrazellulären Retrotransposition untersucht.

Die Charakterisierung der Nukleinsäuren nimmt einen zentralen Teil der vorliegenden Arbeit ein. Ziel war es, mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden eine quantitative Bestimmung der

isolierten Nukleinsäuren im Vergleich zu anderen Foamyviren bzw. Retroviren vorzunehmen. Die Isolierung der Nukleinsäuren extrazellulärer Partikel und die Untersuchung ihrer Struktur sowie ihrer möglichen Infektiosität schlossen sich an.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Hersteller/Vertrieb

Acrylamid	Roth
AEC (3-Amino-9-Ethyl-carbazol)	Sigma
Agarose	Biozym
Ampizillin	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bisacrylamid	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gerbu
Bromphenolblau (BPB)	Sigma
Chloroform	Roth
Desoxynukleotide	MBI-Fermentas
Dimethylformamid	Merck
EDTA (Titriplex [®] III)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco-BRL
Glukose	Merck
Glutardialdehyd	Merck
Glyzerol	ICN Biomedicals
Glyzin	Roth
Geneticin	Gibco-BRL
Hepes	Roth
Isopropanol	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Kaliumferrizyanid	Merck
Kaliumferrozyanid	Merck

LB-Agar	Gibco-BRL
LB-Broth Base	Gibco-BRL
Magnesiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Lasana
Methanol	Merck
MOPS	Fluka
Natriumazetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumbutyrat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Phenol	Roth
Phenol/Chloroform	Roth
Polybrene (Hexadimethrin-Bromid)	Sigma
Radioaktive Nukleotide	Amersham Biosciences
Rainbow-Marker	Amersham Biosciences
Saccharose	Merck
TEMED	Roth
Tricin	Roth
Tris-Base	Roth
Triton-X-100	Merck
Trypsin	Gibco-BRL
Tween 20	Serva
X-Gal	Sigma
Zeocin	Cayla

2.1.2. Enzyme und Reaktionspuffer

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	MBI-Fermentas
Klenow-Polymerase	MBI-Fermentas
Klenow-Polymerase exo ⁻	New England Biolabs

Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas
RNase A	Roth
MuLV-Reverse Transkriptase	Gibco-BRL
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas
T4-DNA-Polymerase	MBI-Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Promega
Taq-Extender-™PCR Additive	Stratagene

Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer werden in Kapitel Methoden (2.2.) erläutert.

2.1.3. Nukleinsäuren

2.1.3.1. Molekulargewichtstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI-Fermentas
GeneRuler™ 100 Bp DNA Ladder	MBI-Fermentas
GeneRuler™ 50 Bp DNA Ladder	MBI-Fermentas
λ-DNA	MBI-Fermentas

2.1.3.2. Oligonukleotide

Die für die Klonierungsarbeiten verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden kommerziell von der Fa. MWG hergestellt und auf eine Konzentration von 10 oder 20 pmol/μl eingestellt (Tab. 3). Sämtliche Primer, die für die Sequenzierung des molekularen FFV-Klons eingesetzt wurden, sind im Anhang aufgelistet.

Oligo-bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Bemerkung
#713	TGGCTTGGAAGATCTACAGCCGC	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons pChatul-1, enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>BgIII</i>
#714	TCTCCGTCTGGAGGAAGAGG	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons

		pChatul-1
#715	TGTGATGATCTTGAAGGAATGG	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons pChatul-1
#716	TGGGATCCTGAGATGTTAACC	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons pChatul-1, enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>HpaI</i>
#773	TGGCGCCCGGGCCTAACTCCGCC CATCCCGC	Amplifikation des SV40 ori aus dem Plasmid pEGFP-C1, enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>EheI</i>
#774	TCGGCGCCGATATCTGCAAAAGC CTAGGCCTCCAA	Amplifikation des SV40 ori aus dem Plasmid pEGFP-C1, enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>EheI</i>
#788	TGTACGGGAGCTCTTCTCACAGA CTTGGC	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons pChatul-3, enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>SacI</i>
#789	TCCCCACGTGTAGAGAAACACCA CTC	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons pChatul-3; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>PmlI</i>
#790	TCCTTGGACTGGACGCGTGAAGA AGAACTTGC	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons pChatul-3; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>MluI</i>
#791	TGCAAGTTCTTCTCACGCGTCCA GTCCAAGG	Primer zur Herstellung des infektiösen FFV-Klons pChatul-3; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>MluI</i>
#991	TAATAGGGCCAGTAATACCG	FFV-gag Primer, für Quantifizierung verwendet
#993	TGTATATTAAGGGCTAGCATAGT G	Primer zu Herstellung eines FFV Kompetitor-Plasmids; bindet an die FFV-gag-Region; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>NheI</i>
#994	TCGCTAGCAGCCTCAGCGCTACG G	Primer zu Herstellung eines FFV Kompetitor-Plasmids; bindet an die FFV gag-Region; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>NheI</i>
#1139	TGAGATCTCCCGATCCCCTATGG TGC	Primer zur Herstellung eines FFV-Pol-Expressionsplasmids; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>BgIII</i>
#1140	CCTCTCGAATCTCTCCAAGCTGGA GAGTCTCAATC	Primer zur Herstellung eines FFV-Pol-Expressionsplasmids
#1141	GAGACTCTCAGCTTGGAGAGAT TCGAGAGGACC	Primer zur Herstellung eines FFV-Pol-Expressionsplasmids
#1142	TACAATCTGGATATCAGGCTTTG C	Primer zur Herstellung eines FFV-Pol-Expressionsplasmids; enthält die

		Erkennungsschnittstelle für <i>EcoRV</i>
#1158	TCTTCTCACAGACTTGGCTG	FFV-LTR Primer, für Quantifizierung verwendet
#1159	TACCTGGGATAGGTTAGTCCTC	FFV-LTR Primer, für Quantifizierung verwendet
#1160	TCCAATTTATTTGATCTGCTAGCA AGG	Primer zu Herstellung eines FFV Kompetitor-Plasmids; bindet an die FFV LTR-Region; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>NheI</i>
#1161	TGAGTGGTGTTCGCTAGCCCTG GGG	Primer zu Herstellung eines FFV Kompetitor-Plasmids; bindet an die FFV LTR-Region; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>NheI</i>
#1164	TGAATAGCCCTGGGTTGTTTACTG	FFV-pol Primer, für Quantifizierung verwendet
#1178	TAAAACCAACAGCACTCGAGCAT AATGG	Primer zur Herstellung eines FFV-Env-Expressionsplasmids; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>XhoI</i>
#1179	CCAAACCAGAACTCGAGTGAGA GTTA	Primer zur Herstellung eines FFV-Env-Expressionsplasmids; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>XhoI</i>
#1202	TATCCTGTTGTATAACTAGC	FFV-pol Primer, für Quantifizierung verwendet
#1263	TTCCTCCTCCATTTCTTGGG	FFV-gag Primer, für Quantifizierung verwendet
#1367	TATCGCCAGTTGCTCCTAGCGGGT CTC	FrMuLV-gag Primer, für Quantifizierung verwendet
#1368	TTCTTTGCAGTAGGCACACTGGTC GTG	FrMuLV-gag Primer, für Quantifizierung verwendet
#1415	TACAAGACCCTAGGGAATG	Primer zur Herstellung einer Deletion im FFV-Bet Leserahmen; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>AvrII</i>
#1416	GTTCAAGAAGAGTAGGCTC	Primer zur Herstellung einer Deletion im FFV-Bet Leserahmen
#1417	AGAATGTAACCTAGGAAATTGG	Primer zur Herstellung einer Deletion im FFV-Bet Leserahmen; enthält die Erkennungsschnittstelle für <i>AvrII</i>

Tab. 3: Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide.

Die Bezeichnung der Oligonukleotide (Spalte 1) erfolgte durch Vergabe von Nummern. In der mittleren Spalte ist die 5'-3'-Sequenz aufgeführt. In der Spalte für Bemerkungen ist angegeben, ob und welche Restriktionsschnittstellen die Oligonukleotide enthalten und für welchen Zweck sie eingesetzt wurden.

2.1.4. Plasmide

#94 (Helps & Harbour, 1997)

Env1 (Helps & Harbour, 1997)

#F3	(Helps & Harbour, 1997)
pcHSRV2	(Moebes <i>et al.</i> , 1997)
pSFV-1	(Mergia & Wu, 1998)
pHIT60	(Soneoka <i>et al.</i> , 1995)
pcSFG-NLS <i>lacZ</i>	(Ferry <i>et al.</i> , 1991)
pGJ3/U3E	Gérgely Jármy
pJR4	Jacqueline Roy
pMD05	Marco Dressler
pMH01	Martin Heinkelein
pMH02	Martin Heinkelein
pMH92	(Heinkelein <i>et al.</i> , 2000)
pMH120	Martin Heinkelein
pMR02	Matthias Rammling
pcAMS/U3EN	(Heinkelein <i>et al.</i> , 2000)
pczFFVenv	Marcus Picard-Maureau
pCenv-1	(Lindemann <i>et al.</i> , 1997)
pSFV-1-Env	(Picard-Maureau <i>et al.</i> , 2003)
pciSFV-1-Env	Dana Westphal
pcDWF002	Dana Westphal
pczDWP002	Dana Westphal
pcDWS002	Dana Westphal
pciGALV-Env	Maribeth V. Eiden; NIH, Maryland
pcziMEA	(Picard-Maureau <i>et al.</i> , 2003)
pcVG-wt	(Pietschmann <i>et al.</i> , 1999)
pcDNA3.1	Invitrogen
pCRII-TOPO	Invitrogen
pEGFP-C1	BD Clontech

2.1.5. Kompetente Bakterien

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Stratagene

JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>]	Promega
TOP10	F' <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(Str^R)</i> , <i>endA1, nupG</i>	Invitrogen

Tab. 4: Für Klonierungen und Retransformationen verwendete chemisch kompetente Zellen.

Im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen TOP10-Zellen, wurden die Bakterienstämme DH5α und JM109 im Labor manuell kompetent gemacht.

2.1.6. Zelllinien

BHK-21	Hamsternierenfibroblasten (ATCC: CRL-8303)
BHK/LTR(PFV) <i>lacZ</i>	BHK-21-Zellen mit <i>lacZ</i> -Gen unter der Kontrolle der PFV-LTR (Schmidt & Rethwilm, 1995); Selektion mit 1 mg/ml G418 (Neomycin; Invitrogen)
BHK/LTR(SFV-1) <i>lacZ</i>	BHK-21-Zellen mit <i>lacZ</i> -Gen unter der Kontrolle der SFV-1-LTR; Selektion mit 1 mg/ml G418
CrFK	Crandell-Feline-Kidney-Zellen (Katzennierenzellen, ATCC: CCL-94)
CrFK/LTR(FFV) <i>lacZ</i>	Crandell-Feline-Kidney-Zellen mit stabil integriertem <i>lacZ</i> -Gen unter der Kontrolle der FFV-LTR; Selektion mit 0,4 μg/ml Zeocin
HeLa	Humane Epithelkarzinomzelllinie (ATCC: CCL-2)
HT1080	Humane Fibrosarkomzelllinie (ATCC: CRL-12012)
Mus Dunni	Mausfibroblastenzellen (ATCC: CRL-2017)
293	Humane embryonale Nierenzellen (ATCC: CRL-1573)
293T	Humane embryonale Nierenzellen mit

SV40 grossem T-Antigen (DuBridge *et al.*, 1987), Selektion mit 0,5 mg/ml G418

2.1.7. Antiseren und andere Nachweisreagenzien

α FFV-Gag-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das FFV-Gag-Protein
α FFV-Pol-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das FFV-Pol-Protein
α FFV-LP-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das FFV-Leaderpeptid
α FFV-Bet-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das FFV-Bet-Protein
α PFV-Gag-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das PFV-Gag-Protein
α PFV-LP-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das PFV-Leaderpeptid
α SFV-1-Gag-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das SFV-1-Gag-Protein
α SFV-1-LP-Serum	Polyklonales Kaninchenserum gegen das SFV-1-Leaderpeptid
α Rabbit IgG Peroxidase-Konjugat	Polyklonales Ziegenserum gerichtet gegen Kaninchen IgG konjugiert mit einer Peroxidase (HRP)
Maus α MuLV Friend-Env-Hybridoma-überstand #720	Ulf Dittmer; Universität Essen
Ziege α Maus Ig-HRP (GT α Maus Ig/HRP)	DAKO

2.1.8. Sonstige Materialien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$	Amersham Biosciences
Agfa-Curix-Röntgenfilm	AGFA

AutoSeq™G-50-Säulchen	Amersham Biosciences
DNA Sequencing Kit	ABI-PRISM
LightCycler – FastStart DNA Master	Roche Diagnostics
SYBR Green I	
Megaprime™ DNA Labelling Kit	Amersham Biosciences
Nitrozellulosemembran (NYTRAN)	Schleicher & Schuell
NucleoSpin® Extract-Kit	Macherey-Nagel
Nylonmembran (HYBOND, HYBOND-XL)	Amersham Biosciences
Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen
Plasmid-Mini-Kit	Qiagen
PolyFect® Transfection Reagent	Qiagen
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
TOPO-TA-Cloning®-Kit	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco-BRL
G418	Gibco-BRL
ECL-Detection-Kit	Amersham Biosciences

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Methoden

2.2.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation geringster Mengen definierter DNA-Abschnitte aus Untersuchungsmaterial (z.B. Vollblut, Serum, Zellkultur). Der Prozess der PCR beruht auf einem einfachen System, das aus drei Schritten besteht und sich zyklisch wiederholt: aus einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Elongationsschritt. Während der Denaturierung bei 94°C trennen sich zunächst die beiden Stränge der DNA-Matrize. Anschliessend wird die Temperatur auf Hybridisierungstemperatur gesenkt, so dass es zur Anlagerung der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA-Matrize kommt. Danach wird die Temperatur auf 72°C erhöht, wobei dieser DNA-Abschnitt durch die thermostabilen Polymerase verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen DNA-Matrize exakt gleicht. Durch die zyklische Wiederholung dieses Vorganges kommt es selektiv zu einer exponentiellen Vermehrung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz.

Der Ansatz für die Polymerasekettenreaktion setzte sich zusammen aus je 1 µl (20 pmol) der flankierenden Primer, 5 µl 10 mM dNTPs, 5 µl 10x-PCR-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, etwa 100 ng cDNA als Matrize und 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (5U/µl; Promega) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Als Standardprogramm wurden 35 Zyklen gewählt mit je 10 Sek. bei 94°C, 45 Sek. bei 58°C und 1 Min./kBp bei 72°C.

2.2.1.2. Agarosegel-Elektrophorese

Für weitere Klonierungsarbeiten war es notwendig, die amplifizierte DNA aufzureinigen und von den Bestandteilen der PCR-Reaktion zu trennen. Für diese Aufreinigung bedient man sich der Agarose-Gelelektrophorese. Zur Auftrennung wurden diese mit 6x Bromphenolblau-Probenpuffer versetzt und auf ein 0,8 % Agarosegel/1x TAE-Puffer mit 10 µg/µl Ethidiumbromid geladen. Die Auftrennung erfolgte bei einem Spannungsbereich von 5 bis 15

Volt/cm. Falls nicht anders erwähnt, wurde eine 1 kb-Leiter (MBI) als Grössenmarker eingesetzt. Die DNA/Ethidiumbromid-Komplexe wurden auf einem Transilluminator oder mit einer UV-Handlampe sichtbar gemacht.

6x Bromphenolblaupuffer: 40 g Saccharose
0,125 g Bromphenolblau
1 ml 10 % SDS
mit A. bidest auf 100 ml auffüllen

50x TAE-Puffer: 242 g Tris-Base
57,1 ml Eisessig
37,2 g Na₂EDTA·2H₂O
auf 1 l mit A. bidest auffüllen

2.2.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution der gewünschten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des QIAEX-II-Kit oder des NucleoSpin[®] Extract-Kit. Dazu wurden die Fragmente mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und die DNA mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die anschliessende Isolierung der DNA aus der Agarose erfolgte nach den Angaben der Hersteller.

2.2.1.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung eines PCR-Fragmentes in einen geeigneten Vektor wurde eine Ligrationsreaktion verwendet. Ligation ist die Bezeichnung für die Verknüpfung der Enden zweier Nukleinsäure-Moleküle mit Hilfe einer Ligase. DNA-Ligasen katalysieren die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden, freien 3'-Hydroxylgruppe.

Falls nicht anders beschrieben wurden die Ligationen in 20 µl angesetzt. Die Menge der eingesetzten Vektor-DNA betrug etwa 100 ng. Ein ca. 4-facher Überschuss an Insert-DNA

wurde dazupipettiert. Pro Ansatz wurden 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase, LC zugegeben. Um eine eventuelle Religation des Vektors auszuschliessen, wurden zusätzliche Kontrollligationen angesetzt. Die Kontrollligation enthielt ebenfalls Vektor, Puffer und Ligase, allerdings keine Insert-DNA. Die Reaktion wurde ÜN bei 14°C durchgeführt.

2.2.1.5. Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning[®]-Kit (Invitrogen)

Ein weiterer Klonierungsansatz beruht auf der Entdeckung von (Clark, 1988), dass die Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern mit Hilfe einer unspezifischen, terminalen Transferase-Aktivität einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anfügt. Durch die Konstruktion eines linearen Vektors mit überhängenden 3'-Thymidin-Resten lassen sich PCR-Fragmente sehr effizient klonieren. Diese Methode wird daher als TA-Klonierung bezeichnet. Eine Variante dieser Klonierungsstrategie bietet der TOPO-TA-Cloning[®]-Kit (Invitrogen). Statt einer Ligase wird hier ein mit Topoisomerase I „aktivierter“ TA-Vektor (pCR[®]II-TOPO) verwendet (Abb. 8), der in der unten beschriebenen Form geliefert wird.

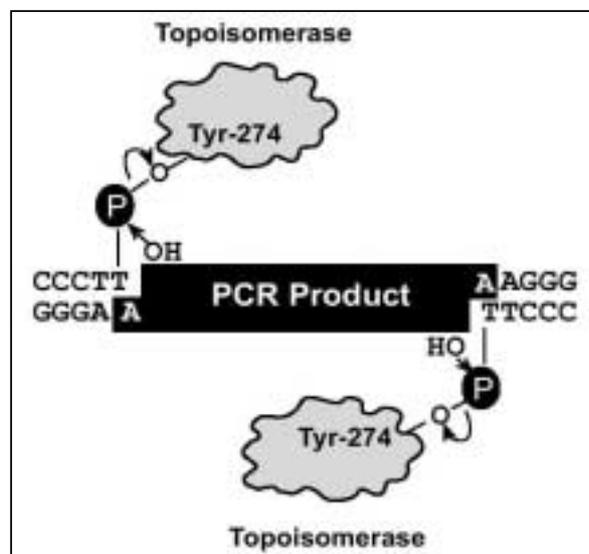


Abb. 8: Prinzip des TOPO-TA-Cloning-Kit.

Das PCR-Produkt mit überhängenden 3'-Enden (schwarz) wird flankiert von der doppelsträngigen Vektor-DNA. Diese verfügt vor dem Inserieren des PCR-Fragments über eine kovalent gebundene Topoisomerase I (grau). Abbildung entnommen aus dem Handbuch des Kits.

Es ist bekannt, dass die Topoisomerase I des Vaccinia-Virus an spezifische Stellen von dsDNA bindet und dort die Phosphodiester-Bindung nach 5'-CCCTT in einem Strang spaltet. Die

freigewordene Energie bleibt in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphatrest des gespaltenen DNA-Stranges und einem Tyrosylrest (Tyr-274) erhalten. Ein freies 5'-Hydroxylende ist in der Lage die Topoisomerase unter Verknüpfung von DNA-Enden freizugeben.

Für die Klonierung wurden kurz zuvor mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Fragmente verwendet, die wenn nötig noch über ein Gel aufgereinigt wurden. Pro Reaktionsansatz wurden 0,5 bis 1 µl Vektor eingesetzt. Dazu wurden 0,4 bis 4 µl PCR-Produkt und zusätzlich 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) gegeben. Die Reaktion wurde gemischt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktion nach Angaben des Herstellers direkt in chemisch kompetente Bakterien transformiert (TOP10, Invitrogen).

2.2.1.6. Transformation kompetenter Zellen

Unter Transformation versteht man das Einbringen freier DNA in kompetente Bakterien. Mandel und Higa beobachteten 1970, dass man Bakterien, die mit kaltem CaCl₂ und kurzem Erhitzen behandelt worden waren, mit Bakteriophagen-DNA transformieren kann (Mandel & Higa, 1970). Zwei Jahre später zeigten Cohen und Mitarbeiter, dass *E.coli*-Zellen nach einer CaCl₂-Behandlung auch Plasmid-DNA gut aufnehmen können (Cohen *et al.*, 1972). In den folgenden Jahren hat man herausgefunden, dass *E.coli*-Zellen und Plasmid-DNA bei niedriger Temperatur (0 bis 5°C) und in Gegenwart von Kalziumionen eine gute Wechselwirkung zeigten. Ein anschliessender Hitzeschock (37 bis 45°C) ist zwar wichtig, aber nicht unerlässlich. Beschriebene Standardverfahren liefern ca. 10⁷ bis 10⁹ Transformanden.

Für eine Transformation wurden die zu transformierenden Bakterien (siehe Tab. 4) auf Eis aufgetaut. Zu den pro Ansatz verwendeten 100 µl Bakteriensuspension wurden 2 µl β-Merkaptoethanol zupipettiert. Anschliessend wurden 100 ng Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz zugegeben und 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde durch einen 1-minütigen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad induziert und die Bakteriensuspension anschliessend 2 Min. auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 500 µl antibiotikafreies SOC-Medium hinzugefügt und eine Std. bei 37°C geschüttelt. Pro Transformationsansatz wurden je 10 % und 90 % der Zellen auf LB-Amp⁺-Platten ausgestrichen und ÜN im 37°C-Brutschrank inkubiert. Ampizillin-Resistenzgene, die bei den meisten Plasmiden als Selektionsgene dienen, ermöglichen den transformierten Bakterien das Wachstum auf Ampizillin-haltigen LB-Platten oder in LB-Amp⁺-Medien (Endkonzentration des Ampizillins 100 µg/ml).

SOC-Medium:	95 ml LB-Medium 1 ml 1 M MgCl ₂ 1 ml 1 M MgSO ₄ 2 ml 1 M Glukose 0,2 µm sterilfiltrieren
LB-Medium:	20 g LB-Broth Base (Lennox L broth base, Invitrogen) auf 1 l mit A. bidest auffüllen 15 Min. bei 121°C autoklavieren

2.2.1.7. Plasmid-Minipräparation

Die Aufbereitung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien zu analytischen Zwecken wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Mit Hilfe der so genannten „TENS“-Methode kann so eine sehr grosse Anzahl bakterieller Klone in relativ kurzer Zeit untersucht werden.

Das Animpfen eines Bakterienklons erfolgte mit einer sterilen Spitze, mit der die Kolonie vorsichtig von der LB-Platte abgestrichen und dann in ein Röhrchen, das 3 ml TB-Amp⁺-Medium (TB-Medium + 100 µg/ml Ampizillin) enthielt, überführt wurde. Diese Kultur wurde ÜN bei 37°C geschüttelt. Durch das Abzentrifugieren von 1,5 ml Zellsuspension am folgenden Tag wurden zuerst die Bakterien pelletiert (Zentrifugation für 3 Min. bei 13000 rpm), die anschliessend in 50 µl A. bidest resuspendiert und in 300 µl TENS für 10 Min. bei Raumtemperatur lysiert wurden. Die Denaturierung der Proteine sowie der Nukleinsäuren erfolgte unter alkalischen Bedingungen. Dieses Lysat wurde anschliessend mit 3 M Natriumazetat (pH 5,2) für 5 Min. auf Eis neutralisiert. Bei dieser hohen Salzkonzentration und dem niedrigen pH-Wert präzipitieren die bakteriellen Proteine und Zelltrümmer mitsamt der chromosomalen DNA als SDS-Komplexe, während die Plasmid-DNA in nativer Form in Lösung verbleibt und abgetrennt werden kann. Die Trennung erfolgte durch eine Zentrifugation für 10 Min. bei 13000 rpm. Der plasmidhaltige Überstand wurde danach in ein sauberes Eppendorfröhrchen überführt, die Plasmid-DNA und RNA durch Zugabe von 400 µl Isopropanol ausgefällt und durch eine weitere Zentrifugation von 20 Min. bei 13000 rpm pelletiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde anschliessend einmal mit 70 % EtOH gewaschen, in der

Vakuumzentrifuge getrocknet und in der Regel in 30 µl TE/RNaseA-Puffer resuspendiert. Für nachfolgende analytische Restriktionsverdau konnten 2 µl der DNA eingesetzt werden.

5x TB-Medium:	117,5 g Terrific Broth (Invitrogen) mit A. bidest auf 500 ml auffüllen 10 ml Glycerol 15 Min. bei 121°C autoklavieren
TENS:	2 ml 1 M Tris-Base, pH 8,0 400 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 2 ml 10 N NaOH 10 ml 10 % SDS mit A. bidest auf 200 ml auffüllen
3 M Natriumazetat:	81,6 g Natriumazetat in wenig A. bidest aufnehmen auf pH 5,2 mit Eisessig einstellen auf 200 ml mit A. bidest auffüllen
TE/RNaseA-Puffer:	2,5 ml 1 M Tris-Base, pH 8,0 500 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 auf 250 ml mit A. bidest auffüllen für den Gebrauch 1/100 2 mg/ml RNaseA dazugeben

2.2.1.8. Plasmid-Maxipräparation

Um grössere Mengen spezifischer Plasmid-DNA mit einem hohen Reinigungsgrad zu gewinnen, wurde der Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet, bei dem Ausbeuten an Plasmid-DNA bis zu 700 µg möglich waren. Die mit Hilfe dieser Methode gewonnene Plasmid-DNA erweist sich als relativ rein und kann für Transfektionen, Sequenzierungen oder für nachfolgende Klonierungen eingesetzt werden.

Für diese Aufreinigung wurden 100 ml TB-Amp⁺-Medium mit 5-10 µl einer ÜN-Kultur inokuliert und ÜN bei 37°C in einem Bakterien-schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die

Bakteriensuspension in Zentrifugenbecher überführt und 10 Min. bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, JA10-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1/RNaseA resuspendiert. Daraufhin wurde 10 ml Puffer 2 dazugegeben und die Lösung vorsichtig gemischt. Die alkalische Lyse erfolgte 5 Min. bei Raumtemperatur. Die Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 10 ml Puffer P3, verbunden mit einer Inkubation der Lösung für 20 Min. auf Eis. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer und der chromosomalen DNA erfolgte bei 8000 rpm für 30 Min. bei 4°C (Beckmann-Zentrifuge, JA10-Rotor). In der Zwischenzeit wurden die QIAGEN-tip-100 Säulen mit jeweils 10 ml QBT-Puffer äquillibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde auf die Säulen gegeben. Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen und schliesslich mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und über eine weitere Zentrifugation von 90 Min. bei 4400 rpm und 4°C (Multifuge 4 KS-R, Heraeus) wurde die Plasmid-DNA schliesslich pelletiert. Das DNA-Pellet wurde einmal kurz mit 10 ml eiskaltem 70 % EtOH gewaschen und anschliessend getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 200 µl TE-Puffer oder A. bidest resuspendiert, photometrisch vermessen und mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

2.2.1.9. Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der präparierten DNA erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Dazu wurde die zu vermessende DNA in einer Quarzglasküvette mit A. bidest im Verhältnis 1:100 verdünnt. Als Referenzprobe wurde eine Küvette mit A. bidest verwendet. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der gemessenen optischen Dichte bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = OD_{260} \times V \times F \quad \text{mit} \quad c = \text{Konzentration der Ausgangslösung}$$

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA)

Aus dem Verhältnis der $OD_{260 \text{ nm}}$ und der $OD_{280 \text{ nm}}$ erhält man ausserdem eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung. Bei proteinfreien Nukleinsäurelösungen sollte dieser Faktor zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.10. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme gehören zur Klasse II der Endodesoxyribonukleasen, die DNA-Sequenzen von 4-18 Nukleotiden erkennen, an diese binden und die sequenzspezifische DNA hydrolysieren. Diese Erkennungssequenzen der DNA sind in der Regel Palindrome, d.h. durch spiegelbildsymmetrische Anordnung der Nukleotidsequenzen charakterisiert. In der Praxis werden diese Enzyme zu analytischen Zwecken (zur Identifizierung eines Plasmids anhand des resultierenden charakteristischen Bandenmusters) oder zu präparativen Zwecken (zur Gewinnung eines spezifischen Spaltprodukts im Rahmen einer Klonierung) eingesetzt.

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2-1,0 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Ein Restriktionsverdau zur Analyse von Minipräparationen erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl, von Maxipräparationen in 20 µl. Nach Angaben des Herstellers wurden 1/10 der angegebenen Pufferlösung (10fach) eingesetzt und, falls nötig, 1/10 BSA (10fach) dazupipettiert. Vom jeweiligen Enzym wurden 5 Units/1 µg DNA dazugegeben, jedoch nicht mehr als ein 1/10 des Gesamtvolumens, da sich das im Lagerpuffer des Enzyms enthaltene Glycerol negativ auf die Reaktion auswirken kann. Eine Enzymeinheit Unit (U) ist definiert als die Menge des Enzyms, die benötigt wird, unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde 1 µg λ-DNA zu verdauen (oder andere Referenz-DNA, falls die λ-DNA nicht geschnitten wird). Im Falle von Doppelverdau musste ein Reaktionspuffer gewählt werden, in dem beide Enzyme eine ausreichend hohe Aktivität besitzen. Als Alternative wurde nach dem Verdau mit dem ersten Enzym eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt, um anschliessend die DNA mit dem zweiten Enzym verdauen zu können. Die Inkubation bei 37°C betrug eine Stunde oder wurde über Nacht durchgeführt.

2.2.1.11. Partielle Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Dieser Methode bedient man sich, um ein Plasmid mit zwei gleichen Restriktionsschnittstellen zu Linearisieren. Die begrenzte Menge an Enzym und die eingeschränkte Inkubationsdauer ermöglichen bei diesem Verfahren eine partielle Spaltung der DNA, die mit Hilfe einer nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden kann.

Dazu wurden zunächst 8 µg der Plasmid-DNA und 16 µl 10x Enzym-Puffer mit A. bidest auf 160 µl aufgefüllt, 5 Min. bei 37°C vorgewärmt und anschliessend 4 µl (4 U) des Enzyms dazupipettiert. Nach acht unterschiedlich langen Inkubationszeiten bei 37°C wurden jeweils 20

μl der Probe entnommen, sofort auf Eis gestellt und mit 4 μl 6x Bromphenolblau versetzt. Die Proben wurden zusammen mit einer unverdauten sowie einer vollständig verdauten Probe auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.1.12. Klenow-Reaktion

Einzelsträngige DNA mit 5'-Überhängen, die bei Restriktionsspaltungen entstehen, können aufgefüllt werden, indem man eine Polymerasereaktion durchführt. Die 5'-3'-Polymeraseaktivität des Klenow-Enzyms verwendet dabei dem Reaktionsansatz zugegebene dNTPs, um das rezessive Ende aufzufüllen. Das entstehende glatte Ende („blunt end“) kann anschliessend mit einem anderen glatten Ende ligiert werden.

Dafür wurden zur jeweiligen Klenow-Reaktion 2 μl dNTPs (10 mM), 2 μl des vom Hersteller angegeben Puffers sowie 1-2 μl Klenow-Fragment (grosses Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*) gegeben. Mit A. bidest wurde auf 20 μl Gesamtreaktionsvolumen aufgefüllt. Falls nicht anders angegeben, betrug die Inkubationsdauer eine Stunde bei 37°C. Die DNA wurde durch eine nachfolgende Ethanol-Präzipitation wieder aufgereinigt. Die entstehenden glatten DNA-Enden („blunt ends“) könnten anschliessend mit anderen glatten Enden ligiert werden.

2.2.1.13. Abbau überhängender 3'-Enden durch T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase kann für die Glättung von 3'-Überhängen der verdauten DNA verwendet werden, da das Enzym neben einer 5'→3'-Polymeraseaktivität über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt.

Um überhängende 3'-Enden mit Hilfe des Enzyms abzubauen wurde die verdaute DNA zusammen mit 4 μl 5x Reaktionspuffer, 1 μl 2 mM dNTPs (Endkonzentration 0,1 mM) sowie 1 U T4-DNA-Polymerase in 20 μl für 20 Min. bei 11°C inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktion durch Inkubation bei 70°C für 10 Min. gestoppt. Wie auch bei der Klenow-Reaktion wurde der Ansatz durch eine nachfolgende Ethanol-Präzipitation aufgereinigt.

2.2.1.14. Dephosphorylierung von DNA

Um das Religieren bei einem Vektor mit kompatiblen Enden ohne Aufnahme des gewünschten Inserts zu verhindern, dephosphoryliert man Vektor-DNA. Üblicherweise setzt man dazu alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm ein (CIAP: *calf intestine alkaline phosphatase*). Dieses Enzym entfernt die Phosphatreste der 5'-Enden von DNA-Fragmenten. Da CIAP in allen gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, wurde jeweils am Ende des Restriktionsverdau 1 µl (1 U/µl, MBI-Fermentas) des Enzyms zum Reaktionsansatz dazupipettiert und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Im Falle einer zuvor erfolgten Klenow-Reaktion muss die DNA vor der CIAP-Inkubation mit Hilfe der Ethanol-Präzipitation gefällt werden, um sämtliche dNTPs zu entfernen.

2.2.1.15. Ethanol-Präzipitation

Zur Aufkonzentration, zum Umpuffern oder auch zum Entsalzen von DNA-Lösungen wurde die Methode der Ethanol-Präzipitation verwendet. Bei der Zugabe von Ethanol in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration entzieht der Alkohol den Nukleinsäuremolekülen die Hydrathülle, woraufhin es zu deren Aggregation kommt. Während niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze in Lösung bleiben, kann die DNA durch Zentrifugation pelletiert werden. Bei DNA-Konzentrationen ab 250 ng/µl ist die Fällung ein sehr schneller Prozess, liegen die Konzentrationen jedoch bei 1 bis 250 ng, empfiehlt es sich, die DNA-Salz-Alkohol-Mischung vor der Zentrifugation für 30 Min. oder länger auf -20°C zu stellen (je niedriger die Konzentration, um so länger), um Ausbeuten von 80 bis 100 % zu erhalten.

Falls nicht anders angegeben, wurde das Gesamtvolumen der Lösung auf 90 µl mit A. bidest aufgefüllt und mit 1/10 3 M Natriumazetat (pH 4,8) und 3 Vol. Ethanol versetzt. Die Lösung wurde gut gemischt und mind. 20 Min. bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, anschliessend getrocknet und im geeigneten Volumen A. bidest oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.16. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Beseitigung kontaminierender Proteine und Lipide aus Nukleinsäurelösungen. Nacheinander wird dazu die Nukleinsäurelösung mit einem Volumen

TE-gesättigtem Phenol (Roth), einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wurden die Proben jeweils 15 Sek. gevortext, 5 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Röhrchen überführt. Auf diese Weise werden die Proteine denaturiert und sammeln sich in der organischen Phenol-Chloroform-Phase bzw. an der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an. Durch eine anschließende Ethanol-Präzipitation kann man die extrahierte DNA-Lösung konzentrieren und Reste von Phenol-Chloroform entfernt werden.

2.2.1.17. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI-PRISMTM310 Genetic Cycler-System durchgeführt und automatisch ausgewertet. Grundlage ist dabei die Methode des stochastischen Kettenabbruchs nach Sanger, hier unter Verwendung fluorochrom-markierter Didesoxynukleotide.

Der zu sequenzierende Abschnitt der DNA wurde zunächst durch eine azyklische PCR mit einem Primer amplifiziert. In der Regel verwendet man zwischen 100 ng und 1 µg DNA, gibt 1 µl 10 pmol Primer und 2 µl Big-Dye-Mix (DNA Sequencing Kit; enthält die markierten Didesoxynukleotide) pro 10 µl Gesamtansatz dazu. Im Thermozykler wurden die Proben in 30 Zyklen jeweils 10 Sek. bei 96°C denaturiert, die Hybridisierung erfolgte bei 50°C für 5 Sek. gefolgt von der Elongation bei 60°C für 4 Min. Anschliessend wurden die Proben mit Hilfe der AutoSeqTMG-50-Säulchen aufgereinigt, um unverbrauchte fluorochrom-markierte Nukleotide zu entfernen. Die Matrix in den Säulchen wurde für 2 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert und zweimal mit jeweils 500 µl A. bidest gewaschen. Der 10 µl-Ansatz wurde direkt auf die Matrix aufgetragen und wiederum 2 Min. bei 5000 rpm abzentrifugiert. Dieses Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet, das Pellet in 15 µl TSR-Puffer (*template suppression reagent*; ABI-PRISM) resuspendiert, die enthaltene DNA 2 Min. bei 94°C denaturiert und bis zur automatischen Analyse bei 4°C gelagert.

2.2.1.18. Präparation von DNA aus Zellkulturen

Zur Präparation genomischer DNA aus Zellkulturen wurde das DNazol-Reagens der Firma Qiagen verwendet. Hierbei handelt es sich um ein nicht-organisches Reagens, das in erster Linie aus Guanidinisothiozyanat besteht. Es enthält weitere Reagenzien, die vom Hersteller nicht weiter beschrieben sind, jedoch kein Phenol. Mit DNazol werden die Zellen in der Lösung lysiert bzw. homogenisiert und die genomische DNA kann im folgenden Schritt mit Hilfe von Ethanol präzipitiert werden. Nach dem Waschen der DNA mit Ethanol kann die DNA in Wasser oder TE-Puffer gelöst werden. Der Vorteil dieser Methode besteht in der schnellen Isolation der DNA (10 bis 30 Min.) sowie in der theoretischen DNA-Ausbeute von 70 bis 100 %.

Zunächst wurden 1×10^7 Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin abgelöst. Nach dem folgenden Resuspendieren wurden die Zellen in ein Falconröhrchen überführt und 10 Min. bei 2000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschliessend in 1 ml DNazol lysiert. Die freigewordene genomische DNA wurde durch Zugabe von 500 μ l 100 % EtOH/1 ml DNazol präzipitiert. Dazu invertierte man mehrmals das Röhrchen vorsichtig und inkubierte den Ansatz für 1 bis 3 Min. bei Raumtemperatur. Durch die nachfolgende Zentrifugation für 10 Min. bei 13000 rpm und 4°C konnte die DNA pelletiert werden. Das DNA-Pellet wurde noch zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und nach kurzem Antrocknen in der gewünschten Menge TE/Rase A-Puffer resuspendiert.

2.2.1.19. DNA-Isolierung aus Viruspartikeln

Zur Isolation von viraler DNA aus Viruspartikeln wurde der QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit verwendet. Dieser Kit wurde speziell für eine schnelle Aufreinigung von bis zu 6 μ g Total-DNA (z.B. genomisch, viral, mitochondrial) aus 200 μ l Suspension entwickelt. Nach dem Resuspendieren der Proben wurden diese zusammen mit einem Lysispuffer und DNase- und RNase-freier Protease bei 56°C inkubiert. Die Proben wurden auf Säulchen gegeben und nach einem Zentrifugationsschritt adsorbiert die DNA an die Silika-Gel-Membran. Im Lysat vorhandene Salz- und pH-Bedingungen verhindern die Bindung von Proteinen oder anderen Kontaminationen, die nachfolgende enzymatische Reaktionen stören könnten. Nach dem Waschen der an die Membran gebundenen DNA erfolgte die Elution der DNA mit dem beigefügtem Puffer oder Wasser.

Zu 200 µl Partikelsuspension wurde 20 µl QIAGEN Protease dazupipettiert und kurz gemischt. Anschliessend wurde zu der Probe 200 µl Puffer AL zugegeben, der Ansatz mindestens 15 Sek. gevortext und 10 Min. bei 56°C inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt wurden 200 µl 100 % EtOH zugefügt, das Röhrchen 15 Sek. gevortext und kurz anzentrifugiert. Die gesamte Lösung wurde in QIAamp Spin Säulchen pipettiert, die dann 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert wurde. Die gebundene DNA wurde einmal mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen und 1 Min. bei 8000 rpm abzentrifugiert. Ein zweiter Waschschrift erfolgte durch Zugabe von 500 µl AW2-Puffer und durch Zentrifugation für 3 Min. bei 13000 rpm. Um die DNA zu eluieren, wurden 20 bis 100 µl AE-Puffer oder A. bidest auf die Säulenmatrix pipettiert, diese 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert.

2.2.1.20. Herstellung markierter radioaktiver Sonden mittels „Random-priming“

Bei dieser Methode wird die doppelsträngige DNA-Matrize denaturiert und mit Zufallshexameren (*random primers*) hybridisiert, die dann als Primer für eine DNA-Polymerase dienen. Die Markierung erfolgt über den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide.

Alle verwendeten radioaktiven DNA-Sonden wurden mittels „Megaprime DNA Labelling System“ hergestellt. Nach Aufreinigung und Bestimmung der Konzentration eines Restriktionsfragments wurden 30 ng dieser DNA gemeinsam mit 1 µl 1 kb-Leiter, 5 µl Primerlösung auf 29 µl mit A. bidest aufgefüllt und der Ansatz für 5 Min. bei 96°C denaturiert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden jeweils 4 µl dGTP, dCTP und dTTP dazupipettiert. Pro 50 µl Gesamtansatz gab man 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl [α -³²P]-dATP (0,37 MBq/µl; Amersham Biosciences) und 2 µl Klenow-Enzym dazu. Die Inkubation bei 37°C erfolgte zwischen 1 und mehreren Stunden.

2.2.1.21. Southern Blot-Analyse

Ziel des Southern Blots ist es, DNA-Fragmente nach einer elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel auf einem Membranfilter zu transferieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können (Southern, 1975).

Dazu wurden zuerst die DNA-Proben in einem 0,8 % Agarosegel (0,8 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer) in einer TBE-gefüllten Gelelektrophoresekammer ÜN bei 25 V aufgetrennt. Am nächsten Tag erfolgte das Blotten mittels eines Vakuumblotter (Trans-Vac TE80; HOEFER). Dazu wurde im Vakuumblotter die gesamte Fläche der perforierten Metallplatte mit Whatman-Papier ausgelegt, das mit A. bidest befeuchtet wurde. Darauf wurde die Nylonmembran (NYTRAN® 0,2 µm; Amersham Biosciences) gelegt, die ebenfalls mit A. bidest befeuchtet wurde. Nach dem Entfernen sämtlicher Luftblasen wurde die Randmaske oben aufgelegt, auf die wiederum das Agarosegel gelegt wurde. Um ein gleichmässiges Vakuumblotten zu ermöglichen, war es notwendig, die Geltaschen mit Agarose zu verschliessen. Dann wurde ein leichtes Vakuum an den Blotter angelegt. Vor dem eigentlichen Blotten muss das Gel vorbehandelt sein. Um Fragmente über 5 kb Länge effizient auf die Membran zu transferieren, wurde das Gel zunächst 30 bis 60 Min. mit einer Depurinierungslösung eingedeckt. Bei diesem Schritt wird die DNA teilweise depuriniert und zerbricht in der nachfolgenden Denaturierung in kleinere Fragmente. Da bei diesem Vorgang Bromphenolblau gelb wird, kann man diesen Farbmarker als Indikator benutzen. Nachdem ein kompletter Farbumschlag erfolgt war, wurde die Depurinierungslösung abgenommen, und das Gel weitere 30 Min. mit Denaturierungslösung eingedeckt, d.h. die beiden DNA-Stränge wurden getrennt. Im Falle von Nylonmembranen musste diese vor der Hybridisierung neutralisiert werden, um eine feste Bindung der DNA an die Membran zu ermöglichen. Dieser Schritt wurde ebenfalls 30 bis 60 Min. durchgeführt. Erst dann konnte das eigentliche Blotten mit 20x SSC für 1 Std. erfolgen. Die Blotapparatur wurde anschliessend abgebaut und die DNA in einem UV-Crosslinker (BIO-LINK® type BLX) bei 1200 Joule/cm² auf der Nylonmembran quervernetzt. Erst dann erfolgte in einer Hybridisierungsröhre die Prähybridisierung (QuickHyb; Stratagene) für mindestens 1 Std. bei 60°C.

Die radioaktiv markierte Probe wurde direkt in die Prähybridisierungslösung pipettiert und die Hybridisierung ÜN bei 60°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Blot zuerst mit einer 1x SSC/0,1 % SDS-Lösung für 20 Min. bei 60°C gewaschen, danach noch einmal 20 Min. bei 60°C mit einer 0,5x SSC/0,1 % SDS-Waschlösung. Die Membran wurde kurz auf einem Whatman-Papier getrocknet und in Folie eingeschweisst. Die Exposition in Gegenwart von Röntgen-Verstärkungsfolien (Fa. Goos-Suprema) ÜN bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (Agfa-CURIX).

10x TBE-Puffer:

121 g Tris-Base

62 g Borsäureanhydrid

	7,4 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O auf 1 l mit A. bidest auffüllen
Depurinierungslösung:	0,25 M NaCl
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-Base/HCl, pH 7,5
20x SSC:	0,3 M Natriumzitat 3 M NaCl

2.2.2. RNA-Methoden

2.2.2.1. RNA-Isolierung aus Viruspartikeln

Zur Aufreinigung von viraler RNA aus extrazellulären Partikeln wurde der QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit von Qiagen verwendet. Mit Hilfe des Kits werden RNA-Proben unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert, um eventuell vorhandene RNasen zu inaktivieren. Durch diese Methode wird die Isolation intakter viraler RNA gesichert. Die Aufreinigung der RNA erfolgt durch die Bindung an eine Silikagel-Membran, die anschliessend mit verschiedenen Waschpuffern behandelt wird, und von der die gereinigte RNA im Anschluss an die Prozedur mit einem RNase-freiem Puffer eluiert werden kann. Die gereinigte RNA ist frei von Protein, Nuklease und anderen Kontaminationen.

Zu 100 µl Viruslösung in PBS wurden 400 µl AVL-Puffer (beinhaltet Träger-RNA) pipettiert und die Lösung für 15 Sek. gevortext. Nach einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400 µl 100 % EtOH dazugegeben und wieder 15 Sek. gevortext. Anschliessend wurde die gesamte Lösung in ein QIAamp-Zentrifugen-Säulchen gegeben, und dieses für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Zum Waschen wurde zunächst 500 µl AW1-Puffer in die Säulchen pipettiert, 1 Min. bei 8000 rpm abzentrifugiert und anschliessend noch einmal mit 500 µl AW2-

Puffer gewaschen, wobei die Säulchen hier 3 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert wurden. Zum Trocknen der Säulchen wurden diese nochmals 1 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 60 µl AVE-Puffer, kurzer Inkubation für 1 Min. bei Raumtemperatur und Zentrifugation für 1 Min. bei 8000 rpm.

2.2.2.2. In-vitro-Transkription (in-vitro-Synthese von RNA)

Diese Methode macht es möglich, von einem DNA-Strang RNA zu synthetisieren. Die hier verwendete Methode setzt voraus, dass sich die gewünschte DNA in einem Vektor befindet, der eine SP6-RNA-Polymerase-Bindungsstelle enthält. Für diese Zwecke wurde der TA-Vektor (pCR[®] II-TOPO) genutzt, ein Vektor, der den Promotor für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen SP6 aus *Salmonella typhimurium* trägt. Pro Mikrogramm eingesetzter Plasmid-DNA können mit einem SP6-Vektor bis zu 20 µg RNA gewonnen werden, wenn dem Enzym die vier Ribonukleosid-Triphosphate als Kofaktoren zugesetzt werden.

Mit Hilfe des MAXIscript[™]-Kits, bei dem die SP6-Phagen RNA-Polymerase mitgeliefert wird, erfolgte die *in-vitro*-Synthese der gewünschten RNA. Dazu wurden in einem 20 µl Gesamtansatz 1 µg linearisierte DNA-Matrize, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, jeweils 1 µl 10 mM ATP, CTP, GTP und UTP sowie 2 µl SP6-RNA-Polymerase zusammenpipettiert und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Noch vorhandene DNA-Matrize wurde durch Zugabe von 1 µl DNase I und anschließender Inkubation bei 37°C für 15 Min. entfernt. Mit 1 µl 0,5 M EDTA wurde die Reaktion abgestoppt und durch Ethanol-Präzipitation wurde die RNA anschliessend aufgereinigt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte. Zusätzlich wurde eine bestimmte Menge RNA auf ein RNA-Gel aufgetragen und die korrekte Grösse der RNA-Transkripte bestimmt.

2.2.2.3. RT-PCR mit dem Qiagen[®] OneStep RT-PCR-Kit

Diese Methode ermöglicht Reverse Transkription sowie eine PCR-Reaktion in einem Ansatz. Zwei verschiedene Enzyme übernehmen diese Funktion: eine Omniscript[™]/Sensiscrypt[™] Reverse Transkriptase und eine HotStarTaq[™] DNA Polymerase. Die Omniscript Reverse Transkriptase ist für Reaktionen mit mehr als 50 ng RNA geeignet, die Sensiscrypt Reverse Transkriptase für sehr kleine RNA-Mengen. Die DNA Polymerase ist während der reversen

Transkription komplett inaktiv. Erst durch Erhitzen der Proben auf 95°C für 15 Min. nach der reversen Transkription wird die HotStarTaq DNA Polymerase aktiviert. Gleichzeitig kommt es zu einer Inaktivierung der Reversen Transkriptasen. Sämtliche Reaktionen wurden in 20 µl-Ansätzen durchgeführt, die sich wie folgt zusammensetzten: 4 µl 5x QIAGEN OneStep RT-PCR-Puffer (enthält 12,5 mM MgCl₂), 0,8 µl dNTP-Mix (10 mM von jedem dNTP), 4 µl 5x Q-Lösung (beeinflusst das Schmelzverhalten von Nukleinsäuren und verbessert die RT-PCR-Bedingungen), je 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (mit einer Konzentration von 20 pmol) und 1 µl QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym-Mix. Mit RNase-freiem Wasser wurde der Ansatz auf 18 µl aufgefüllt und 2 µl Template-RNA dazupipettiert. Nach einer 50minütigen Inkubation bei 42°C (reverse Transkription) folgte ein 15minütiger Aktivierungsschritt der DNA-Polymerase bei 95°C. Die Denaturierung (95°C, 15 Sek.), das Annealing (57°C, 45 Sek.) und die Elongation (72°C, 60 Sek.) wurden 35-mal wiederholt. Darauf folgte ein finaler Elongationsschritt mit 5 Min. bei 72°C.

2.2.2.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkriptase (RT) handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die von einer einzelsträngigen RNA als Matrize ein RNA/DNA-Hybrid herstellt, das nachfolgend für die PCR eingesetzt werden kann. Für diese Reaktionen wurde eine Moloney-Maus-Leukämie-Virus RNase H⁻reverse Transkriptase (MMLV-RT; SuperScript II RNase H⁻reverse Transkriptase, Invitrogen) eingesetzt. Diese rekombinante MMLV-RT besitzt keine intrinsische RNase H-Aktivität mehr und ermöglicht dadurch deutlich längere Transkripte und die erhöhte Stabilität der RNA, da RNA/DNA-Hybride durch die RNase H nicht mehr abgebaut werden können.

Zunächst wurden 1 µl 20 pmol Primer, 1 µl RNA mit A. bidest auf 12 µl aufgefüllt und für 10 Min. bei 70°C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Die reverse Transkriptase benötigt einen reversen Primer, bzw. einen doppelsträngigen Nukleinsäure-Bereich, um mit der Synthese beginnen zu können. Anschliessend wurden 4 µl 5x First Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP) dazugegeben. Nach einer kurzen Inkubation für 2 Min. bei 42°C wurde 1 µl (200 U) der reversen Transkriptase dazugegeben, und die Reaktion erfolgte für 50 Min. bei 42°C. Die Reaktion wurde inaktiviert, indem der Ansatz für 15 Min. bei 70°C erhitzt wurde. Die cDNA konnte nun als Matrize für eine folgende PCR eingesetzt werden.

2.2.3. Quantitative *Real-Time* PCR mit dem Light Cycler-System (Roche Diagnostics)

Eine schnelle und genaue Bestimmung von PCR-Produkten setzt voraus, dass die Amplifikation und Detektion der gesuchten Nukleinsäure im geschlossenen System stattfindet. Dieses System konnte von der Firma Roche Diagnostics dahin gehend entwickelt werden, dass mit Hilfe des so genannten Light Cyclers die PCR-Amplimere in Echtzeit gemessen werden können. Neben der hohen Nachweisgrenze der Real-Time PCR (5 bis 6 Logstufen) im Gegensatz zur konventionellen PCR (2 bis 3 Logstufen) besteht ein weiterer Vorteil in der niedrigen Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen mit Fremdmaterial. Dies erlaubt die Anwendung der Real-Time PCR in vielen Bereichen der Diagnostik, da eine schnelle Bestimmung von Nukleinsäuren erfolgen kann. Aber auch für eine quantitative Bestimmung ist diese Methode geeignet. Da als Detektionsreagenz in dieser Arbeit nur SYBR-Green eingesetzt wurde, soll seine Funktion kurz erläutert werden. Bei SYBR-Green I handelt es sich um einen dsDNA-spezifischen Farbstoff, dessen Fluoreszenz durch die Bindung an dsDNA stark erhöht wird. In jeder Phase der DNA-Synthese bindet der Farbstoff an die synthetisierten PCR-Produkte und das Amplikon kann mit Hilfe der Fluoreszenz gemessen werden. Die Spezifität und Sensitivität der Reaktionen kann durch eine Kombination von Amplifikationsanalyse mit einer Schmelzkurvenanalyse demonstriert werden (Wittwer, 2001).

Um eine DNA-Probe quantitativ zu bestimmen, wurde ein Plasmidstandard in mehreren Verdünnungen hergestellt, der von denselben Primern erkannt wird, die auch an die zu detektierende DNA hybridisieren. Der Ansatz setzte sich zusammen aus 2,4 µl 25 mM MgCl₂, jeweils 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol/µl) sowie 2 µl FastStart DNA-Master-SYBR-Green I (Roche Diagnostics). Der Ansatz wurde mit 8,6 µl DNase freiem A. bidest bis zu einem Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt und dieser anschliessend in die LightCycler-Kapillare eingefüllt (LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics). Jeweils 5 µl Standard-DNA oder unbekannte DNA wurden dazu pipettiert. Anschliessend steckte man die gefüllten Kapillaren vorsichtig in das LC-Karussell und zentrifugierte die Proben 5 Sek. bei 3000 rpm. Das LC-Karussell wurde in den LightCycler gestellt und das Programm gestartet.

Zur quantitativen Analyse wurden konventionelle PCR-Zyklen gewählt. Da es sich bei der Polymerase um eine FastStart Polymerase handelt, die durch Bindung eines Antikörpers im aktiven Zentrum inaktiv ist, musste für eine Aktivierung der Antikörper zunächst für 10 Min. bei 95°C denaturiert werden. Als Standardprogramm für die Amplifikation wurden 40 Zyklen mit je 15 Sek. bei 95°C, 5 Sek. bei 57°C und 1 Min./kBp bei 72°C gewählt. Da SYBR-Green I an

jegliche dsDNA bindet, unabhängig ob es ein spezifisches oder unspezifisches PCR-Produkt ist, wurden die DNA-Fragmente nach 40 Zyklen bei 95°C geschmolzen. Bei der Temperaturerhöhung auf 95°C sinkt die Fluoreszenzintensität von SYBR-Green I zunächst linear. Ist die für das PCR-Produkt spezifische Schmelztemperatur erreicht, kommt es zu einem plötzlichen Abbruch der Fluoreszenz. Das PCR-Produkt denaturiert zum Einzelstrang und setzt den gesamten Fluoreszenzfarbstoff frei. Unspezifische Produkte und Primerdimere schmelzen unterhalb der spezifischen Schmelztemperaturen und können auf diese Weise detektiert werden. Die Schmelzkurve ist eine Kontrolle, um die Spezifität der PCR-Produkte sicherzustellen (Wittwer, 2001). Der Lauf wurde mit dem Abkühlen auf 40°C für 60 Sek. beendet. Mit einem speziellen Programm (LightCycler Software Version 3.5, Roche Diagnostics) konnten die Ergebnisse mit Hilfe der Wendepunktmethode ausgewertet und berechnet werden (Rasmussen, 2001).

2.2.4. Zellkulturmethoden

2.2.4.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden in „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % FKS kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 25 cm²-, 75 cm²-Flaschen oder in 6 cm-Schalen bei 37°C mit 5 % CO₂. Nachdem die Zellen einen 80 % konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurden sie in eine neue Flasche umgesetzt. Dazu wurde der Zellrasen kurz mit PBS gespült und mit 0,5 bis 1 ml Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden dann in frischem DMEM resuspendiert und ein Teil der Zellen in eine neue Flasche überführt. Zum Schluss wurde auf das entsprechende Gesamtvolumen mit DMEM aufgefüllt. Die hier beschriebenen Zelllinien wurden alle 3 bis 5 Tage gesplittet. Zur Selektion von bestimmten Zelllinien wurde entweder 1 mg/ml G148 (Invitrogen) oder 0,4 mg/ml Zeocin (Cayla, Frankreich) eingesetzt.

2.2.4.2. Kalzium-Phosphat-Transfektion

Als Transfektion wird das Verfahren zur Einschleusung von DNA in höhere Zellen bezeichnet. Bei dieser Technik wird die DNA in der Form von feinkörnigen Kalziumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endozytose aufgenommen. Das Präzipitat erhält

man durch Mischung einer DNA/CaCl₂-Lösung mit einer Lösung, die Phosphat-Ionen (2x HBS) enthält.

Für die Transfektion von Zellen wurden diese 24 Std. vor Transfektion in 6 cm-Schalen eingesät. Falls nicht anders angegeben, wurden $1,6 \times 10^6$ Zellen pro Schale in 4 ml DMEM/10 % FKS eingesät. Am Folgetag wurden zunächst alle benötigten Lösungen auf 37°C erwärmt. Das Zellkulturmedium der 6 cm-Schalen wurde mindestens eine Std. vor der Transfektion gewechselt. Der Transfektionsmix, der in der Zwischenzeit vorbereitet wurde, enthielt zwischen 5 und 20 µg DNA sowie 62 µl 2 M CaCl₂. Auf das Gesamtvolumen von 500 µl wurde mit A. bidest aufgefüllt. Mit vorsichtigen, kreisenden Bewegungen wurden schliesslich 500 µl 2x HBS dazupipettiert und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Schliesslich wurde der Ansatz gleichmässig auf die Zellen aufgebracht. Nach 8-stündiger Inkubation im CO₂-Brutschrank wurde das Zellkulturmedium erneut gewechselt, um die CaPO₄/DNA-Komplexe aus den Schalen zu entfernen und die Zellen anschliessend ÜN bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 80 µl Natriumbutyrat in 4 ml Zellkulturmedium 24 Std. nach Transfektionsbeginn erreicht man bei Transfektion von Plasmiden mit einem CMV-Promotor eine zusätzliche Stimulation der Proteinexpression. Nach 7 Std. wurde die Induktion durch einen weiteren Mediumwechsel beendet.

2x HBS:	50 mM HEPES	5,95 g HEPES
	10 mM KCl	0,373 g KCl
	12 mM Glukose	1,19 g Glukose
	280 mM NaCl	8,18 g NaCl
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄	5 ml 150 mM Na ₂ HPO ₄

den pH-Wert der Lösung mit HCl einstellen.

Es wurden 4 Ansätze mit unterschiedlichen pH-Werten (6,95; 7,00; 7,05; 7,1) hergestellt, da die Transfektionseffizienz stark vom pH-Wert des 2x HBS abhängig ist.

CaCl₂: 2 M CaCl₂
0,2 µm sterilfiltrieren

Natriumbutyrat: 500 mM Natriumbutyrat
(n-Buttersäure; Natriumsalz)
in sterilem PBS ansetzen und 0,2 µm sterilfiltrieren

2.2.4.3. PolyFect-Transfektion

Bei dem PolyFect-Reagenz (Qiagen) handelt es sich um ein so genanntes aktiviertes Dendrimer Transfektionsreagenz, das eine Reihe von Vorteilen mit sich bringt. Es assembliert die DNA in kompakten Strukturen, so dass sie optimal für den Eintritt in die Zelle vorbereitet ist. Zusätzlich ist PolyFect in der Lage, an negativ geladene Rezeptoren der eukaryontischer Zellen zu binden (z.B. sialysierte Glykoproteine). In die Zellen eingetreten ist die Substanz verantwortlich für die Pufferung der Lysosomen, so dass es zu einer pH-gesteuerten Inhibition der lysosomalen Nukleasen kommt. Damit sind die PolyFect-DNA-Komplexe stabilisiert, und der Transport der intakten DNA kann in den Kern erfolgen. Die Transfektion mit PolyFect verglichen mit der Kalzium-Phosphat-Transfektion zu einer gesteigerten Transfektionseffizienz.

Für die Transfektion wurden am Vortag $1,7 \times 10^6$ 293T-Zellen pro 6 cm-Schale in 4 ml DMEM eingesät. Am nächsten Tag wurde das Medium zunächst durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden zwischen 6 µg DNA in 150 µl serumfreiem und antibiotikafreiem DMEM aufgenommen und 15 Sek. gevortext. Nach kurzem Anzentrifugieren der Proben wurde pro Probe 30 µl PolyFect-Transfektionsreagenz dazupipettiert und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Dieser Mix wurde bei Raumtemperatur 10 Min. inkubiert, um die Bildung der PolyFect-DNA-Komplexe zu ermöglichen. Anschliessend wurde der Ansatz mit 1 ml frischem normalem DMEM gemischt und vorsichtig auf die Zellen getropft. Diese Methode macht einen Wechsel des Mediums nach 8 Std. überflüssig.

2.2.4.4. Gewinnung zellfreier virushaltiger Überstände

Nach erfolgter Transfektion von virusexprimierender DNA bzw. Infektion von Zellen wurden zellfreie Virusüberstände geerntet. Dazu wurde das virusenthaltende Medium mit einer sterilen Spritze aufgenommen und durch einen sterilen 0,45 µm-Filter (FP 30/0,45 CA-S; Schleicher & Schuell) filtriert. Für grössere Mengen Virusüberstand wurden dazu 500 ml-Sterilfilter (Bottle-Top-Filter 0,45 µm; ROTH) verwendet, die durch das Anschliessen an ein Vakuum das Filtrieren ermöglichten. Zellfreie Virusüberstände wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt oder für kurze Zeit bei 4°C gelagert.

2.2.4.5. Infektion von Zielzellen

Als Zielzellen für die Anzucht von FFV-Überständen wurden CrFK-Zellen verwendet. Hierfür wurde 24 Std. vor der Infektion die entsprechende Anzahl T25-Zellkulturflaschen mit jeweils 1×10^6 Zellen eingesät. Am nächsten Tag wurde das konditionierte Medium abgenommen und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 2 ml zellfreiem Virusüberstand überschichtet und für 2 Std. auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden 5 ml des konditionierten Mediums in die Flaschen zurückpipettiert und die Zellen im CO₂-Brutschrank weiter kultiviert.

2.2.4.6. Zellfärbung mit 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -galaktosid (X-Gal)

CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen sind Indikatorzellen, die ein *lacZ*-Gen unter der Kontrolle der transaktivator-abhängigen FFV-LTR besitzen. Wird eine solche Zelle mit FFV infiziert oder einem FFV-Tas-exprimierendem Plasmid transfiziert, ermöglicht der virale Transaktivator Tas durch Interaktion mit der FFV-LTR die Expression von β -Galaktosidase. Die betreffende Zelle lässt sich nach Fixierung und X-Gal-Zugabe blau anfärben.

Für die X-Gal-Färbung wurden von virusinfizierten CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen die Überstände abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und 10 Min. mit Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, die Färbelösung zugegeben und 30 Min. bis 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der blaugefärbten Zellcluster wurden dann ausgezählt.

Fixierlösung: 0,5 % Glutardialdehyd in PBS

Färbelösung: 4 mM Kaliumferrizyanid (400 mM Stocklösung;
im Dunkeln aufbewahren)
4 mM Kaliumferrozyanid (400 mM Stocklösung;
im Dunkeln aufbewahren)
2 mM MgCl₂ (200 mM Stocklösung)
frisch dazugeben: 0,4 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -galaktosid
(X-Gal); 20 mg/ml Stocklösung in Dimethylformamid

2.2.4.7. Färbung von Friend MuLV (FrMLV)-infizierten Mus Dunni-Zellen

Um die Infektiosität von FrMLV-Überstände zu bestimmen, wurden 3×10^4 /ml Mus Dunni-Zellen in eine 12-Loch-Platte eingesät. Am nächsten Tag wurde pro Loch 10 μ l Polybrene (800 μ g/ml) dazupipettiert und für mehrere Stunden vorinkubiert. Die Titration der FrMLV-Überstände erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe. 72 Std. nach der Infektion wurde das gesamte Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 1 ml 95 % Ethanol für 5 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Anschliessend wurden die Zellen einmal mit PBS und einmal mit PBS plus 2 % FKS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (200 μ l von Maus α MuLV Friend Env Hybridomaüberstand #720) erfolgte für 30 Min. bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS/2 % FKS gewaschen und für 20 Min. mit 200 μ l vom zweiten Antikörper (Ziege α Maus Ig-HRP; 1:300 in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS/2 % FKS gewaschen. Das AEC (3-Amino-9-Ethyl-carbazol)-Substrat wurde unmittelbar vor der Färbung vorbereitet und 500 μ l pro Loch pipettiert. Die Inkubation für 15 Min. bei Raumtemperatur erfolgte im Dunkeln. Das AEC-Substrat wurde anschliessend abgenommen, die Zellen sofort mit Wasser gewaschen und für einige Stunden bei 37°C getrocknet. Die Anzahl der roten Foci konnte nun ausgezählt werden.

AEC-Stocklösung (4 mg/ml): 10 Tabletten AEC (3-Amino-9-Ethyl-carbazol) in 50 ml Dimethylformamid lösen; bei 4°C lagern

AEC-Substrat: 25 ml H₂O
0,625 ml 2 M Natriumazetat, pH 5,0
1,2 ml AEC-Stocklösung (4 mg/ml)
13 μ l 30 % H₂O₂ (erst unmittelbar vor der Färbung zugeben)

2.2.4.8. Titration von Virusüberständen

Zur Bestimmung des Virustiters nach Transfektion proviraler FFV-Konstrukte wurden CrFK/LTR(FFV)*LacZ*-Zellen als spezifische Indikatorzellen verwendet. Mit Hilfe dieser Methode konnten virusinfizierte bzw. transduzierte Zellen leicht ausgezählt und der Virustiter im Überstand bestimmt werden. Hier beschriebene Titrationsexperimente wurde folgendermassen durchgeführt: 48 Std. nach Transfektion wurden die Überstände geerntet und 0,45 μ m

sterilfiltriert. In Falconröhrchen wurden Verdünnungsreihen des Überstandes in einem Volumen von 5 ml angelegt (Verdünnung von 10^{-1} bis 10^{-5}). Daraufhin wurden CrFK/LTR(FFV)*LacZ*-Zellen, die am Vortag mit einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen/ml in 12-Loch-Platten ausgesät worden waren, mit jeweils 2 ml der Verdünnung infiziert. Die Zellen wurden nach 48 bis 72 Std. fixiert, gefärbt und der Titer anschliessend berechnet. Dabei wurde die Anzahl der blauen Zellen der letzten sowie vorletzten positiven Verdünnungsstufe gezählt. Der Mittelwert der letzten positiven Verdünnungsstufe wurde mit 10 multipliziert und zu dem Mittelwert der vorletzten positiven Verdünnungsstufe addiert. Die Summe geteilt durch die Anzahl der gezählten Verdünnungsstufen ergab den gesuchten Titer.

2.2.4.9. Aufreinigung von aufkonzentrierten Virusüberständen über ein 20 %iges Saccharosekissen

Um Viruspartikel für nachfolgende Untersuchungen aufzureinigen, wurden die Überstände zunächst $0,45 \mu\text{m}$ sterilfiltriert, um grobe Zelltrümmer und Zellen abzutrennen. Anschliessend wurde der Überstand vorsichtig in Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Zentrifugenröhrchen, $14 \times 95 \text{ mm}$; Beckmann) auf ein 2 ml 20 % Saccharosekissen aufgetragen. Die Röhrchen wurden dann für 2 Std. bei 30000 rpm und 4°C zentrifugiert (SW40-Rotor, Optima™LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter). Nach dem Zentrifugenlauf wurde die Flüssigkeit mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das Sediment (nicht sichtbar) in der gewünschten Menge PBS aufgenommen.

2.2.4.10. Herstellung und Analyse eines kontinuierlichen Saccharose-Gradienten

Bei der Zentrifugation im Dichtegradienten werden die Makromoleküle oder Teilchen durch eine Flüssigkeitssäule mit ansteigender Dichte zentrifugiert. Die Komponenten werden dabei infolge ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt. Zur Aufreinigung von aufkonzentrierten Viruspellets wurden steile Saccharosegradienten (20 bis 66 %) verwendet.

Nach dem Aufkonzentrieren sterilfiltrierter Virusüberstände in der Ultrazentrifuge (2 Std. bei 30000 rpm und 4°C ; SW28-Rotor, Optima™LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter) wurden die Saccharosegradienten mit Hilfe eines Gradientenmischers (HOEFER) vorbereitet. In Ultrazentrifugenröhrchen wurde zunächst ein 66 % Saccharosekissen vorgelegt (1 ml) und die

2.2.5. Proteinnachweis

2.2.5.1. Herstellung von Zellysaten für Western Blots

Die zu lysierenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschliessend für 10 Min. auf Eis mit 1 ml RIPA-Puffer lysiert. In der Zwischenzeit wurden in Eppendorfröhrchen 400 µl 2x Proteinprobenpuffer (PPP) vorgelegt. Dazu wurden nach Ablauf der Inkubation 400 µl Zellysat pipettiert, die Proben gevortext und 10 Min. bei 94°C aufgeköcht. Die Proben wurden dann entweder eingefroren (-20°C) oder direkt auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Unter diesen Bedingungen wurde auf die Verwendung von Proteaseinhibitoren verzichtet.

RIPA-Puffer:	0,3 M NaCl
	20 mM Tris-Base/HCl, pH 8,0
	1 % Natriumdesoxycholat
	0,1 % SDS
	1 % Triton-X-100
	Lagerung bei 4°C
2x PPP:	125 mM Tris-Base/HCl, pH 6,8
	4 % SDS
	20 % Glyzerol
	10 % β-Merkaptoethanol
	0,1 % Bromphenolblau Lagerung

2.2.5.2. Isolierung von Proteinen aus Viruspartikeln

Zur Gewinnung von Virusproteinen wurden virushaltige Überstände durch Ultrazentrifugation (SW28-Rotor, Optima™LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter) abzentrifugiert und das Viruspellet in 100 µl PBS aufgenommen. Von dieser Virussuspension wurden 10 bis 20 µl abgenommen und mit dem gleichen Volumen 2x PPP (Proteinprobenpuffer) versetzt. Die in diesem Gemisch enthaltenen Proteine wurden dann für 10 Min. bei 94°C denaturiert und anschliessend bei -20°C gelagert oder direkt auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche denaturierende Elektrophorese in vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gelen eingesetzt. Dabei werden alle Proteine durch SDS und β -Merkaptoethanol denaturiert und die Protein/SDS-Komplexe erhalten eine negative Ladung. Das Acrylamid polymerisiert durch freie Radikale, die von APS abgegeben und von TEMED stabilisiert werden. Die Fasern werden durch polymerisiertes Bisacrylamid quervernetzt (Ossipow *et al.*, 1993).

Falls nicht anders beschrieben wurde hierzu ein 8 % Trenngel mit einem 4 % Sammelgel überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte in einem zwei-Kammersystem: die obere Kammer der Gelapparatur wurde mit 1x Kathodenpuffer, die untere mit 1x Anodenpuffer gefüllt. Die Sammeltaschen wurden mit 1x Kathodenpuffer gespült, bevor die Proben und 7 μ l Rainbow-Marker (Amersham Biosciences) als Grössenstandard aufgetragen wurden. Die Proteine wurden ÜN bei 35 mA aufgetrennt.

1x Gelpuffer:	181,7 g Tris-Base (3 M) 15 ml 10 % SDS mit HCl auf pH 8,45 einstellen auf 500 ml mit A. bidest auffüllen
8 % Trenngel:	10,8 ml A. bidest 7,95 ml 30 % Acrylamidlösung (Gel A, Roth) 3,6 ml 2 % Bisacrylamidlösung (Gel B, Roth) 9,9 ml Gelpuffer 3,3 ml Glyzerol 150 μ l 10 % APS 20 μ l TEMED (Roth)
4 % Sammelgel:	5,6 ml A. bidest 1,3 ml 30 % Acrylamidlösung (Gel A, Roth) 0,6 ml 2 % Bisacrylamidlösung (Gel B, Roth) 2,5 ml Gelpuffer 75 μ l 10 % APS

10 µl TEMED

10x Anodenpuffer : 242 g Tris-Base (2 M)
den pH mit HCl auf 8,9 einstellen
auf 1 l mit A. bidest auffüllen

5x Kathodenpuffer: 60,56 g Tris-Base (0,5 M)
89,5 g Trizin (0,5 M)
50 ml 10 % SDS (0,5 %)
mit A. bidest auf 1 l auffüllen

2.2.5.4. Western Blot-Analyse

Mit Hilfe des Western Blots ist es möglich, elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter, z.B. Nitrocellulose oder Nylon zu übertragen und zu immobilisieren. Auf diesen Membranen können dann gesuchte Proteine mit den entsprechenden Antikörpern detektiert werden. Dazu wird die Membran zuerst mit dem spezifischen primären Antikörper inkubiert, der wiederum von einem sekundären Antikörper erkannt wird. Der Nachweis dieser Bindung kann über ein an den Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym, z.B. eine Peroxidase oder Alkalische Phosphatase erfolgen. Bei Gebrauch von Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde zur Detektion der ECL-Kit verwendet (Amersham Biosciences), bei dem durch die peroxidase-vermittelte Oxidation von Luminol Licht emittiert wird, das auf einem Röntgenfilm nach Entwicklung eine sichtbare Schwärzung hinterlässt. Bei den beschriebenen Experimenten wurde das „semidry“-Verfahren genutzt. Vor dem Aufbau des Blots wurden die Nitrozellulosemembran (HYBOND™ ECL™; Amersham Biosciences) und die Filterlagen 10 Min. in Western Blot-Puffer eingeweicht. Anschliessend wurden auf die Kathodenplatte der Apparatur 3 Lagen Whatman-Filterpapier, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und wieder 2 Lagen Whatman-Filterpapier luftblasenfrei gestapelt. Dann wurde die Anodenplatte aufgesetzt und 60 Min. bei 180 mA geblottet.

Nach dem Blotten wurde die Apparatur abgebaut, die Membran kurz mit A. bidest abgespült und dann für 1 Std. in 4 % Milchpulver/PBS (Magermilchpulver, Lasana) geschwenkt. Dieser Schritt dient dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Nach diesem „Blockierungsschritt“ wurde die Membran 1 Std. mit dem 1. Antikörper inkubiert. Dazu wurde dieser in 4 %

Milchpulverlösung 1:100 bis 1:1000 verdünnt. Um nicht gebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal jeweils 10 Min. mit PBS/0,5 % Tween20 gewaschen. Der 1:2000 in 4 % Milchpulverlösung verdünnte Sekundärantikörper wurde ebenfalls 1 Std. mit der Membran inkubiert, gefolgt von drei Waschrissen mit 10 Min. Für die nachfolgende ECL-Reaktion wurden die Lösungen A und B nach Angaben des Herstellers gemischt und für 5 Min. auf die Membran aufgetragen. Anschliessend wurde die überschüssige Flüssigkeit abgenommen und die Membran in Klarsichtfolie gelegt. Die Lichtreaktion wurde durch Exposition eines Röntgenfilmes über verschiedenen Zeiten dokumentiert.

Western Blot-Puffer: 5,81 g Tris-Base
 2,93 g Glyzin
 0,037 g SDS (0,037 %)
 auf 800 ml mit A. bidest auffüllen
 + 200 ml Methanol

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung von FFV-Klonen genomischer Länge

Um die molekularbiologischen Besonderheiten von FFV näher beschreiben zu können, wurde zunächst aus den drei subgenomischen FFV-Klonen #F3, #94 und Env1 (bereitgestellt von C.R. Helps und D.A. Harbour, University of Bristol) der molekulare FFV-Klon pChatul-1 entwickelt. Dieser ist durch eine CMV-gesteuerte Proteinexpression charakterisiert, d.h. neben den Strukturproteinen stehen auch die akzessorischen Proteine unter Kontrolle des konstitutiv aktiven IE (immediate early gene) Promotors und Enhancer des Cytomegalievirus. Zusätzlich besitzt dieser molekulare Klon am 3'-Ende des CMV-Promotors die R/U-Region und am 3'-Ende die U3/R-Region. Da der CMV-Promotor nur in der initialen Phase der Genexpression aktiv ist und der Transkriptionsstart von FFV erhalten blieb, sollten nach Transfektion in Zellkulturen und Durchlaufen des retroviralen Replikationszyklus infektiöse Viren entstehen.

3.1.1. Herstellung der infektiösen Klone

Über mehrere Klonierungsschritte wurde zuerst mit Hilfe der subgenomischen Klone #F3, #94 und Env1 (siehe Anhang) das Konstrukt pChatul-1 kloniert (Abb. 9).

Zunächst erfolgten die Linearisierung von pMH01 mit *Bgl*III und eine nachfolgende Klenow-Reaktion, wodurch der CMV-Promotor zur Verfügung gestellt wurde. In dem resultierenden Plasmid (pWR1) wurde das mit *Sac*I/*Stu*I verdaute 1,07 kb-Fragment gegen ein 1,59 kb-Fragment, welches aus einem Verdau von #94 mit *Sac*I und *Eco*47III entstanden war, ausgetauscht. Das Plasmid (pWR2) enthält den CMV-Promotor, die R- und U5-Region sowie ein grossen Teil des *gag*-Gens. Der 3'-Bereich des Genoms wurde in der Weise kloniert, dass das 3,32 kb-*Sma*I/*Bsa*BI-Fragment aus dem Plasmid Env1 in den *Stu*I/*Bsa*BI-verdauten #F3 inseriert wurde. Dieses Plasmid (pWR3) verfügt somit über das *env*-Gen, die akzessorischen Gene sowie die 3'-LTR-Region. Durch Insertion eines 4,78 kb-Fragmentes aus dem *Sal*I-verdauten pWR3 in den *Sma*I-verdauten und dephosphorylierten pWR2 entstand pWR4. Da dem Plasmid #94 ein Teil des *env*-Gens fehlt, der auch nicht in Env1 enthalten ist, musste die noch fehlende Sequenz mit Hilfe einer überlappenden PCR-Reaktion ergänzt werden. Mit Hilfe der Oligonukleotide #713 und #714 wurde von dem Plasmid #94 zunächst ein 4,66 kb-Fragment amplifiziert, das am 5'-Ende die Erkennungssequenz für das Enzym *Bgl*III besass.

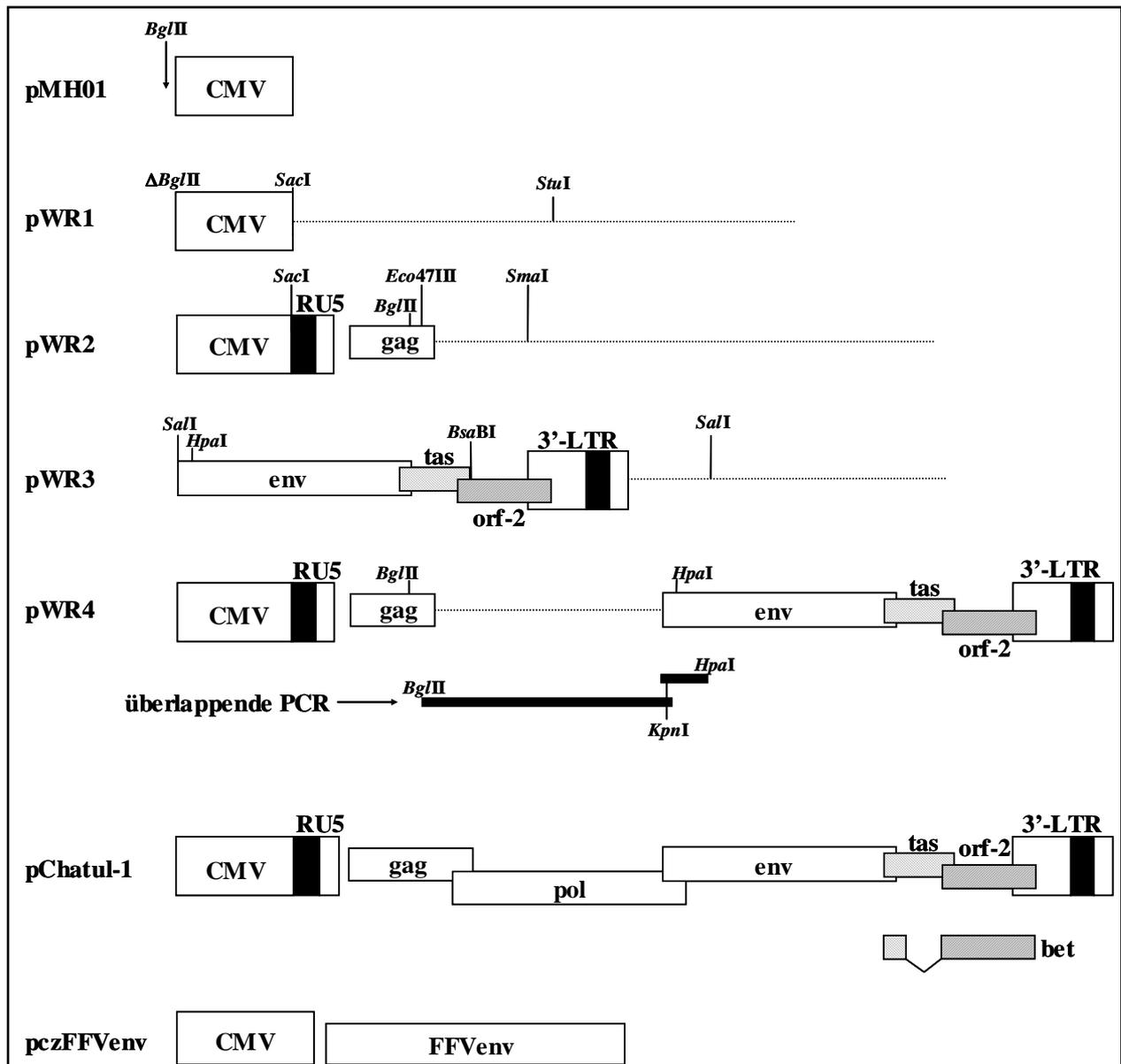


Abb. 9: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von pChatul-1.

Die wichtigsten Klonierungsschnittstellen sind eingezeichnet. Die gestrichelten Linien stellen Vektor-DNA dar. Weitere Erläuterungen sind im Kapitel 3.1.1. aufgeführt.

In einer zweiten Reaktion wurde mit den Oligonukleotiden #715 und #716 (419 Bp Fragment) die fehlende Sequenz vom Plasmid pczFFVenv amplifiziert. Dieses PCR-Produkt besaß am 3'-Ende die Erkennungssequenz für das Enzym *HpaI*. Beide PCR-Produkte enthielten dieselbe *KpnI*-Schnittstelle vom 5'-Ende des *env*-Gens und konnten nach Aufreinigung mit den Enzymen *BglIII*, *KpnI* und *HpaI* verdaut werden. Nach dem Entfernen eines 1,82 kb *BglIII/HpaI*-Fragments aus pWR4 wurden die beiden verdauten PCR-Produkte mit Hilfe einer „drei-Fragment-Ligation“ in pWR4 inseriert, woraus schließlich der molekulare FFV-Klon pChatul-1 entstand.

Der Unterschied zwischen pChatul-1 und pChatul-2 besteht in der Anwesenheit des SV40 ori (Simian Virus 40, Abb. 10). Das grosse T-Antigen von SV40, das in eukaryontischen Zellen stabil exprimiert werden kann (z.B. 293T-Zellen), bindet an den SV40 ori und leitet damit die bidirektionale Replikation des Vektors ein. Dies führt zu einer höheren Kopiezahl der transfizierten Plasmide und zu einer stabilen Weitergabe an die Tochterzellen.

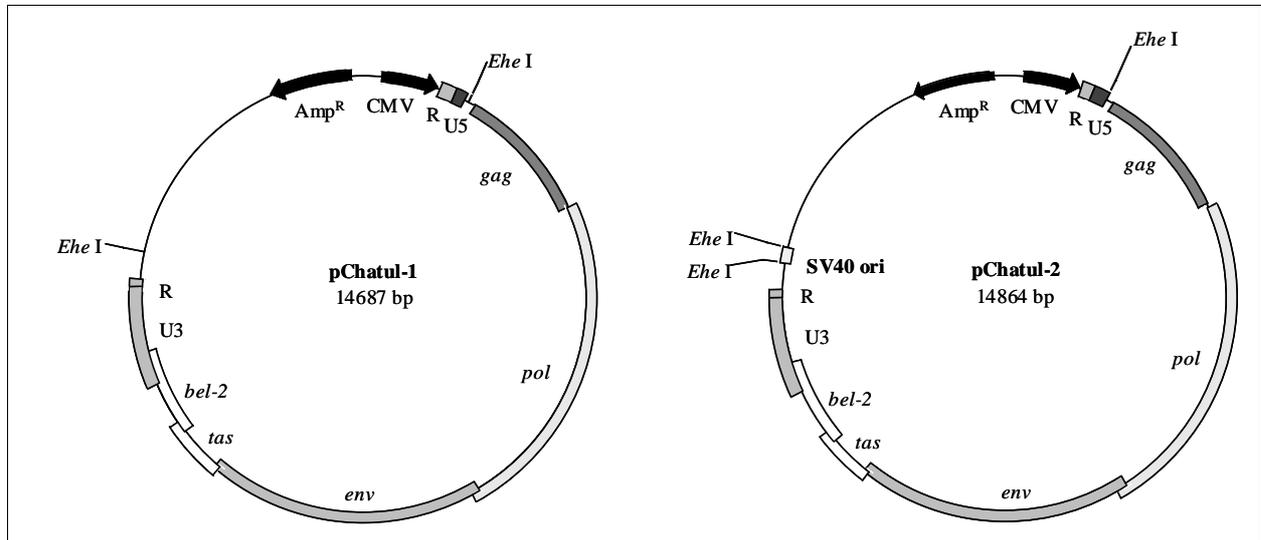


Abb. 10: Zirkuläre Plasmidkarten der FFV-Klone pChatul-1 und pChatul-2.

Die Plasmidkarten enthalten die Namen und Grössen der Plasmide (Mitte). Bei beiden Vektoren folgt unmittelbar auf den CMV-Promotor die R-U5-Region, die Gene für die Strukturproteine *gag*, *pol* und *env* sowie die Leserahmen der akzessorischen Proteine *tas* und *bel-2*. Der Leserahmen für das Bet-Protein ist in beiden Fällen nicht dargestellt. Das FFV-Genom endet mit der U3-R-Region. Im Fall von pChatul-2 befindet sich im Anschluss an die 3'-R-Region der SV40 ori. Beide Plasmide enthalten das Gen für eine Ampizillinresistenz (Amp^R).

Die Umklonierung des SV40 ori in pChatul-1 erfolgte mit Hilfe einer weiteren PCR. Unter Verwendung der Primer #773 und #774, die die Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *EheI* enthielten, wurde der SV40 ori von pEGFP-C1 amplifiziert und das 188 Bp-Fragment in das Plasmid pCRII-TOPO zwischenkloniert.

Da pChatul-1 über zwei *EheI*-Erkennungssequenzen verfügt, von denen die *EheI*-Erkennungssequenz an Position 11522 als Insertionsort für den SV40 ori dienen sollte, wurde das Plasmid partiell mit *EheI* verdaut. Das Ziel dabei war herauszufinden, wann die DNA nur linearisiert ist. Die linearisierte, aufgereinigte DNA wurde mit alkalischer Phosphatase behandelt und zur Kontrolle 5 µl der DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Parallel wurde der SV40 ori mit einem *EheI*-Verdau aus dem pCRII-SV40-Plasmid herausgeschnitten und das aufgereinigte Fragment in das *EheI*-linearisierte pChatul-1-Plasmid ligiert. Mit Hilfe von mehreren Restriktionsverdau wurde die Insertion des Fragments sowie dessen korrekte Orientierung im Vektor bestätigt.

Da nach Expressionsanalysen von pChatul-1 und pChatul-2 nur sehr geringe Titer nachgewiesen worden konnten, war es notwendig, einen weiteren FFV-Klon genomischer Länge herzustellen. Zu diesem Zweck wurde pChatul-2 in CrFK-Zellen transfiziert und der infektiöse Überstand passagiert, bis ein hochtitriger Virusüberstand ($1 \times 10^7/\text{ml}$) geerntet worden konnte. Mit diesem FFV-Überstand wurden CrFK-Zellen infiziert, bis der Zellrasen einen starken zytopathischen Effekt (CPE) aufzeigte. Die durchinfizierten Zellen wurden anschliessend geerntet und die genomische DNA isoliert. Mit Hilfe einer *Long PCR* wurden von dieser genomischen DNA zwei PCR-Produkte amplifiziert, die sich über das gesamte FFV-Genom erstreckten (Abb. 11).

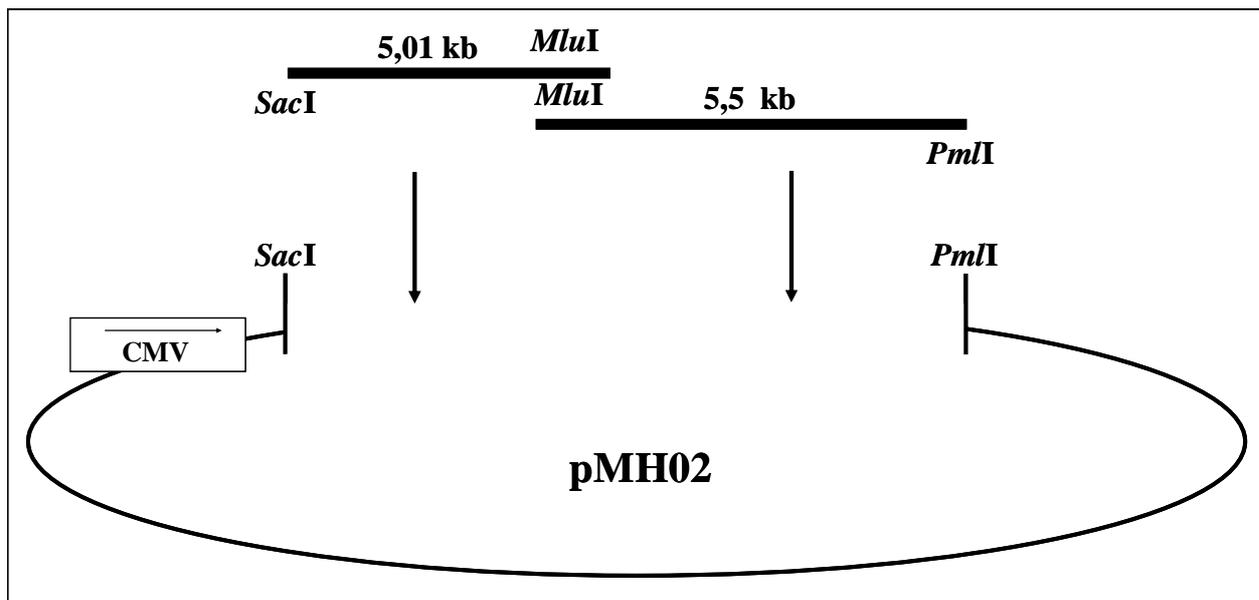


Abb. 11: Klonierung des infektiösen molekularen FFV-Klons pChatul-3.

Zwei durch *Long PCR* amplifizierte PCR-Fragmente (5,01 kb und 5,5 kb) wurden in den zuvor linearisierten pMH02-Vektor inseriert. Dieser verfügt über einen CMV-Promotor und ist im unteren Teil der Abbildung schematisch dargestellt. Weitere Erläuterungen in Kapitel 3.1.3.

Die *Long PCR* stellt eine Modifikation der normalen PCR-Reaktion dar, die es erlaubt, Amplifikationen von sehr langen Sequenzen (bis zu 35 kb) durchzuführen (Herchenröder *et al.*, 1995). So war es möglich, mit Hilfe dieser abgewandelten PCR-Methode den ersten proviralen Klon eines FV der Affengruppe (SFVcpz) herzustellen. In der PCR wurde ein so genannter Enhancer (*Taq Extender*TMPCR Additive; Stratagene) eingesetzt, ein Verstärker, der neben der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase die *Pfu*-DNA-Polymerase mit einer *Proofreading*-Aktivität und 3'-Exonuklease enthält. Dadurch können die Länge, die Ausbeute und die Genauigkeit des PCR-Produktes erheblich gesteigert werden. So konnten lange PCR-Produkte ohne Fehlpaarungen erzeugt werden. Die *Long PCR* wurde in einem Reaktionsansatz von 50 μl durchgeführt, der 5 μl *Extender*TMPCR-Puffer, 8 μl 10 mM dNTPs, 1 μl *Taq*-Polymerase (5U/ μl , Promega) sowie 2 Units des *Taq Extender*TMPCR Additive enthielt. Nach einem Hot-Start für 2

Min. bei 94°C wurden 40 Zyklen mit je 15 Sek. bei 94°C, 45 Sek. bei 57°C und 5 Min. bei 72°C durchgeführt. Dem folgte ein Elongationsschritt von 8 Min. bei 72°C.

Mit Hilfe der Primer #788/*SacI* und #791/*MluI* wurde der 5'-Bereich des Genoms amplifiziert, der dem FFV *gag-pol*-Bereich entsprach. Die Primer #789/*PmlI* und #790/*MluI* dienten der Amplifikation der 3'-Sequenzen. Die beiden PCR-Produkte wurden in den pCRII-TOPO-Vektor zwischenkloniert und anschliessend in das *SacI/PmlI*-geöffnete pMH02-Plasmid inseriert. Die korrekte Klonierung der DNA-Fragmente und deren Orientierung in pMH02 wurde durch mehrere Restriktionsverdau nachgewiesen.

3.1.2. Vergleichende Analyse der verschiedenen molekularen infektiösen FFV-Klone

Die Eigenschaft von Foamyvirus-Klonen genomischer Länge besteht darin, dass diese nach Transfektion von Zellen infektiöse Viruspartikel exprimieren. Ihre biologische Aktivität kann durch das Auftreten eines zytopathischen Effekts (CPE) beobachtet werden, der auf die Bildung von Riesenzellen (Synzytien), d.h. die Fusion von infizierten mit nicht-infizierten Zellen, zurückzuführen ist. Die Infektiosität der Viruspartikel kann durch einen zellfreien Transfer auf empfängliche Zielzellen getestet werden.

Um die Replikationskompetenz der verschiedenen FFV-Konstrukte zu testen, wurden 293T-Zellen mit den Plasmiden pChatul-1, pChatul-2, pChatul-3, pcHSRV2 (molekularer Klon von PFV) und pSFV-1 (molekularer Klon von SFV-1) mittels Kalziumphosphat-Transfektion transfiziert. Als Kontrollen wurden die Plasmide pEGFP-C1 und pcDNA3.1 transfiziert. Die zellfreien Überstände wurden in einer nachfolgenden Titration verdünnt und die entsprechende Zielzellen infiziert. Die Anzahl der „*plaque forming units*“ (PFU/ml) wurde 48 Std. nach Infektion mit Hilfe der X-Gal-Färbung bestimmt.

Die Untersuchungen zur Viruspartikelfreisetzung (Tab. 5, mittlere Spalte, *extrazellulär*) zeigten, dass nach Transfektion von pChatul-1 und pChatul-2 nur 1000 bis 10000 Viren pro ml nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu ergab die Analyse von pcHSRV2 und pSFV-1 Titer von mehr als 10^6 Partikel pro ml. Das entspricht mehr als der tausendfachen Menge infektiöser Viren im Vergleich zu pChatul-1 und pChatul-2.

Bei der Analyse von pChatul-3 stellte sich heraus, dass hier mit $1,3 \times 10^5$ Viren pro ml vergleichbare Virustiter erreicht werden konnten, wie sie auch für die Transfektion der molekularen Klone von PFV und SFV-1 gezeigt wurde.

<i>Plasmid</i>	<i>PFU/ml extrazellulär</i>	<i>PFU/ml intrazellulär</i>
pChatul-1	1×10^4	$1,3 \times 10^5$
pChatul-2	$4,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^5$
pChatul-3	$1,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
pCHSRV2	$3,6 \times 10^6$	3×10^7
pSFV-1	$2,9 \times 10^6$	3×10^7
pcDNA3.1	0/ml	0/ml
pEGFP-C1	0/ml	0/ml

Tab. 5: Infektionsanalyse von transfizierten infektiösen FFV-, PFV- und SFV-1-Klonen.

Verglichen wurde die Infektiosität der FFV-Klone pChatul-1, pChatul-2, pChatul-3, des PFV-Klon pcHRSRV2 sowie des SFV-Klon pSFV-1. Die zellfreien Überstände und die Zellysate wurden 48 Std. nach Transfektion auf den jeweiligen Zielzellen CrFK/LTR(FFV)*lacZ*, BHK/LTR(PFV)*lacZ*, und BHK/LTR(SFV-1)*lacZ* analysiert.

Da von PFV die Eigenschaft bekannt war, vornehmlich an intrazellulären Membranen zu knospen, sollte dieser Weg der Virusfreisetzung auch bei FFV analysiert werden. Dazu wurden von transfizierten 293T-Zellen *freeze-thaw*-Lysate hergestellt, indem die Zellen durch wiederholtes Einfrieren (-80°C) und Auftauen (37°C) aufgebrochen worden sind. Durch 0,45 µm-Filtration der Lysate wurden störende Komponenten beseitigt und die resultierenden Überstände auf entsprechenden Zielzellen austitriert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 5 dargestellt (Spalte rechts, *intrazellulär*). Im Vergleich zur extrazellulären Analyse von pChatul-1 und pChatul-2, ergab die intrazelluläre Analyse einen höheren Titer. Das bedeutet, dass zwar ein Zusammenbau infektiöser Partikel in der Zelle stattfindet, jedoch die Freisetzung dieser inhibiert ist. Bricht man die Zellen mechanisch auf, können freigesetzte Viruspartikel neue Zellen infizieren. Man könnte vermuten, dass ein Defekt im Env- oder Bet-Protein für diese reduzierte Freisetzung verantwortlich ist. Nach Analyse von pChatul-3-transfizierten Zellen stellte sich heraus, dass die extrazellulären und intrazellulären Titer sich kaum voneinander unterscheiden. Im Gegensatz dazu sind die intrazellulären Titer nach Transfektion von pcHRSRV2 und pSFV-1 signifikant erhöht. Dieses Ergebnis ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass PFV und SFV-1 vornehmlich an intrazellulären Membranen knospen.

3.1.3. Sequenzierung von pChatul-3

Durch Sequenzierung des infektiösen molekularen Klons pChatul-3 sollten Mutationen identifiziert werden, die während des fortgesetzten Passagierens des Virusübertrandes aufgetreten sein können. Beide Stränge von pChatul-2 und pChatul-3 wurden im Bereich der FFV-DNA mit Hilfe von 80 verschiedenen Sequenzierprimern sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden im Anschluss daran miteinander verglichen. In der Tab. 6 sind alle Mutationen aufgelistet, bei denen es sich um acht stumme Mutationen handelt, jedoch auch um vierzehn Mutationen, die fünfzehn Aminosäureaustausche nach sich ziehen.

Position	Region	pChatul-2	pChatul-3	Aminosäure
1791	Gag	GCC	GCT	A → A
2885	PR	ATA	GTA	I → V
3091	PR	TAT	TAC	Y → Y
5251	INT	TGT	TGC	C → C
5582	INT	GCT	ACT	A → T
5691	INT	ATA	ACA	I → T
6485	Env	CCC	CCT	P → P
6528	Env	GCA	ACA	A → T
6609	Env	ACT	GCT	T → A
6980	Env	AAG	AAA	K → K
7128	Env	AAA	GAA	K → E
7199	Env	GTT	GTC	V → V
7562	Env	GTC	GTT	V → V
7635	Env	TCT	CCT	S → P
8913	Env	TTT	CTT	F → L
8958	Env	TTT	CTT	F → L
9549	Tas/BEL-2	ACC/CCA	ATC/TCA	T → I/P → S
10294	BEL-2/U3	GGT	GTT	G → V
10297	BEL-2/U3	ATT	AAT	I → N
10300	BEL-2/U3	AAC	ACC	N → T
10316	BEL-2/U3	GGA	GGG	G → G

10377/10378	BEL-2/U3	TCA	CTA	S → L
10437	U3	A	G	
10852	U3	G	A	
11076	U3	G	T	
11161	R	C	T	
11318	U5	T	C	

Tab. 6: Sequenzierung der infektiösen molekularen FFV-Klone.

Aufgelistet sind sämtliche Mutationen beginnend am 5'-Ende des Genoms. In der ersten Spalte ist die Position der Mutation in der Sequenz angegeben, in der zweiten Spalte die betreffende Region. Die Spalten 3 (pChatul-2) und 4 (pChatul-3) geben die betreffende Base bzw. das betreffende Aminosäure-Triplett an. In der letzten Spalte ist der durch die Mutation entstandene Aminosäureaustausch bzw. die stumme Mutation aufgelistet.

Von den fünfzehn gefundenen Aminosäureaustauschen blieben nur bei vier Aminosäuren die Seitenketten gleich (2885, 8913, 10294, 10300). Der grösste Anteil der Mutationen zieht einen Wechsel von einer unpolaren Seitenkette in eine ungeladene polare Seitenkette nach sich (5582, 5691, 6528, 9549/2, 10297) sowie die umgekehrte Variante, d.h. der Austausch einer ungeladenen polaren Seitenkette in eine unpolare Seitenkette (6609, 7635, 9549/1, 10377/10378). Nur ein Aminosäureaustausch führt zur Umwandlung einer basischen Seitenkette in eine saure (7128). Die übrigen fünf Mutationen, bei denen in der letzten Spalte keine Aminosäure angegeben ist, betreffen keinen Leserahmen. Ob eine dieser Mutationen oder die beschriebenen Aminosäureaustausche dafür verantwortlich sind, dass pChatul-3 wesentlich besser repliziert als dessen Vorgänger pChatul-2 muss noch geklärt werden.

3.2. Analyse der Pseudotypisierbarkeit von FFV-Kapsiden

Für die Orthoretroviren konnte gezeigt werden, dass für den Zusammenbau von so genannten Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) und deren Freisetzung die zelluläre Expression von Kapsid-Protein (Gag) ausreichend ist (Boulanger & Jones, 1996, Swanstrom & Wills, 1997). Im Gegensatz dazu ist bei den Foamyviren die Koexpression des zugehörigen Hüllproteins essentiell, um einen Partikelexport aus der Zelle zu ermöglichen (Baldwin & Linial, 1998, Fischer *et al.*, 1998, Pietschmann *et al.*, 1999). Dabei erfolgt die Abschnürung der Viruspartikel in intrazelluläre Kompartimente, vermutlich ins endoplasmatische Retikulum (ER), aber auch an der Zelloberfläche. In Zellen, die mit einem Env-defizienten Provirusklon transfiziert wurden, konnte keine Partikelfreisetzung beobachtet werden, jedoch konnten „nackte“ Kapside im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden.

3.2.1. Herstellung von FFV-Expressionsplasmiden

Um die Pseudotypisierbarkeit von FFV-Kapsiden durch FV-Hüllproteine untersuchen zu können, wurden zunächst zwei *gag-pol*-Expressionsplasmide kloniert (Abb. 12), die beide vom Provirusklon pChatul-2 abstammen.

Nach einem *KpnI*-Restriktionsverdau von pChatul-2, der das FFV *env*-Gen und die akzessorischen Leserahmen entfernt, wurde das 11,4 kb-Fragment isoliert, mit Hilfe der T4 DNA Polymerase glatte Enden erzeugt und anschliessend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die 2,06 kb EGFP/Neo^R-Kassette, durch einen Verdau mit *HindIII* aus pJR4 (siehe Anhang) erhalten, wurde in den linearisierten Vektor inseriert. Das resultierende Plasmid (pWR6) exprimiert Gag und Pol unter Kontrolle des CMV-Promotors, das Fusionsprotein EGFP/NeoR unter Kontrolle des SFFV (Spleen Focus Forming Virus)-U3-Promotors.

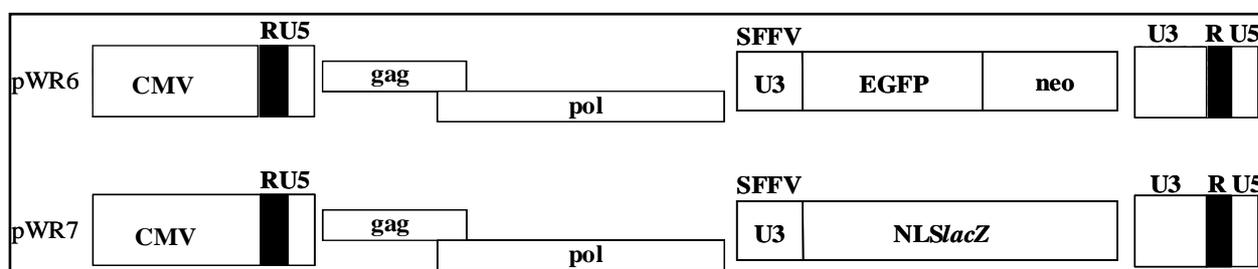


Abb. 12: Schematische Darstellung der FFV-Expressionsplasmide pWR6 und pWR7.

Beide Plasmide verfügen über die essentiellen Regionen R und U5 am 5'-Ende des Genoms und zeichnen sich durch eine CMV-gesteuerte Gag und Pol Proteineexpression aus. Statt des Leserahmens für Env und der akzessorischen Leserahmen befindet sich an dieser Position im Falle von pWR6 eine SFFV/U3-EGFP/NeoR-Kassette, in pWR7 eine SFFV/U3-NLSlacZ-Kassette. Beide Konstrukte besitzen am 3'-Ende die vollständige 3'-LTR.

Ähnlich aufgebaut ist das zweite Expressionsplasmid (pWR7), das statt der EGFP/Neo^R-Kassette ein NLSlacZ-Gen exprimiert (ein nukleäres Lokalisationssignal ist mit einem *lacZ*-Gen fusioniert). Um die SFFV-U3/NLSlacZ-Kassette in den pChatul-2-linearisierten Vektor zu inserieren, musste diese aus dem Plasmid pMD05 (siehe Anhang) mit Hilfe von zwei Restriktionsverdau isoliert werden. Der erste Verdau mit *Eco47III/Eco81I* ergab ein 0,72 kb-Fragment, der zweite Verdau mit *Eco81I/Bsp68I* ergab ein 2,87 kb-Fragment. In einer „drei-Fragment-Ligation“ wurden diese zwei Produkte in das mit *KpnI*- und *BsaBI*-verdaute pChatul-2 Plasmid inseriert.

Für weitere Untersuchungen der Pseudotypisierbarkeit war es ausserdem notwendig, ein FFV Env-Konstrukt herzustellen, das in der Lage ist, sein zugehöriges FFV-Kapsid zu umhüllen. Die Klonierung eines FFVenv Konstrukts erfolgte mit Hilfe einer PCR, in der einmal genomische DNA aus FFV-infizierten CrFK-Zellen als Template eingesetzt wurde, in einer zweiten Reaktion jedoch auch pChatul-3 als Matrize diente. Die Primer #1178/*XhoI* und #1179/*XhoI* amplifizierten

das 3,02 kb-Fragment, das in den pcDNA3.1zeo-Vektor inseriert wurde. Die resultierenden Plasmide pJR27 (FFV-genomische DNA als Matrize) und pJR28 (pChatul-3 als Matrize) wurden für die Analyse der Pseudotypisierung eingesetzt.

3.2.2. Analyse der Pseudotypisierbarkeit von FFV-Expressionsplasmiden

Es konnte bereits für PFV gezeigt werden, dass fremde virale Hüllproteine, wie VSV-G (das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus) oder das MuLV-Glykoprotein nicht in der Lage waren, PFV-Kapside zu pseudotypisieren (Pietschmann *et al.*, 1999). Jedoch sind Env-Proteine anderer FV-Spezies dazu in der Lage, wie z.B. die Glykoproteine von SFV-1 und PFV. Man muss dem zufügen, dass die Pseudotypisierbarkeit von FV-Kapsiden mit FV Env-Proteinen deutlich vom Leaderpeptid abhängig ist, das eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Env-Protein und Kapsid zu spielen scheint. Da das Leaderpeptid die Pseudotypisierbarkeit nicht allein determiniert, sind möglicherweise zusätzliche Interaktionen des Leaderpeptids mit anderen Domänen des Env-Proteins erforderlich (Lindemann *et al.*, 2001).

Um festzustellen, inwiefern FFV-Kapside durch das homologe und heterologe Glykoproteine pseudotypisierbar sind, wurden 293T-Zellen mit den Expressionsplasmiden pWR6 und pWR7 sowie dem zu untersuchenden Env-Konstrukt kotransfiziert. Die Expression des EGFP-Markergens in pWR6 ermöglichte die Bestimmung von Infektionseffizienzen mit Hilfe von FACS-Analysen. Im Falle von pWR7 erfolgte die Bestimmung durch die Titration der zellfreien Virusüberstände und nachfolgender X-Gal-Färbung. Die Anzahl der gefärbten Zellen wurde anschliessend ausgezählt. In 6 cm-Schalen ausgesäte 293T-Zellen wurden zunächst mit 20 µg Gesamt-DNA transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Überstände und Zellysate geerntet und zur Infektion von HT1080-Zellen verwendet. Weitere 48 Std. später wurde die Infektionseffizienz mittels FACS-Analyse oder X-Gal-Färbung bestimmt. Daneben sollte zusätzlich die Pseudotypisierbarkeit von verschiedenen retroviralen Kapsiden durch FFV-Env getestet werden. Bei den getesteten Kapsiden handelte es sich um die Konstrukte pMH92 (PFV *gag-pol*), pMR02 (SFV-1 *gag-pol*), pcAMS/U3EN (MuLV *gag-pol*), und pGJ3/U3E (HIV-1 *gag-pol*). Als Hüllproteine wurden pJR28 (FFV-*env*), pCenv-1 (PFV-*env*) und pcVG-wt (Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus) verwendet. Die Ergebnisse der FACS-Analysen sind in Abb. 13 zusammengefasst.

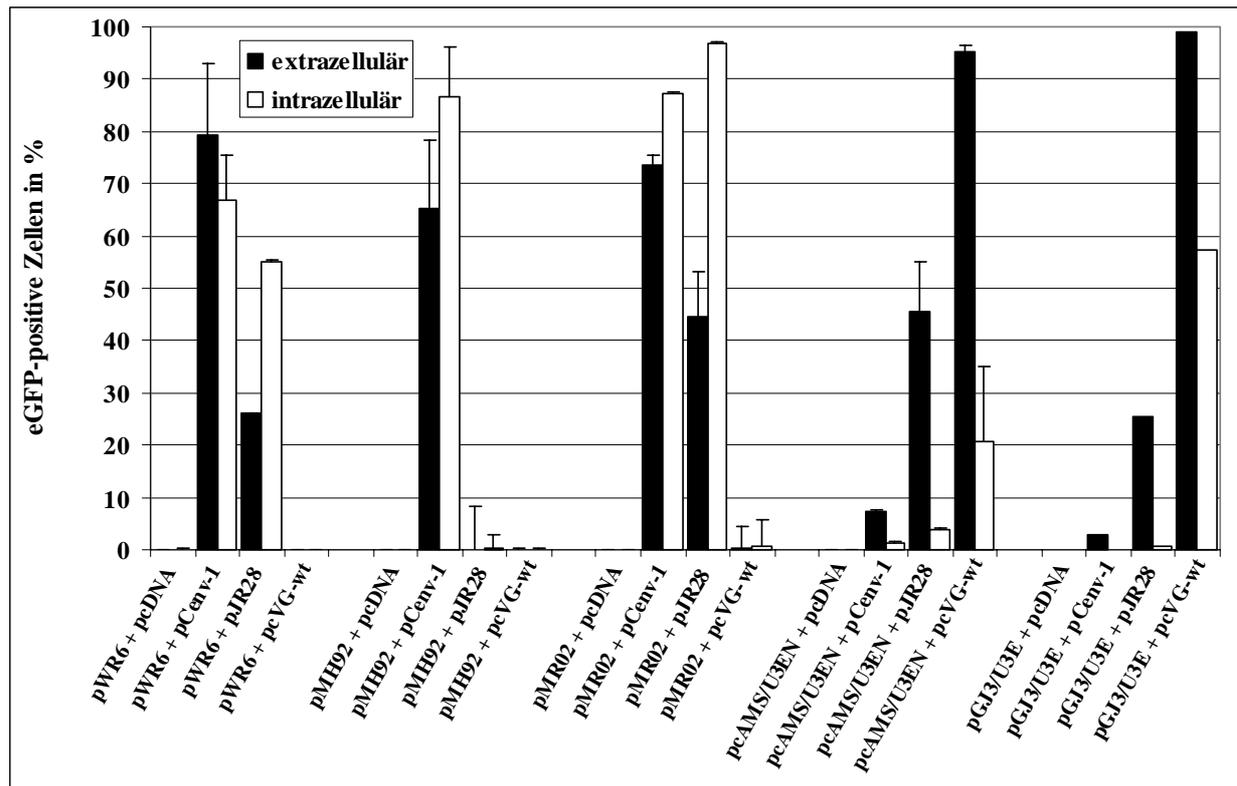


Abb. 13: Analyse von FV-Kapsiden pseudotypisiert mit verschiedenen Hüllproteinen.

Die Kotransfektionen wurden mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode durchgeführt, die zellfreien Überstände und Zellysate nach 48 Std. geerntet und auf HT1080-Zellen überführt. 48 Std. nach Transduktion wurden die Zellen abgelöst und im Durchflusszytometer analysiert. Im Diagramm sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen aus drei verschiedenen Experimenten dargestellt.

Die Infektionsanalyse hat die Verpackung von FFV-Kapsiden mit dem homologen FFV-Hüllprotein erwartungsgemäss nachgewiesen. Dabei ergab die Pseudotypisierung von pWR6 mit dem Konstrukt pJR28 im Falle der Übertragung der zellfreien Überstände eine Infektionseffizienz zwischen 20 % und 30 %, die Transduktion der präparierten Zellysate ergab Werte zwischen 50 % und 60 %. Obwohl phylogenetisch kaum miteinander verwandt, ist das PFV Env (pCenv-1) in der Lage, FFV-Kapside besser zu pseudotypisieren, als das homologe Env-Protein. Während nach Transduktion der Überstände nahezu 80 % EGFP-positive Zellen nachgewiesen werden konnten, liegt in dieser Transfektion der Wert der intrazellulären Analyse mit ca. 67 % unter dem der extrazellulären. Diese Analyse der Pseudotypisierbarkeit von oben genannten Kapsiden durch FFV-Env, PFV-Env und VSV-G ergab, dass das PFV-Kapsid überaus effizient durch das homologe PFV-Env pseudotypisiert wird (65 %), jedoch nicht durch FFV-Env oder VSV-G. Im Falle des transfizierten SFV-1-Kapsids (pMR02) zusammen mit PFV-Env konnten infektiöse extrazelluläre Partikel nachgewiesen werden (73 %), und auch die Transduktion der Zellysate ergab eine Effizienz von 87 %. Die Transduktionseffizienz zusammen mit FFV-Env lag dagegen bei nur etwa 44 %. Die Transduktion der Zellysate ergab

jedoch einen relativ hohen Wert von ungefähr 97 %. Das untersuchte MuLV-Kapsid (pcAMS/U3EN) wurde kaum von PFV-Env, indessen mit einer Effizienz von 45 % durch FFV-Env pseudotypisiert. Auffallend war die effiziente Infektion der Zellen mit dem HIV-1-Kapsid (pGJ3/U3E) pseudotypisiert durch FFV-Env (25 %). Obwohl phylogenetisch weit voneinander entfernt, ist das FFV-Hüllprotein offensichtlich in der Lage, mit dem HIV-1-Kapsid infektiöse Viren zu bilden. Das Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus pseudotypisiert wie erwartet keine FV-Kapside, allerdings sehr effizient MuLV-Kapside (pcAMS/U3EN: 95 %) und HIV-Kapside (pGJ3/U3E: 99 %).

Um die Pseudotypisierbarkeit des Konstrukts pWR7 zu testen wurde dieses auf 293T-Zellen mit FFV Env-Plasmiden sowie heterologen Glykoproteinen kotransfiziert. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Kalzium-Phosphat-Methode wurde hier jedoch mit Hilfe des PolyFect-Reagenz transfiziert. Von den unten aufgeführten Plasmiden (Tab. 7) wurden jeweils 3 µg Plasmid (6 µg Gesamt-DNA) eingesetzt.

<i>Plasmid</i>	<i>PFU/ml extrazellulär</i>	<i>PFU/ml intrazellulär</i>
1. pWR7/pczFFVenv	$4,6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^7$
2. pWR7/pJR27	$4,4 \times 10^5$	2×10^7
3. pWR7/pJR28	$2,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$
4. pWR7/pCenv-1	$2,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$
5. pWR7/pSFV-1 Env	$1,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
6. pWR7/pciGALV Env	0	0
7. pWR7/pcziMEA	0	0
8. pWR7/pcVG-wt	0	0
9. pMH120/pCenv-1	$2,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
10. pEGFP-C1	0	0
11. pcDNA3.1	0	0

Tab. 7: Infektionsanalyse von pWR7 mit verschiedenen Glykoproteinen.

Die Kotransfektionen wurden mit Hilfe der Polyfect-Methode durchgeführt, die zellfreien Überstände und Zellysate nach 48 Std. geerntet und auf HT1080-Zellen transferiert. 48 Std. nach Transduktion wurden die Zellen fixiert und X-Gal gefärbt.

Die Expression wurde 24 Std. nach Transfektion für 7 Std. mit Natriumbutyrat induziert und die zellfreien Überstände sowie Zellysate am Folgetag geerntet. Zuvor eingesäte HT1080-Zellen wurden für 48 Std. infiziert, anschliessend mit Hilfe der X-Gal-Färbung (5-Brom-4-chlor-3-

indolyl- β -galaktosid) gefärbt und die Anzahl der infizierten Zellen ausgezählt. Mit Hilfe dieser Transfektionsmethode konnten sehr effiziente Infektionen nachgewiesen werden (Tab. 7). Nach Kotransfektion mit den FFV-Env-Konstrukten und Transduktion der zellfreien Überstände wurde eine Infektionseffizienz bis zu $2,5 \times 10^6$ PFU/ml nachgewiesen (Transfektionen 1, 2 und 3). Nach Transduktion der Zellysate stieg die Effizienz auf $2,7 \times 10^7$ PFU/ml (Transfektion 3, intrazellulär). Zusätzlich wurden als heterologe Hüllproteine die Glykoproteine von PFV (4: pCenv-1), SFV-1 (5: pSFV-1-Env), GALV (6: pciGALV-Env; Hüllprotein des Gibbon-Affen-Leukämie-Virus), MuLV (7: pcziMEA) und VSV (8: pcVG-wt) kotransfiziert. Während die Hüllproteine von PFV und SFV-1 sowohl extra- als auch intrazellulär zur Partikelassoziation in der Lage sind, sind die heterologen Hüllproteine (GALV-Env, MuLV-Env, VSV-G) nicht zur Partikelfreisetzung geeignet.

Als Negativ-Kontrollen wurden die Plasmide pEGFP-C1 und pcDNA3.1 eingesetzt, die in der Tabelle als Transfektionen 10 und 11 dargestellt sind.

3.2.3. Untersuchungen zum Partikelexport bei FFV

Von den Orthoretroviren ist bekannt, dass Sequenzen in der Matrix-Domäne des Gag-Proteins für die Interaktion der Vorläuferproteine mit der Zytoplasmamembran verantwortlich sind (Einfeld, 1996, Kräusslich & Welker, 1996). Unabhängig von der Expression eines Hüllproteins ist das Gag-Polyprotein in der Lage, die Freisetzung von „virus like particles“ (VLPs) zu ermöglichen. Bei den Foamyviren der Primaten ist dagegen die Env Expression essentiell für die Freisetzung von Viruspartikeln (Baldwin & Linial, 1998, Fischer *et al.*, 1998).

Um dieses Merkmal der Foamyviren bei FFV zu analysieren, wurden 293T-Zellen nur mit einem FFV-Gag-Pol-Plasmid transfiziert (pJR39), parallel wurde neben dem Gag-Pol-Plasmid auch das homologe Env-Plasmid (pJR28) kotransfiziert. Neben dem FFV-Gag-Pol-Plasmid pJR39 (siehe 3.2.5.) wurde ein weiteres FFV-Gag-Pol-Plasmid verwendet, bei dem die Startkodons der noch vorhandenen restlichen Env-Sequenzen mutiert worden sind (pcDWF002). Als Kontrollen wurden die analogen PFV Gag-Pol-Konstrukte (pMH120 und pczDWP002) zusammen mit pCenv-1 sowie die SFV-1-Plasmide pMR02 und pcDWS002 mit pciSFV-1 Env kotransfiziert. pczDWP002 und pcDWS002 sind die homologen PFV- bzw. SFV-1-Plasmide zu pcDWF002. Mit Hilfe der Polyfect-Transfektion wurden 6 μ g DNA in die Zellen eingebracht und die Expression unter Kontrolle des CMV-Promotors nach 24 Std. induziert. Die Zellen wurden nach weiteren 24 Std. lysiert, mit Protein-Probenpuffer versetzt und auf ein SDS-PAGE-Gel

aufgetragen. Die abgenommenen Überstände wurden 0,45 µm sterilfiltriert und 10,5 ml durch ein 20 % Saccharosekissen ultrazentrifugiert (30000 rpm, 2 Std., 4°C). Die Proben wurden in 50 µl Protein-Probenpuffer resuspendiert und ebenfalls aufgetragen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 14 demonstriert.

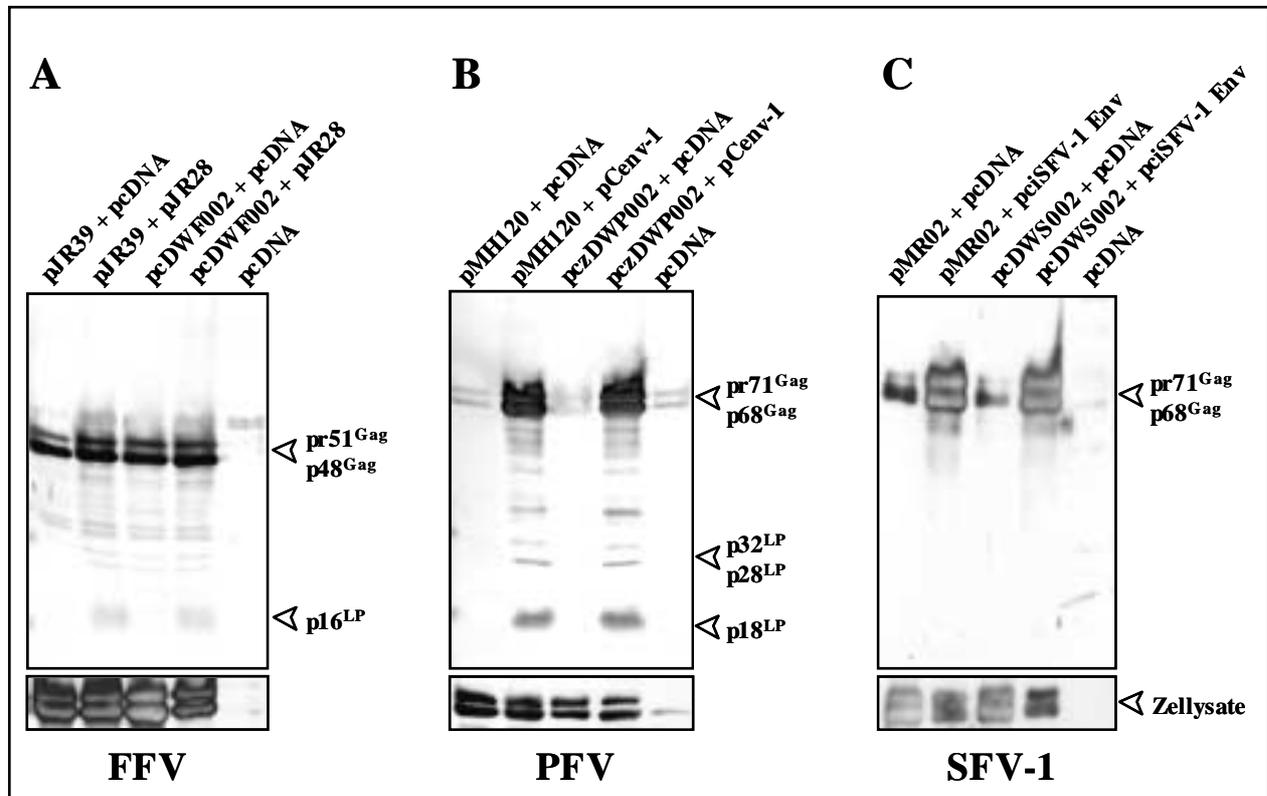


Abb. 14: Vergleichende Western Blot-Analyse zum Partikelexport bei FFV, PFV und SFV-1.

Für den Nachweis von Viruspartikeln im Zellkulturüberstand wurden 293T-Zellen mit Polyfect transfiziert, 24 Std. später wurde die CMV-Promotoraktivität mit Natriumbutyrat stimuliert und nach weiteren 24 Std. die Überstände und Zellysate geerntet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den entsprechenden polyklonalen Seren. Im oberen Teil der Abbildung sind die Proteine aus den zellfreien Überständen dargestellt, im unteren Teil der Nachweis der Gag-Proteinexpression aus den präparierten Zellysaten.

Das Ergebnis aus dem PFV-Partikelexport bestätigt die schon bekannten Resultate, dass ohne das PFV-Hüllprotein sehr wenig Partikel aus der Zelle freigesetzt werden können. Weder mit pMH120 noch mit pcDWP002 konnten nennenswert in den Zellkulturüberstand sezernierte Viruspartikel in Abwesenheit des PFV-Hüllproteins nachgewiesen werden (Abb. 14: B). Wurde das PFV-Env kotransfiziert (pCenv-1) konnte neben der Gag-Proteinexpression auch die Expression von PFV-Env gezeigt werden. Im Falle von SFV-1 als ein weiterer Vertreter der Primaten-FV sieht das Ergebnis ähnlich aus. Hier konnten jedoch auch in Abwesenheit von SFV-1-Env (pciSFV-1 Env) Spuren von SFV-1-Gag im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 14: C). Ein partieller Partikelexport wird damit gezeigt; die Menge der Gag-Proteine in diesem Falle ist allerdings deutlich geringer als in Anwesenheit des SFV-1-

Hüllproteins. Entgegen der Erwartung, dass Foamyviren in Abwesenheit eines Hüllproteins keine Partikel freisetzen können, ergab die Analyse von FFV einen vergleichbaren Partikelexport in Anwesenheit, aber auch in Abwesenheit des FFV-Hüllproteins (Abb. 14: C). Der untere Teil der Abb. 14 zeigt, dass die Gag-Expressionslevel in den transfizierten Zellen vergleichbar sind. Bei SFV-1 ist die Menge an Gag-Protein geringer, wenn die Partikel in Anwesenheit von SFV-1 Env freigesetzt werden können. Können die Partikel aufgrund der fehlenden SFV-1 Env nicht freigesetzt werden, akkumulieren diese daher in den Zellen und eine stärkere Gag-Proteinexpression wird nachgewiesen.

Dieser erste Hinweis ist jedoch allein noch kein hinreichender Beweis für den FFV-Partikelexport in Abwesenheit vom Hüllprotein. Weitere Möglichkeiten, dieses Verhalten zu untersuchen, bestehen in der metabolischen Markierung der zu analysierenden Zellen mit anschließender Radioimmunpräzipitation (RIPA) sowie in der Elektronenmikroskopie.

3.2.4. Einfluss von FFV-Bet auf die Virusreplikation von FFV

Bis vor kurzem war über die Bedeutung des Bet-Proteins nur wenig bekannt. Es konnte jedoch für das FFV-Bet-Protein gezeigt werden, dass es für die FFV-Replikation eine wichtige Rolle im Replikationszyklus spielt (Alke *et al.*, 2001). In dort präsentierten Ergebnissen führten Mutationen im *bet*-Gen zu einer 1000fachen Reduktion der Virustiter in analysierten CrFK-Zellen. In dieser Arbeit sollte daher nachgewiesen werden, ob Mutationen im *bet*-Leserahmen im infektiösen molekularen FFV-Klon pChatul-3 zu einer verringerten Virusreplikation führen. Mit Hilfe einer PCR-Reaktion wurde ein 1135 Bp Fragment erzeugt, das an den Enden die Erkennungsschnittstellen der Restriktionsenzyme *AvrII* und *XbaI* besaß. Parallel wurde der volle-Länge FFV-Klon pChatul-3 mit *XbaI* verdaut, das 1184 Bp-Fragment verworfen und das PCR-Fragment in den verbliebenen Vektor inseriert. Somit wurde das *bet*-Gen verkürzt und durch diese Klonierung gleichzeitig der *bet*-Leserahmen nach 154 Aminosäuren unterbrochen (siehe Anhang). Das resultierende Plasmid (pJR43) wurde anschliessend in 293T- und CrFK-Zellen mit Polyfect transfiziert und die Virusreplikation auf CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen 48 Std. nach dem Transfer der zellfreien Überstände analysiert. Die Zellysate der transfizierten 293T-Zellen wurden geerntet und im Western Blot mit einem α FFV Bet-Antiserum auf die Bet-Proteinexpression getestet. Als interne Kontrolle sollte die Gag-Expression mit einem α FFV Gag-Antiserum dargestellt werden. Die Analyse der Proteinexpression ist in Abb. 15 dargestellt.

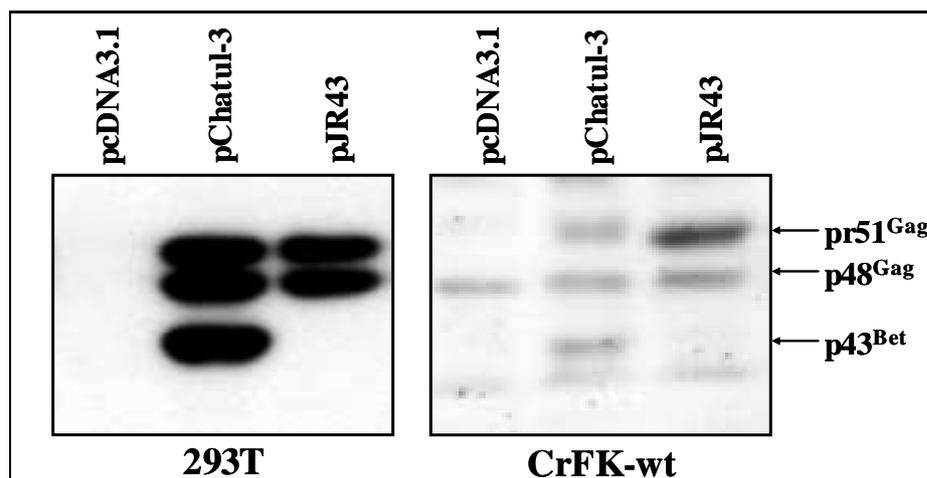


Abb. 15: Analyse der Bet-Proteinexpression in FFV.

Die Zelllinien 293T und CrFK-wt wurden mit dem molekularen infektiösen FFV-Klon pChatul-3 sowie der *bet*-Deletionsmutante transfiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellysate geerntet und im Western Blot mit einem α FFV Gag- und einem α FFV Bet-Serum beprobt.

Im Gegensatz zu einer effizienten Bet- und Gag-Proteinexpression in 293T-Zellen ist die Proteinexpression in transfizierten CrFK-Zellen relativ schwach. Für die Bet-Deletionsmutante konnte jedoch erfolgreich gezeigt werden, dass die Gag-Expression in 293T-Zellen gleich ist, eine Bet-Expression ist dagegen nicht mehr nachweisbar. Durch Titration der Virusüberstände konnte ausserdem nachgewiesen werden, dass trotz fehlender Bet-Expression die transiente Replikation in 293T-Zellen kaum beeinträchtigt ist (Tab. 8).

	pcDNA3.1	pChatul-3	pJR43
293T	0/ml	$9,5 \times 10^4$	5×10^4
CrFK-wt	0/ml	7×10^2	0/ml

Tab. 8: Bet-Expression bei pChatul-3 mit einem pChatul-3-Bet-Deletionskonstrukt.

Neben 293T-Zellen wurden CrFK-Zellen mit $6 \mu\text{g}$ des jeweiligen Konstrukts transfiziert und die Virustiter auf CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen 48 Std. nach Infektion bestimmt.

Zusätzlich wurden CrFK-wt-Zellen mit den Überständen der transfizierten 293T-Zellen mit einer M.o.i. von 0,01 infiziert (M.o.i.=*Multiplicity of infection*; das entspricht 0,01 Viruspartikel/Zelle). Die Überstände der infizierten CrFK-Zellen wurden wiederum nach 72 Std. auf CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen titriert. Die Untersuchung im Fall von pChatul-3 ergab einen Titer von $1 \times 10^3/\text{ml}$, im Gegensatz dazu konnten für pJR43 keine infektiösen Viruspartikel mehr nachgewiesen werden. Dieses Resultat weist darauf hin, dass Bet für die Replikationsfähigkeit von FFV eine essentielle Rolle spielt.

Neben der Analyse der Bet-Funktion im proviralen Kontext wurde zusätzlich die Expression eines Bet-Expressionsplasmids untersucht. Für die Klonierung konnte die DNA des infektiösen

Klons pChatul-3 nicht direkt als Matrize verwendet werden, da es sich bei Bet um ein Fusionsprotein aus Teilen von Tas und Bel-2 handelt, welches von einem gespleissten Transkript translatiert wird. Anstelle dessen wurde für die Amplifikation DNA aus FFV-infizierten CrFK-Zellen verwendet. In den den infizierten Zellen hat die reverse Transkription bereits stattgefunden und die vorhandenen mRNAs, darunter auch die gespleisste *bet*-RNA, in cDNA umgeschrieben (Bodem *et al.*, 1998a). Mit Hilfe einer PCR wurden unter der Verwendung der Primer #792/*SacI* und #794/*PmlI* zwei Fragmente amplifiziert. Diese enthalten sowohl das ungespleisste Transkript mit einer Grösse von 1539 Bp als auch das gespleisste Transkript mit einer Grösse von 1254 Bp. Beide Produkte wurden isoliert und mit Hilfe der Enzyme *SacI* und *PmlI* in das *SacI/PmlI*-geöffnete Plasmid pMH02 inseriert (pJR26 und pJR42; siehe Anhang). Nach Transfektion von 293T-Zellen konnte bei beiden Konstrukten die erfolgreiche Bet-Expression mit einem Kaninchen α FFV-Bet-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 16, links). Es wurde die FFV Bet-Expression sowohl nach Transfektion von pJR42 als auch von pJR26 nachgewiesen, wobei sie nach Transfektion von pJR42 deutlich ineffizienter als die von pJR26. Dies ist möglicherweise auf einen fehlenden Spleissdonor zurückzuführen und das Umklonieren in einen Vektor mit einem Spleissdonor sollte wieder zu einer gesteigerten Bet-Expression führen. Um näheres über die Funktion dieses Proteins zu erfahren, wurden die Plasmide in den schon oben erläuterten Pseudotypisierungs-Experimenten eingesetzt. Neben pWR6 und einem Plasmid, das für ein FV Hüllprotein kodiert, wurde zu den Ansätzen das jeweilige Bet-Expressionsplasmid sowohl in 293T- als auch in CrFK-Zellen kotransfiziert. Nach 48 Std. wurden HT1080-Zellen mit den zellfreien Überständen transduziert und nach weiteren 72 Std. die Transduktionseffizienz im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellysate der transfizierten 293T-Zellen wurden für den Nachweis der Bet- sowie Gag-Expression mit einem Kaninchen α FFV Bet- und einem Kaninchen α FFV Gag-Antikörper im Western Blot verwendet. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in der Abb. 16 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach der Transfektion von beiden Zelllinien mit einem FFV Gag-Pol-Plasmid sowie einem Hüllprotein (bzw. pcDNA als Kontrolle) eine gleichmässige Gag-Expression nachgewiesen werden konnte. Jedoch sind die Transfektionseffizienzen bei 293T-Zellen wie erwartet höher als bei CrFK-Zellen (bis zu 65 % in Gegenwart von pCenv-1). Bei der Kotransfektion von pJR26 kommt es bei den 293T-Zellen zu einem starken Abfall der Transduktionseffizienz, eine gleichmässige Bet-Expression konnte neben einer leicht abgeschwächten Gag-Expression gezeigt werden.

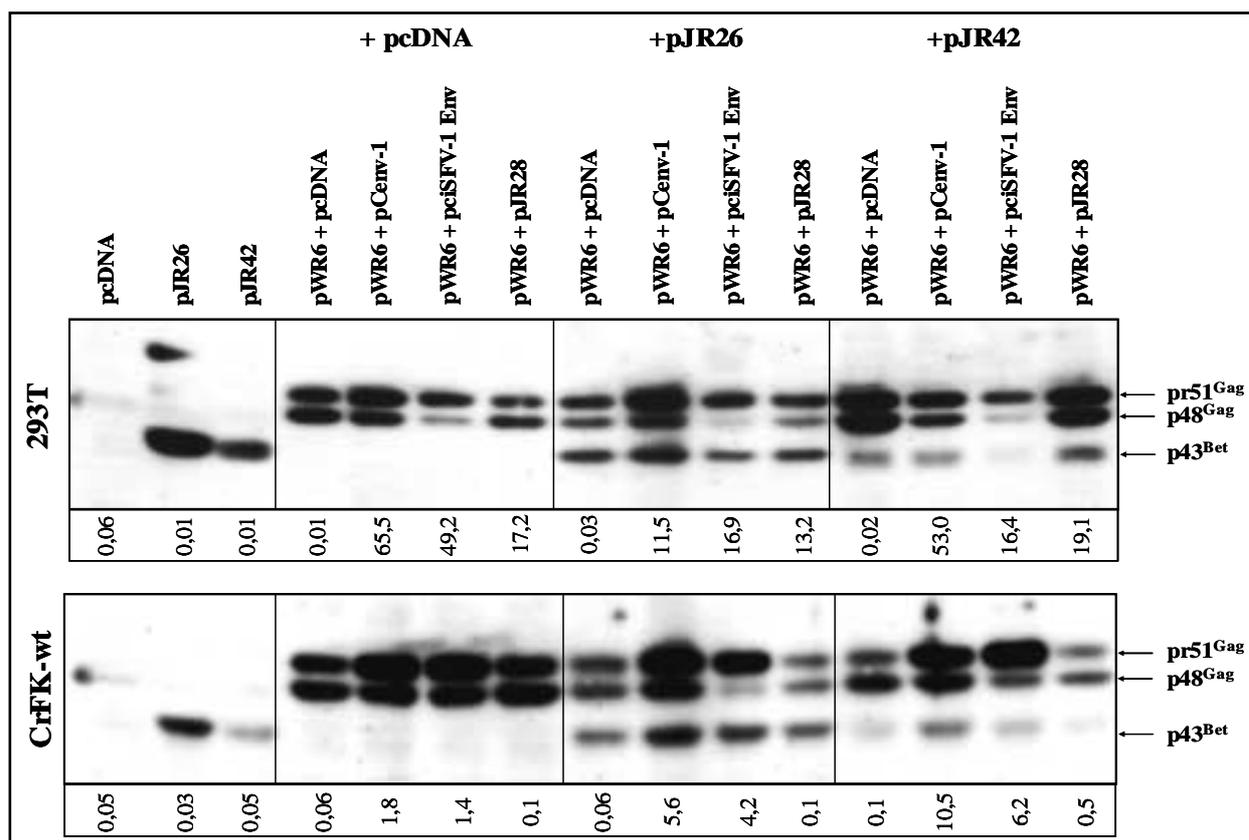


Abb. 16: Analyse der Bet-Expression in Bezug auf die Pseudotypisierung.

293T- und CrFK-Zellen wurden mit den über den Abbildungen angegebenen Plasmiden transfiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellysate geerntet und im Western Blot die Gag- und Bet-Expression nachgewiesen. Die zellfreien Überstände wurden auf HT1080-Zellen transduziert und die EGFP-positiven Zellen nach weiteren 72 Std. im FACS gemessen (die Transduktionseffizienz ist unter den Abbildungen angegeben).

Im Gegensatz dazu sind die Werte nach der Bet-Kotransfektion in CrFK-Zellen leicht erhöht. Ähnlich verhalten sich die Werte nach der Kotransfektion von pJR42. Worauf die Erniedrigung in 293T-Zellen bzw. die Erhöhung in CrFK-Zellen zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden.

3.2.5. Herstellung eines FFV-Pol-Expressionsplasmids

Neben den FFV-Gag-Pol-Expressionsplasmiden und Expressionsplasmiden, die für das FFV-Env kodieren, wurde zusätzlich ein FFV-Pol-Konstrukt hergestellt. Dieses wurde zwar auf seine Expression hin untersucht, jedoch für weitere Untersuchungen nicht eingesetzt. Um ein funktionelles FFV-Pol-Konstrukt herzustellen, wurde der Bereich des FFV-Gag-Gens in der Art und Weise deletiert, dass die Spleissakzeptorstelle (SA) auf die Spleissdonorstelle (SD) ligiert wird. Damit lag die Leadersequenz der *pol*-mRNA als Struktur vor, wie sie nach dem Spleissen in der Zelle vorhanden ist. In Vorbereitung dazu wurde pChatul-3 mit dem Restriktionsenzym

KpnI verdaut, so dass der *env*-Anteil sowie der Bereich zwischen FFV-*env* und U3-Region deletiert wurde (pJR39). Mit Hilfe von zwei PCR-Reaktionen wurden anschliessend zwei Fragmente amplifiziert. Das erste Fragment, amplifiziert mit den Primern #1139/*BglIII* und #1140, besass eine Grösse von 896 Bp, das zweite Fragment mit 851 Bp wurde mit den Primern #1141 und #1142/*EcoRV* amplifiziert. Da die beiden Fragmente durch Amplifizieren mit den Primern #1140 und #1141 einen überlappenden Bereich besitzen, war es möglich, durch eine zusätzliche PCR-Reaktion ein grösseres PCR-Fragment von 1,72 kb zu amplifizieren. Dieses PCR-Fragment wurde in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Nach der Identifizierung eines Klons, der das PCR-Produkt enthält, wurde nach einer DNA-Präparation dieses 1,72 kb-Fragment mit Hilfe der Enzyme *EcoRV* und *BglIII* wieder herausgeschnitten und in die parallel mit *BglIII* und *EcoRV* verdaute pJR39-DNA inseriert. Der resultierende Klon wurde als pCpol-FFV bezeichnet und im anschliessenden Experiment auf seine Expression hin untersucht. Der FFV-Pol-Proteinnachweis ist in Abb. 17 dargestellt.

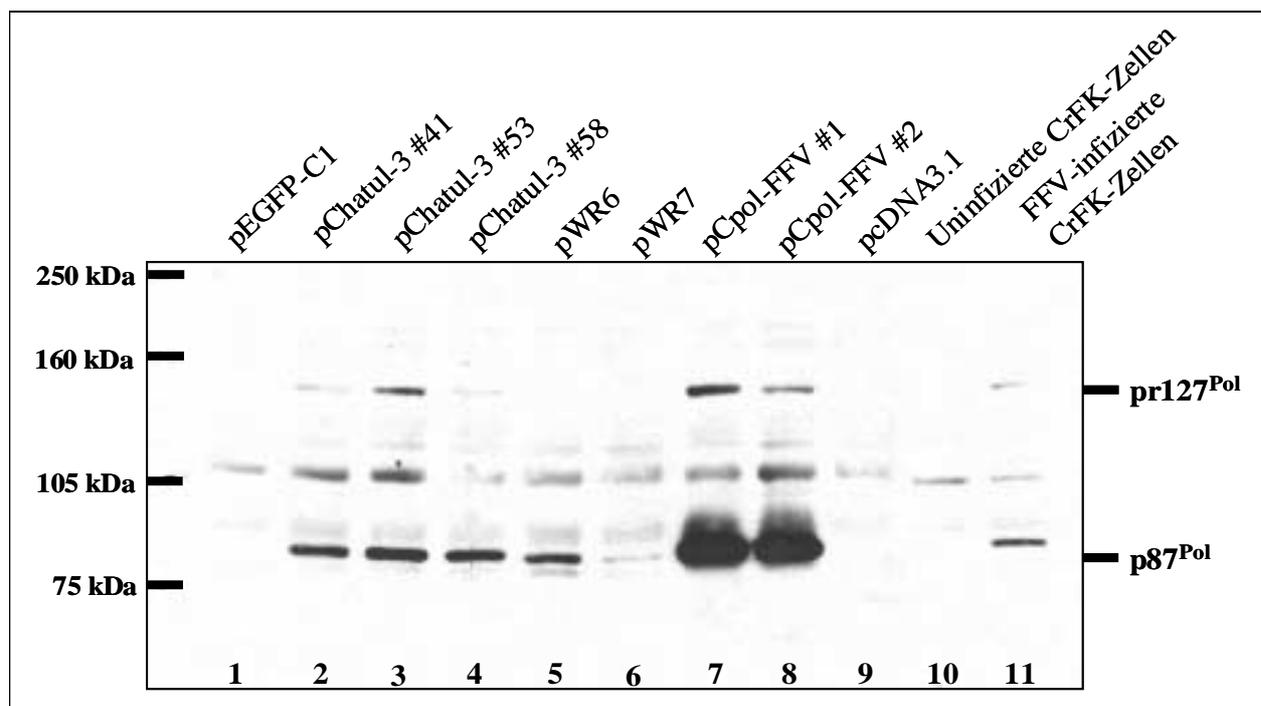


Abb. 17: FFV-Pol-Expression nach Transfektion von 293T-Zellen.

Neben der Transfektion verschiedener Pol-exprimierender Plasmide wurden zusätzlich CrFK-Zellen mit FFV infiziert. Die Zellen wurden 48 Std. nach Behandlung mit RIPA-Puffer lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert. Der Grössenstandard (Rainbow-Marker, Amersham Biosciences) ist links dargestellt, rechts der Abbildung sind die Grössen der beiden Pol-Proteine angezeigt. Über den Spuren eins bis elf sind die jeweils aufgetragenen Proben bezeichnet.

Als Negativkontrollen sind Zellysate von pEGFP-C1- und pcDNA3.1-transfizierten Zellen aufgetragen (Spuren 1 und 9) sowie unbehandelte CrFK-Zellen (Spur 10). Als Positivkontrolle diente eine FFV-infizierte CrFK-Zellkultur (Spur 11). Das Ziel des Experiments war, die Pol-

Expression in den infektiösen-Klonen, den FFV-Gag-Pol-Expressionsplasmiden (pWR6 und pWR7) sowie von den pCpol-FFV-Konstrukten (pCpol-FFV#1 und pCpol-FFV#2) zu zeigen. Nachgewiesen werden konnte die Expression des FFV-Pol-Vorläuferproteins pr127^{Pro-Pol} und das p87^{Pol}-Protein. Während in den infektiösen FFV-Klonen eine mittlere Expression gezeigt werden konnte (Spuren 2, 3 und 4), ist die Pol-Expression von den Expressionsplasmiden pWR6 und pWR7 etwas niedriger (Spuren 5 und 6). Eine signifikant höhere Expression des Proteins konnte dagegen für die FFV-Pol-Klone gezeigt werden (Spuren 7 und 8), deren Expression im Vergleich zu den anderen Proben ca. zehnmal stärker ist. Die Expression von FFV-Pol in infizierten CrFK-Zellen (Spur 11) unterscheidet sich nicht wesentlich von der Pol-Expression von pWR6 und pWR7. Neben den FFV-Pol-spezifischen Proteinbanden treten weitere Proteinbanden auf, die wahrscheinlich auf eine unspezifische Antikörperbindung zurückzuführen sind.

3.3. Replikationszyklus des feline Foamyvirus

Schon in der Einleitung wurde auf die Eigenschaften der Foamyviren eingegangen, die sie von den Orthoretroviren und den Hepadnaviren abgrenzen. Diese Untersuchungen sind indes nur in Bezug auf PFV durchgeführt worden. Um zu klären, ob FFV die gleiche Replikationsstrategie wie PFV verfolgt, wurden Experimente zur Charakterisierung des Genoms durchgeführt, wie sie für PFV in den letzten Jahren publiziert worden sind.

3.3.1. Untersuchungen zum Einfluss von AZT auf die Infektiosität von FFV

Nachdem Yu und Mitarbeiter (1996) gezeigt haben, dass infektiöse PFV-Partikel doppelsträngige DNA enthalten, wurde angenommen, dass die reverse Transkription schon vor einer erneuten Infektionsrunde stattgefunden haben muss, eine Replikationsstrategie wie sie bei den Hepadnaviren zu finden ist. Da der reverse Transkriptase-Inhibitor Azidothymidin (AZT; 3-Azido-3'-desoxythymidin) eine inhibierende Wirkung auf die foamyvirale Replikation hat (Saïb *et al.*, 1997), konnte AZT eingesetzt werden, um den Zeitpunkt der reversen Transkription bei PFV zu bestimmen. Dabei fand man heraus, dass bei PFV die reverse Transkription nicht in der frühen Phase der Replikation stattfindet, wie es für die Orthoretroviren üblich ist, sondern der hepadnaviralen Strategie folgt und spät im Replikationszyklus nachzuweisen ist (Abb. 18; (Moebes *et al.*, 1997).

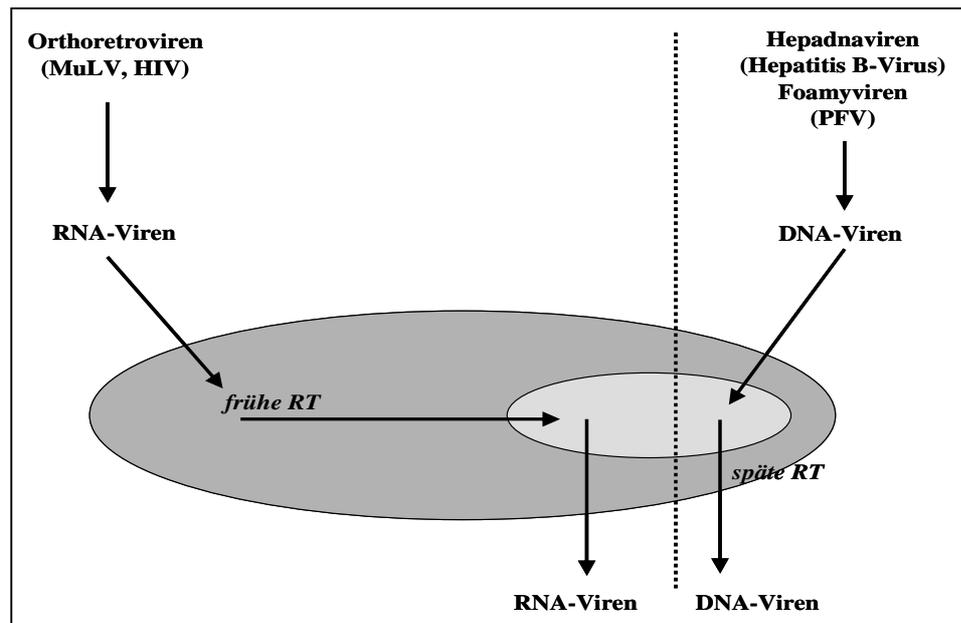


Abb. 18: Replikationsstrategien der Orthoretroviren, Hepadnaviren und Foamyviren.

Wie im Schema zu erkennen ist, findet bei den Orthoretroviren (z.B. HIV) die reverse Transkription nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle statt. Im Gegensatz dazu weisen die Hepadnaviren (z.B. HBV) sowie die Foamyviren eine RT-Aktivität im späten Stadium der Virusreplikation auf.

Bei AZT handelt es sich um ein Thymidinanalogon, das an der 3'-Position statt einer Desoxyribose eine Azidogruppe aufweist. Während des Umschreibens des einzelsträngigen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA bewirkt es einen Kettenabbruch, da keine 3'-OH-Gruppe zur Bildung der Phosphodiesterbindung zur Verfügung steht. Um den Einfluss von AZT auf die FFV-Virusreplikation zu testen, wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt, wie sie bei Moebes et al. (1997) beschrieben sind.

Nach der Transfektion von 293T-Zellen mit jeweils 20 µg Plasmid, wurde nach 24 Std. die Expressionsrate durch Zugabe von Natriumbutyrat stimuliert und die zellfreien Überstände nach weiteren 24 Std. geerntet. Um MuLV-Viruspartikel zu produzieren wurde ein drei-Plasmid-System verwendet, das mit pHIT60 als Expressionsplasmid für MuLVgag/pol zusammen mit VSV-G (pcVG-wt) als Hüllprotein und pcSFG-NLSlacZ als Reporter gen RNA-haltige Viren produziert (Tab. 9, Ansatz 1). Neben dem zu untersuchenden FFV-Partikeln (pWR7 pseudotypisiert mit PFV Env, Ansatz 4) wurden zusätzlich die infektiösen proviralen Klone pSFV-1 (Ansatz 2) und pcHSRV2 (Ansatz 3) eingesetzt, die entsprechend SFV-1 und PFV exprimieren. Als Indikatorzellen wurden HT1080-Zellen (für die Ansätze 4 und 5), BHK-21-Zellen (Ansatz 1), BHK/LTR(PFV)lacZ-Zellen (Ansatz 3) sowie BHK/LTR(SFV-1)lacZ-Zellen (Ansatz 2) verwendet. Sowohl die transfizierten als auch die infizierten Zellen wurden entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit von 5 µM AZT kultiviert. Davon ausgehend, dass es sich

beim funktionellen FFV-Genom um DNA handelt, sollte die Behandlung der Indikatorzellen mit AZT (24 Std. vor Infektion) keinen Einfluss auf die Virusproduktion haben. Das in Abb. 19 dargestellte Fliessschema (nach (Moebes *et al.*, 1997)) soll den Ablauf des Experiments beschreiben.

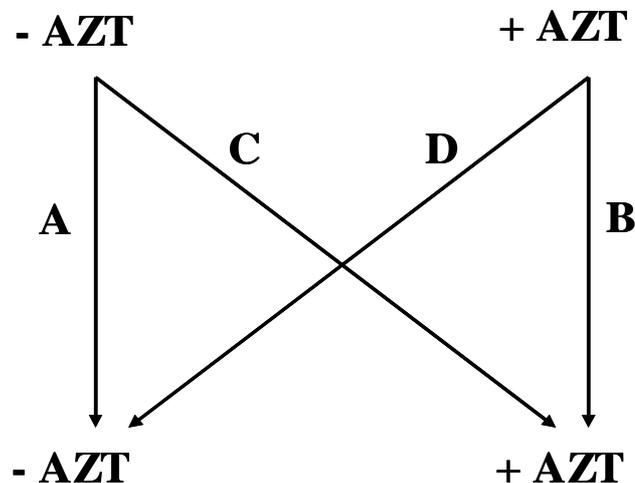


Abb. 19: Einfluss einer 5 μ M AZT-Behandlung auf die FFV-Replikation.

48 Std. nach Transfektion von 293T-Zellen wurden die Virusüberstände abgenommen und die entsprechenden Zielzellen infiziert (Experiment A). Virusproduzierende Zellen wurden in Gegenwart von 5 μ M AZT transfiziert und die Virusüberstände auf AZT-behandelte Indikatorzellen transferiert (Experiment B). Im Experiment C wurden nur die virusproduzierenden, im Experiment D nur die zu infizierenden Zellen in Gegenwart von AZT inkubiert.

In der Abb. 19 sowie in der Tab. 9 sind die Negativ- und Positivkontrollen als A und B bezeichnet. Produziert man Virus in Abwesenheit von AZT und infiziert entsprechende Zielzellen ebenfalls in Abwesenheit von AZT, so erhält man Virustiter mit Werten bis zu 10^6 infektiöse Partikel pro ml (A). Sind jedoch die virusproduzierenden Zellen sowie die transduzierenden Zellen mit AZT behandelt worden (B), konnte kaum eine effiziente Virusreplikation nachgewiesen werden. Die eingesetzte AZT-Konzentration von 5 μ M macht es also möglich, die Virusreplikation fast vollständig zu unterdrücken. Wurde die Virusproduktion in Abwesenheit von AZT und die Infektion in Anwesenheit von AZT analysiert (C), so findet man eine schwache Abnahme des Virustiters im Falle der getesteten Foamyviren. Im ersten Ansatz, bei dem es sich um das MuLV-Vektorsystem handelt, ist die Produktion jedoch unterdrückt. Im Gegensatz dazu führte die Virusproduktion in Anwesenheit von AZT und die Infektion in Abwesenheit von AZT (D) zu einer fast kompletten Inhibition der FV-Replikation, MuLV-Partikel weisen dagegen einen ähnlichen Titer wie in Kontrolle A auf. In einem weiteren Experiment sollten die FFV betreffenden Ergebnisse bestätigt werden. Dazu wurde der infektiöse molekulare FFV-Klon pChatul-3 wie im vorherigen Versuch in 293T-Zellen transfiziert und CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen als Indikatorzellen verwendet.

<i>PFU/ml</i>	A Ø/Ø	B +/+	C Ø/+	D +/ Ø
1. pHIT60/pcVG-WT/ pcSFG-NLS <i>lacZ</i>	1,32±0,3 x 10 ⁶	0	0/ml	1,84±1 x 10 ⁵
2. pSFV-1	1,19±0,2 x 10 ⁶	0	4,11±0,8 x 10 ⁵	0,89±1
3. pCHSRV2	9,25±6 x 10 ⁵	0	3,01±3 x 10 ⁵	0
4. pWR7/pCenv-1	4,2±3 x 10 ³	1±1	2,31±0,4 x 10 ³	1±1
5. pWR7/pcDNA3.1	0	0	0	0

Tab. 9: Untersuchung des Einflusses von AZT auf die Replikation von Foamyviren.

Für die Transfektion von 293T-Zellen wurden 20 µg Gesamt-DNA eingesetzt. 48 Std. später wurden entsprechende Indikatorzellen mit den zellfreien Überständen titriert. Wie im Schema Abb. 18 beschrieben, erfolgte die Behandlung der Zellen mit je 5 µM AZT. Als Kontrollen wurden die virusproduzierenden Zellen und die infizierten Zellen ohne AZT (A: Ø/Ø) und die virusproduzierenden Zellen und die infizierten Zellen mit AZT (B: +/+) kultiviert. Im Ansatz C wurden nur die zu infizierenden Zellen mit AZT behandelt, im Falle von Ansatz D nur die virusproduzierenden, d.h. die 293T-Zellen.

Da in Vorversuchen pChatul-3 in Gegenwart von 5 µM AZT noch eine sehr effiziente Virusreplikation gezeigt hat, erfolgte die Transfektion und Infektion in diesem Fall in An- bzw. Abwesenheit von 50 µM AZT. Hier ist zu vermuten, dass FFV eine höhere natürliche Resistenz gegen AZT aufweist als seine Verwandten PFV und SFV-1. Die in Abb. 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die transiente Transfektion von pChatul-3 in einem Virustiter von über 1 x 10⁵ resultiert (A). In der Negativkontrolle (B), d.h. eine AZT-Behandlung während der Transfektion und Infektion, waren nur ca. 10 Viren pro ml nachweisbar. Auch in diesem Versuch konnte eine effiziente Virusproduktion bei AZT-Behandlung der zu infizierenden Zelle nachgewiesen werden (C). Wurden jedoch die virusproduzierenden Zellen unter AZT-Behandlung gesetzt, so konnte nur eine sehr geringe Infektionseffizienz gezeigt werden (D).

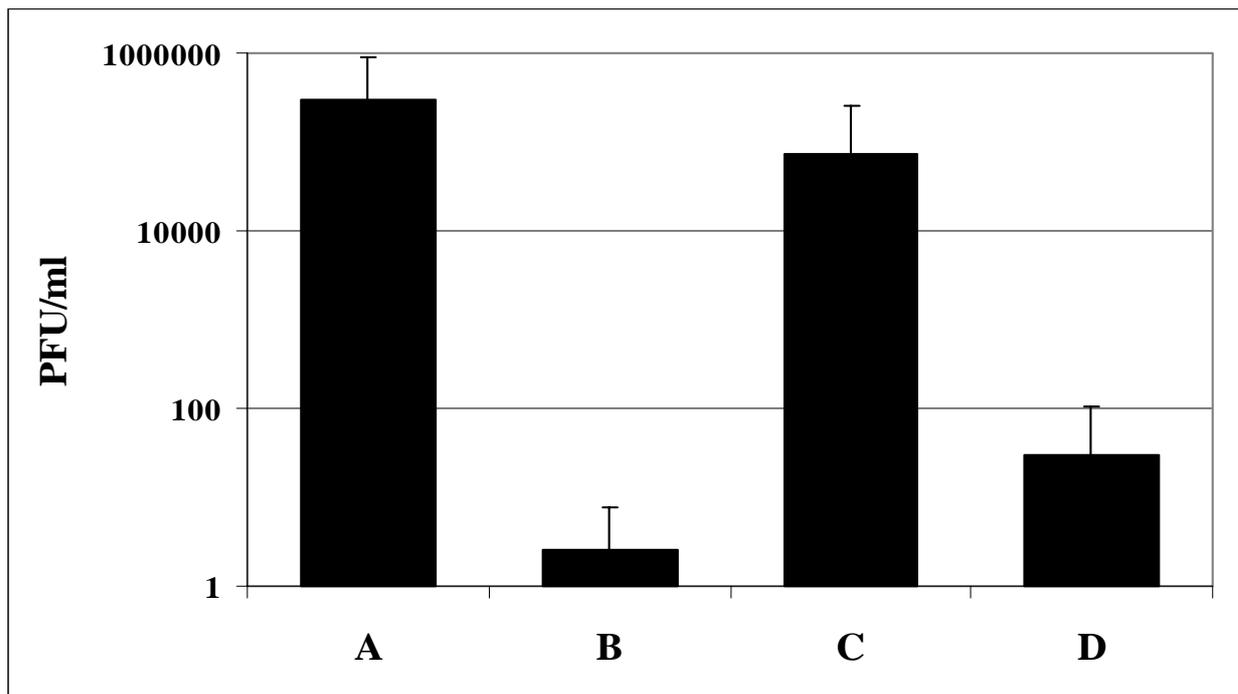


Abb. 20: Einfluss von AZT auf die pChatul-3-Replikation.

Dargestellt sind die Infektionseffizienzen von pChatul-3 transfizierten 293T-Zellen und 48 Std. später infizierten CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen in An- und Abwesenheit von 50 µM AZT. Analysiert wurden die Zellen 72 Std. nach Infektion. Die Positiv-(Ø/Ø) und Negativkontrolle (+/+) sind als Balken A und B demonstriert. Im Falle einer 50 µM AZT-Behandlung der Indikatorzellen war nur eine geringe Titerabnahme nachweisbar (Experiment C); im Ansatz D, in dem nur die virusproduzierenden Zellen 50 µM AZT ausgesetzt waren, konnte dagegen kaum Virus nachgewiesen werden.

Auch in diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass die reverse Transkription von FFV bereits stattgefunden haben muss, bevor die Viruspartikel die Wirtszelle verlassen d.h. der schon oben angedeuteten hepadnaviralen Replikationsstrategie folgen.

3.3.2. Analyse der intrazellulären Retrotransposition bei FFV

Es ist bekannt dass der Prototyp der Foamyviren in der Lage ist, zwei unterschiedliche Wege in der Replikationsstrategie zu beschreiten. Einerseits sind die Partikel befähigt, die Zelle als infektiöses, exogenes Virus zu verlassen. Alternativ kann sich die umgeschriebene DNA jedoch auch wie ein mobiles, genetisches Element verhalten, in den Zellkern zurückwandern und in das Genom der Wirtszelle integrieren (Heinkelein *et al.*, 2000).

Da es in diesem Kapitel um die Replikationsstrategie von FFV geht, soll diese Besonderheit hier untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pWR6 eingesetzt, das aufgrund des Fehlens des essentiellen *env*-Gens replikationsdefekt ist. Die Expression des Vektorgenoms erfolgt durch den CMV-Promotor, die Expression des Markergens EGFP vom konstitutiv

aktiven Promotor des Spleen Focus Forming Virus (SFFV). Als Positivkontrolle wurde ein PFV *gag-pol*-Expressionskonstrukt (pMH92) verwendet, mit dem die intrazelluläre Retrotransposition für PFV gezeigt worden konnte (Heinkelein *et al.*, 2000). Als Negativkontrolle wurde neben dem pcDNA3.1-Plasmid ein PFV *gag-pol*-Expressionskonstrukt verwendet, bei dem das aktive Zentrum der Integrase mutiert wurde (Enssle *et al.*, 1999). Zur transienten Transfektion wurden 293-, CrFK- und HeLa-Zellen verwendet und die EGFP-Expression wurde in einem Zeitraum von 21 Tagen mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt. Während pWR6-transfizierte Zellen sich nach 14 Tagen als EGFP-negativ erwiesen, blieben die pMH92-transfizierten Zellen mit nahezu 10 % über den Zeitraum von 21 Tagen positiv (Abb. 21).

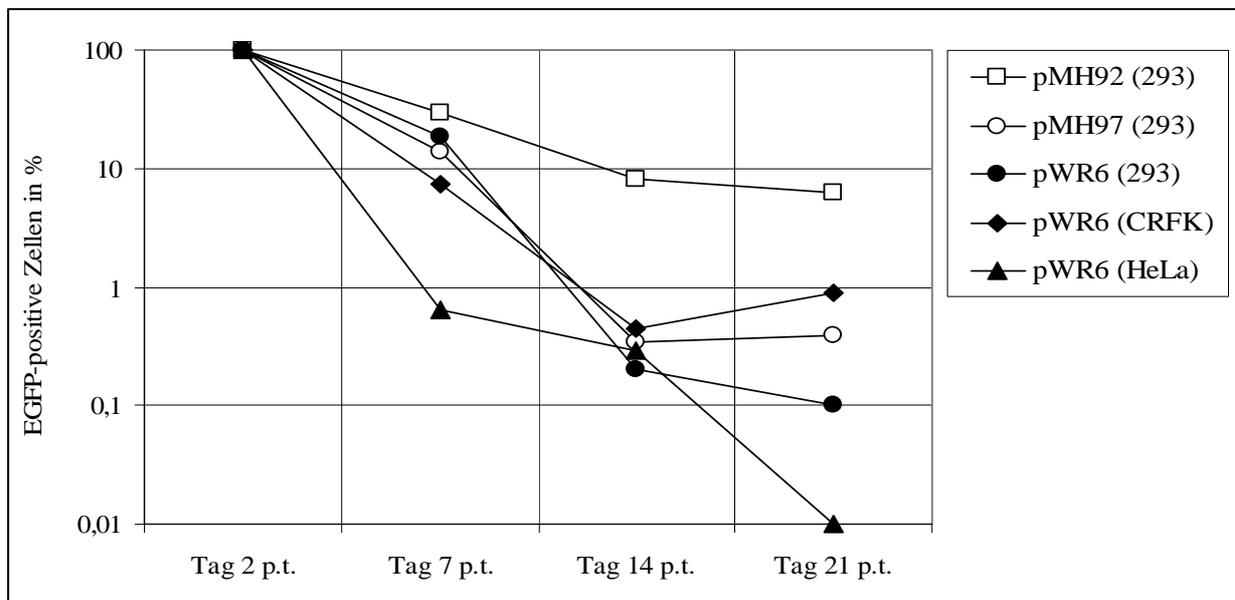


Abb. 21: Analyse der intrazellulären Retrotransposition bei FFV.

Mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode wurden verschiedene Zelllinien transient mit einem PFV *gag-pol*- (pMH92) und FFV *gag-pol*-Konstrukt (pWR6) transfiziert. Die EGFP-Expression wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durch FACS-Messung bestimmt. Werte unter 1% gelten als negativ.

Die Negativkontrolle pMH97 verhielt sich wie pWR6 und in den Zellen waren nach 14 Tagen keine EGFP-Expression mehr nachzuweisbar. Dieses Ergebnis zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen PFV und FFV und während die PFV-Vektorgene in das Wirtszellgenom integrieren können, ist FFV nicht dazu in der Lage.

3.3.3. Quantifizierung von RNA und DNA aus extrazellulären FFV-Partikeln

Mit Hilfe der so genannten quantitativen kompetitiven und RT-PCR und PCR ist es möglich, die Mengen von verschiedenen Nukleinsäurespezies zu vergleichen. Die quantitative kompetitive

PCR und RT-PCR basiert auf den relativen Mengen von PCR-Produkten, die von einer Zielsequenz und von einer Vergleichssequenz amplifiziert werden. Bei der Zielsequenz handelt es sich um die zu bestimmende FFV-DNA bzw. -RNA, als Kompetitoren wurden entsprechende DNA- und RNA-Standards hergestellt. Diese Kompetitoren sind identisch zu der viralen Sequenz bis auf eine schmale Region zwischen den Bindungsstellen für die PCR-Primer (Abb. 22). Diese Region wurde deletiert, um die Unterscheidung der PCR-Produkte zu ermöglichen. Das bedeutet, dass das Kompetitor-PCR-Produkt kleiner ist, als das PCR-Produkt der FFV-DNA.

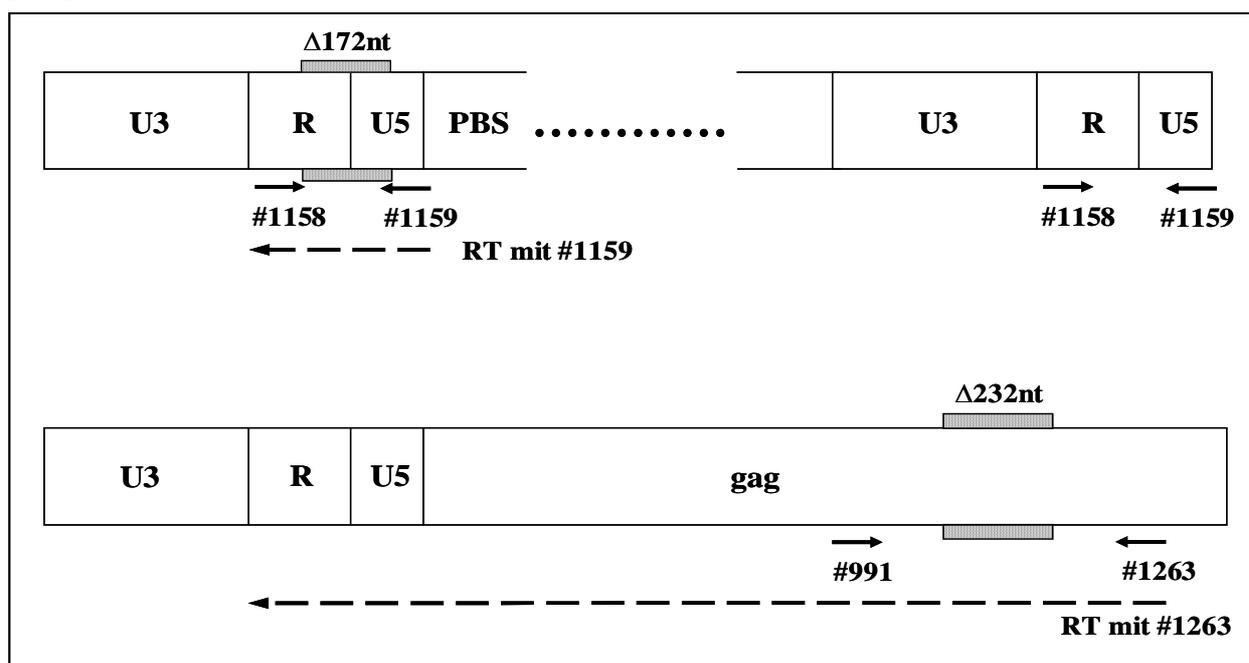


Abb. 22: Verwendete Primerpaare in der quantitativen kompetitiven PCR und RT-PCR.

Bindungsstellen der Primer, die für die separat durchgeführten quantitativen kompetitiven PCR- und RT-PCR-Analysen verwendet wurden. Im oberen Teil ist die Hybridisierung der LTR-Primer #1158 und #1159 schematisch dargestellt, die sowohl an die 5'-LTR-Region binden können als auch an die 3'-LTR-Region. Sie amplifizieren von isolierter FFV-DNA ein Fragment von 269 Bp. Dieses Primerpaar hybridisiert demzufolge zweimal an die 2 LTR-enthaltende DNA, jedoch nur einmal an die RNA (5'-LTR). Im unteren Teil der Abbildung sind die Hybridisierungsorte der gag-Primer dargestellt, die ein 963 Bp grosses Fragment amplifizieren. Schattiert dargestellt sind die Deletionen, die in den Kompetitoren enthalten sind (ΔLTR und Δgag). Als gestrichelte Linien sind die resultierenden RNAs gezeichnet, die mit Hilfe der Primer #1159 bzw. #1263 revers transkribiert wurden.

Sind die Mengen an DNA- bzw. RNA-Kompetitor und die Mengen der zu testenden Nukleinsäure gleich, so sind diese Mengen äquivalent zueinander. Für die hier beschriebene Quantifizierung wurden zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt (Abb. 22). Das erste Primerpaar #1158 und #1159 amplifiziert Sequenzen zwischen den R/U5-Regionen der viralen LTRs. Ferner ist zu erwarten, dass dieses Primerpaar zweimal an die virale DNA bindet, an den 5'-LTR- und an den 3'-LTR-Bereich. Da in der viralen RNA die U5-Region am 3'-Ende fehlt, kann in dem Fall das Primerpaar nur einmal binden. Das zweite Primerpaar (#991/#1263)

hybridisiert nur einmal am 3'-Ende des *gag*-Gens. Ebenfalls sind in der Abbildung die Deletionen dargestellt, die für die Kompetitoren präpariert wurden. Die Deletion in der 5'-LTR umfasst 172 Nukleotide, die Deletion im 3'-Bereich des *gag*-Gens umfasst 232 Nukleotide. Beide wurden mit Hilfe einer überlappenden PCR und Umklonierung in den pCRII-TOPO-Vektor hergestellt. Dieser Vektor verfügt am 5'-Ende der inserierten Fragmente über einen SP6-Promotor, der die *in vitro*-Transkription der RNA-Kompetitoren gestattet.

Für die Isolation der Nukleinsäuren wurde zunächst ein hochinfektiöser FFV-Überstand hergestellt und sterilfiltriert (0,45 µm). Die Überstände wurden in der Ultrazentrifuge (28000 rpm, 2 Std., 4°C) aufkonzentriert und die Viruspellets in 1 ml sterilem PBS aufgenommen. Die Proben wurden über Nacht bei 37°C mit RQ1 RNase-freier DNase (1 Unit/50 µl Probenvolumen; Promega) verdaut. Die Virusproben wurden durch ein 20 % Saccharosekissen ultrazentrifugiert (30000 rpm, 2 Std., 4°C) und die Pellets in 200 µl PBS resuspendiert. Die Isolation der DNA bzw. RNA erfolgte mit Hilfe des QIAamp[®] DNA Blood Mini-Kit und des QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Nach der Behandlung der DNA mit Rase A (0,2 mg/ml) und der RNA mit RQ1 DNase (1U/50 µl) für eine Stunde bei 37°C wurden die Nukleinsäuren in 1/1000 des Originalvolumens aufgenommen.

Die *in vitro* transkribierte RNA (MAXIscript[™] *in vitro* Transcription Kit, Ambion) wurde auf eine Menge von 100 ng/µl eingestellt und für folgende RT-PCR-Versuche verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz der PCR setzte sich zusammen aus je 0,4 µl der flankierenden Primer (20 pmol), 2 µl 10 mM dNTPs, 2 µl 10x-PCR-Puffer, 4 mM MgCl₂ und 2,5 U Taq DNA-Polymerase (Promega). Der Ansatz wurde mit A. bidest auf 18 µl Probenvolumen aufgefüllt. Zu jeder Probe wurde 1 µl FFV-DNA dazu pipettiert sowie entsprechend der Angabe in den Darstellungen 1 µl der verdünnten Kompetitor-DNA. Als Kontrollen wurde entweder nur Kompetitor, nur FFV-DNA oder nur A. bidest verwendet. In der Abb. 23 sind die Ergebnisse als Beispiel für die Kompetition im Falle der isolierten FFV-DNA dargestellt. Der linke Teil stellt die Kompetition mit dem LTR-Kompetitor (Δ LTR) dar, der rechte Teil die Kompetition mit dem *gag*-Kompetitor (Δ *gag*). Im Falle der LTR-PCR ist eine 50%ige Kompetition bei einer Menge von ca. 50 pg Kompetitor auszumachen. Da die LTR-Primer #1158 und #1159 jedoch zweimal an die 2 LTR enthaltende DNA binden, wird die zu bestimmende DNA in doppelter Menge nachgewiesen.

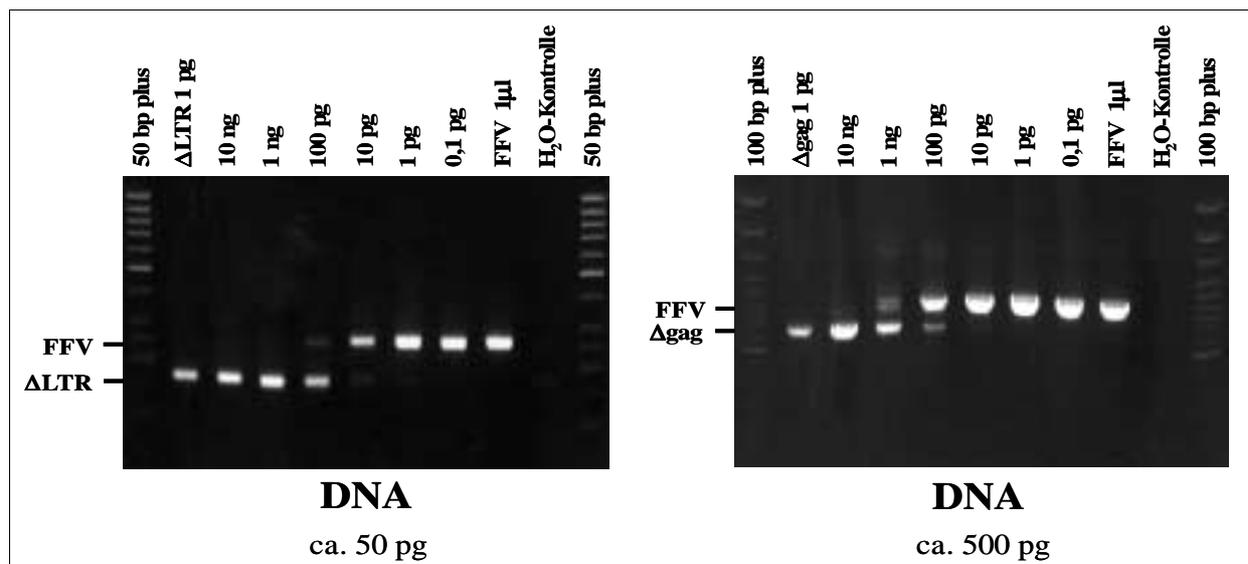


Abb. 23: Quantitative kompetitive PCR-Analyse von extrazellulärer FFV DNA.

Dargestellt sind die PCR-Resultate aus der LTR-PCR (rechts; Primer #1158/#1159) und der gag-PCR (links; Primer #991/#1263). Von Nukleinsäure sowie Kompetitor wurde jeweils 1 μ l eingesetzt. Die obere nachgewiesene Bande entspricht der FFV-DNA, die untere der Kompetitor-DNA. In der Spur 2 ist jeweils nur die Kompetitor-Kontrolle aufgetragen, in der Spur 9 nur FFV-DNA als Kontrolle. Als Negativ-Kontrollen wurde statt DNA H_2O verwendet.

So beträgt die theoretische Menge statt 50 pg nur ca. 25 pg. In der Gag-PCR tritt die Kompetition bei ca. 500 pg Kompetitor auf, d.h. die theoretische DNA-Menge beträgt ca. 500 pg. Um die Statistik der Experimente zu sichern, wurde die LTR-PCR achtmal durchgeführt, die gag-PCR viermal.

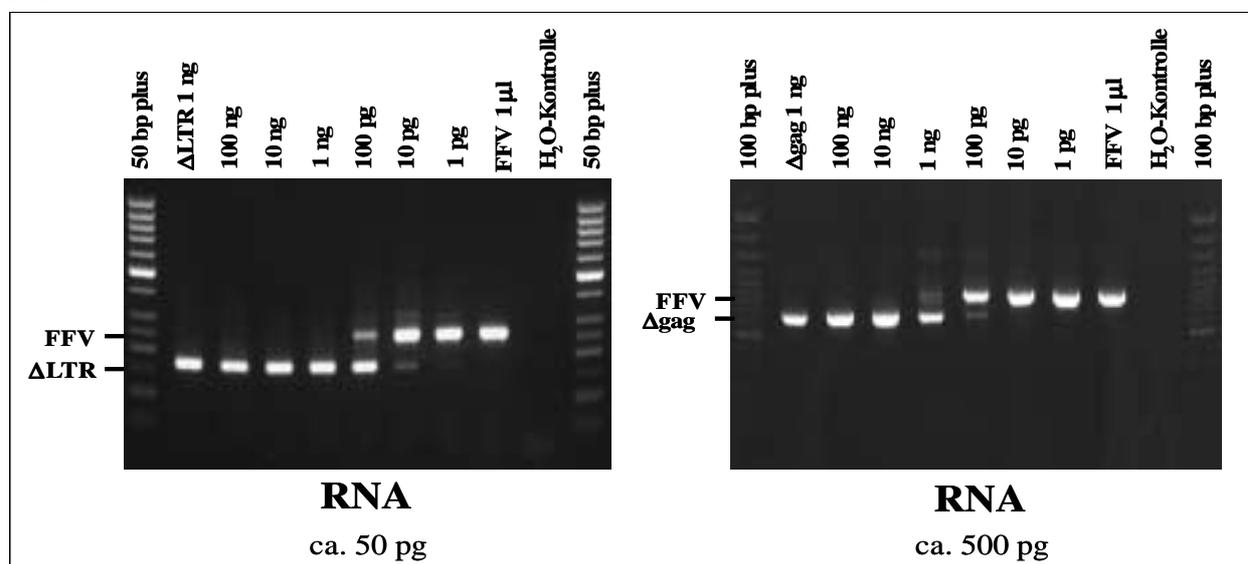


Abb. 24: Quantitative kompetitive RT-PCR von RNA aus extrazellulären FFV-Partikeln.

Dargestellt sind die RT-PCR-Resultate aus der LTR-RT-PCR (rechts; Primer #1158/#1159) und der gag-RT-PCR (links; Primer #991/#992). Von RNA sowie Kompetitor wurden jeweils 1 μ l eingesetzt. Die obere nachgewiesene Bande entspricht der FFV-DNA, die untere der Kompetitor-DNA. In der Spur 2 ist jeweils nur die Kompetitor-Kontrolle aufgetragen, in der Spur 9 nur FFV-RNA als Kontrolle. Als Negativ-Kontrollen wurde statt RNA H_2O verwendet.

Die isolierten FFV-RNAs wurden mit Hilfe des QIAGEN[®] OneStep RT-PCR Kit nachgewiesen. Bei den als Kompetitoren eingesetzten RNA-Proben handelt es sich um die auch oben beschriebenen Kompetitor-DNAs, die durch *in vitro* Transkription in RNA umgeschrieben und auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt wurden. Wie in Abb. 24 demonstriert, ergab sich im Falle der LTR-RT-PCR eine 50 % Competition der RNA bei ca. 50 pg eingesetzter ΔLTR-RNA (links). Nach der Umschreiben und Amplifikation der Gag-RNA wurde eine 50 % Competition bei Zugabe von ca. 500 pg Δgag-RNA nachgewiesen (rechts). Alle Resultate für die PCR- und RT-PCR-Analysen sind in der Tab. 10 zusammengefasst. Da die LTR-Primer zweimal an die nachzuweisende DNA binden, wurde die bestimmte DNA-Menge durch zwei geteilt. Aus acht verschiedenen Experimenten ergab sich daraus ein relatives DNA:RNA-Verhältnis von 1:1,1 mit einem Schwankungsbereich von 5:1 bis 1:4.

LTR	DNA	RNA	DNA:RNA
#1	5 pg	1 pg	5:1
#2	2,5 pg	1 pg	2,5:1
#3	0,05 pg	0,1 pg	1:2
#4	500 pg	500 pg	1:1
#5	500 pg	1000 pg	1:2
#6	250 pg	1000 pg	1:4
#7	2500 pg	5000 pg	1:2
#8	2500 pg	5000 pg	1:2
Gag	DNA	RNA	DNA:RNA
#9	100 pg	500 pg	1:5
#10	500 pg	500 pg	1:1
#11	500 pg	500 pg	1:1
#12	500 pg	1000 pg	1:2

Tab. 10: Zusammenfassung der quantitativen kompetitiven PCR und RT-PCR.

In Spalte 1 ist die Anzahl der Versuche angegeben, in den Spalten 2 und 3 die Menge der nachgewiesenen Nukleinsäure in pg und Spalte 4 das Verhältnis von DNA zu RNA zueinander.

In vier verschiedenen Experimenten wurde für die gag-Region ein durchschnittliches DNA:RNA-Verhältnis von 1:2,3 (mit einem Schwankungsbereich von 1:1 bis 1:5) bestimmt. Aufgrund dieser Schwankungen wurde eine weitere Methode, DNA-Mengen aus extrazellulären Partikeln quantitativ zu bestimmen, verwendet. Im Folgenden soll diese Bestimmung anhand der *Real-Time* PCR dargelegt werden.

3.3.4. Quantifizierung der Nucleinsäuren mit Hilfe der *Real-Time-PCR*

In diesen Experimenten sollte neben den Nucleinsäuren aus FFV-Partikeln auch die Nucleinsäure aus einem RNA-Virus als Kontrolle untersucht werden. Dazu wurde das Friend Murine Leukemia Virus (FrMuLV) verwendet, ein Mitglied der Gammaretroviren. Um eine genaue Quantifizierung der Nucleinsäurekopien zu ermöglichen, wurden DNA- und RNA-Standards hergestellt. Für den Nachweis der DNA aus FFV- und FrMuLV-Überständen wurden entsprechende PCR-Fragmente mit einer Größe von ca. 550 Bp in den pCRII-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert (Abb. 25).

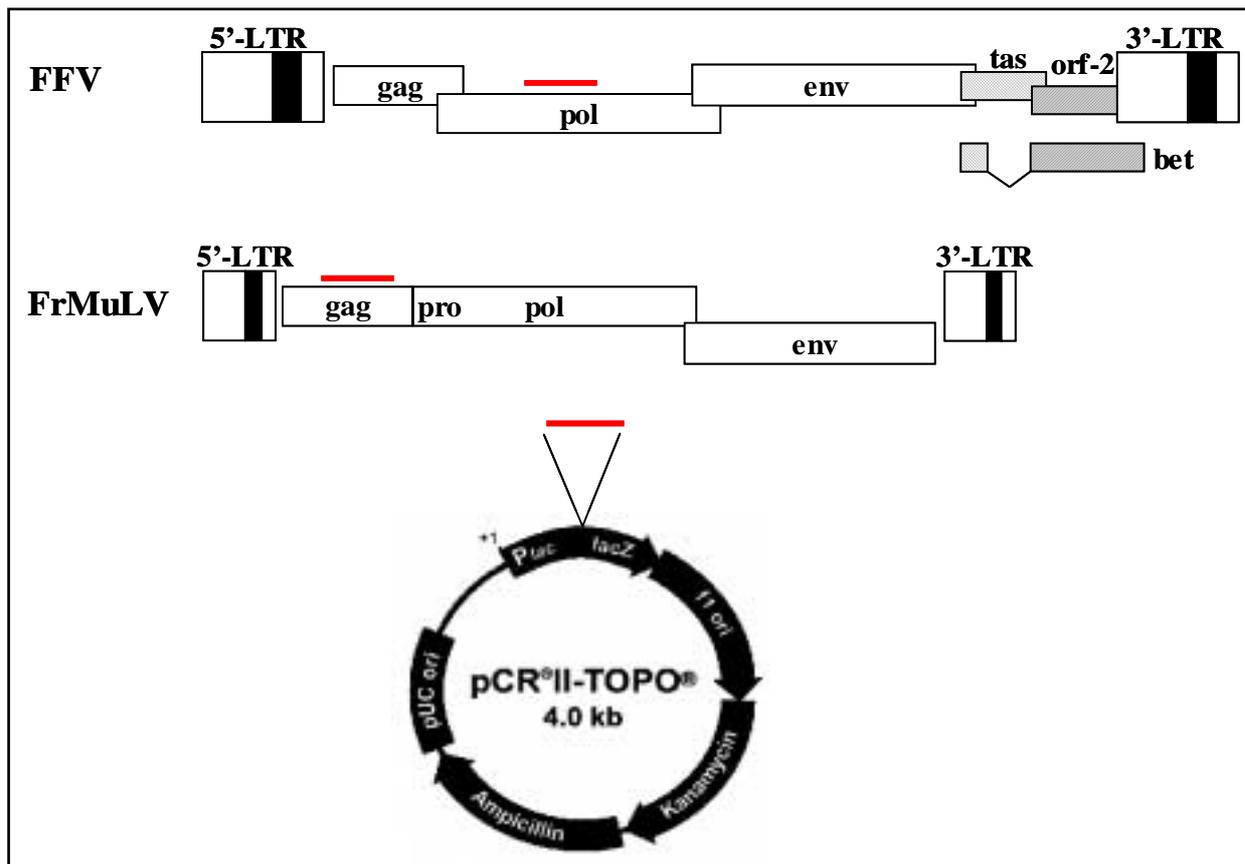


Abb. 25: Klonierung der verwendeten Standards für die Real-Time PCR.

Das klonierte FFV-Fragment stammt aus dem FFV *pol*-Gen, beim FrMuLV-Standard handelt es sich um ein *gag*-abgeleitetes Fragment. Im unteren Teil der Abbildung ist der pCRII-TOPO-Vektor dargestellt, in den die Fragmente inseriert worden sind.

Dazu wurden zunächst mit Hilfe einer konventionellen PCR die zwei Fragmente 546 Bp (aus pChatul-3) und 533 Bp (aus genomischer DNA von FrMuLV-infizierten *Mus Dumni*-Zellen) amplifiziert. Diese Fragmente wurden jeweils in den pCRII-TOPO-Vektor am 3'-Ende des SP6-Promotors inseriert. Nach erfolgreicher Klonierung und DNA-Präparation wurden von diesen eine Verdünnungsreihe angesetzt und 5 µl vom jeweiligen Standard für die PCR-Reaktion

eingesetzt. In der Abb. 25 sind die jeweiligen Positionen des PCR-Produktes im Virusgenom dargestellt.

Für die Analyse der DNA aus extrazellulären Partikeln wurden 10,5 ml zellfreier Überstand durch ein 20 % Saccharose-Kissen zentrifugiert (30000 rpm, 2 Std., 4°C) und die DNA aus dem Viruspellet isoliert (QIAamp® Blood Mini Kit; Qiagen). Die Rase A-verdaute DNA wurde in 10,5 µl A. bidest aufgenommen, d.h. 1 µl getestete DNA entsprach 1 ml Überstand. Wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben wurde die *Real-Time* PCR-Reaktion (für FFV Primer #1164 und #1202; für FrMuLV #1367 und #1368) durchgeführt. Für den Nachweis der RNA wurden die pCRII-TOPO-Vektoren zunächst *in vitro* transkribiert (MAXIscript™ *in vitro* Transcription Kit, Ambion), die RNA-Standards auf 0,1 µg/µl eingestellt und anschliessend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Mit Hilfe der SuperScript II RNase H⁻ reversen Transkriptase, (Invitrogen) wurde jeweils 5 µl RNA aus extrazellulären Partikeln (isoliert mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit, Qiagen) bzw. 5 µl verdünnter RNA-Standard in DNA umgeschrieben. Für die anschliessende *Real-Time* PCR wurden 2 µl (1/10 Volumen) der Reaktion eingesetzt. Im Gegensatz zur üblichen *Real-Time* PCR wurde die MgCl₂-Konzentration auf 3 mM Endkonzentration gesenkt, die Konzentration betrug je Primer betrug 2,5 mM.

Um die Anzahl der nachgewiesenen Nukleinsäurekopien mit der Anzahl der infektiösen Partikel vergleichen zu können, wurde der FFV-Überstand auf CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen titriert, die Zellen nach 48 Std. mit X-Gal gefärbt und die Anzahl der infektiösen Partikel pro ml bestimmt. Für die Bestimmung der infektiösen FrMuLV-Partikel wurde der Überstand auf Mus Dunni-Zellen titriert und die infizierten Zellen mit Hilfe des FrMuLV-Assay gefärbt (Dittmer *et al.*, 1998). Die Ergebnisse für den Nukleinsäurenachweis sowie die Infektiosität sind in Abb. 26 dargestellt.

Für FFV wurde das DNA zu RNA-Verhältnis aus fünf verschiedenen Experimenten ermittelt. Es betrug im Mittel 1:5,6 mit einem Schwankungsbereich von 1:1 bis 1:17. Für FrMuLV betrug das DNA:RNA-Verhältnis aus sechs verschiedenen Experimenten $1:4,1 \times 10^5$ mit einem Schwankungsbereich von $1:2,2 \times 10^5$ bis $1:1,8 \times 10^6$. Der durchschnittliche Titer aus drei verschiedenen FrMuLV-Titrations ergab einen Wert von $1,3 \times 10^4$ /ml. Dagegen betrug die durchschnittliche Anzahl der DNA-Kopien aus diesen Proben nur $2,6 \times 10^3$ pro ml.

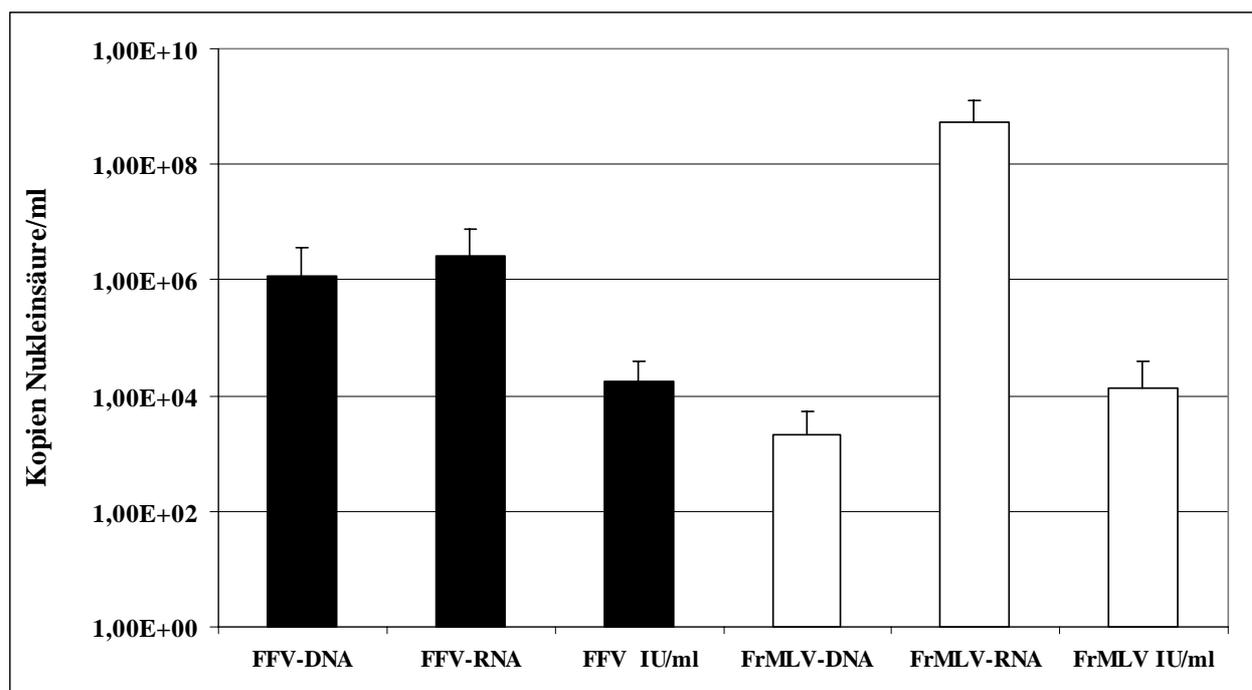


Abb. 26: Quantifizierung der Nukleinsäuren aus FFV- und FrMuLV-Partikeln.

Die Anzahl der DNA- und RNA-Kopien pro ml sind der Anzahl der infektiösen FFV- bzw. FrMuLV-Partikel pro ml gegenübergestellt.

Diese Ergebnisse unterstreichen die bedeutende Rolle der genomischen RNA für die FrMuLV-Replikation. Im Falle von FFV ist die durchschnittliche Anzahl der DNA-Kopien mit $6,1 \times 10^5/\text{ml}$ grösser als die durchschnittliche Anzahl der infektiösen Einheiten mit $1,7 \times 10^4/\text{ml}$. Da jedoch die Anzahl der RNA-Kopien die Anzahl der DNA-Kopien pro ml übersteigt, lassen sich allein dadurch noch keine Schlussfolgerungen aus dem Vergleich DNA:RNA in Bezug auf die Replikationsstrategie ziehen.

3.3.5. Charakterisierung der Nukleinsäuren in extrazellulären FFV-Partikeln

Im Gegensatz zu den Orthoretroviren besitzt PFV hauptsächlich DNA als durch Blottingverfahren physikalisch detektierbares Viriongenom (Yu *et al.*, 1996a). Analog zu diesen beschriebenen PFV-Experimenten wurde zunächst ein hochinfektiöser FFV-Überstand hergestellt, der nach Sterilfiltration (Passage durch $0,45 \mu\text{m}$ -Filter) in der Ultrazentrifuge (28000 rpm, 2 Std., 4°C) aufkonzentriert wurde. Um noch eventuell vorhandene Bestandteile von zellulärer DNA im gewonnenen Viruspellet zu beseitigen, wurde dieses in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und über Nacht bei 37°C mit RQ1 RNase-freier DNase (1 Unit/50 μl Probenvolumen; Promega) verdaut. Die Fraktionierung der Viruspartikel erfolgte über einen 20

bis 66%-Saccharosegradienten (30000 rpm, 2 Std., 4°C). Für alle Versuche wurden jeweils 18 Fraktionen mit je 400 µl Probenvolumen gesammelt und weiter untersucht. Mit Hilfe eines Refraktometers wurde die Dichte jeder Fraktion gemessen durch deren Bestimmung mögliche Verschiebungen im Gradienten gezeigt werden können. Im Falle des hier untersuchten Gradienten ist die Dichte in g/ml in Abb. 27 dargestellt.

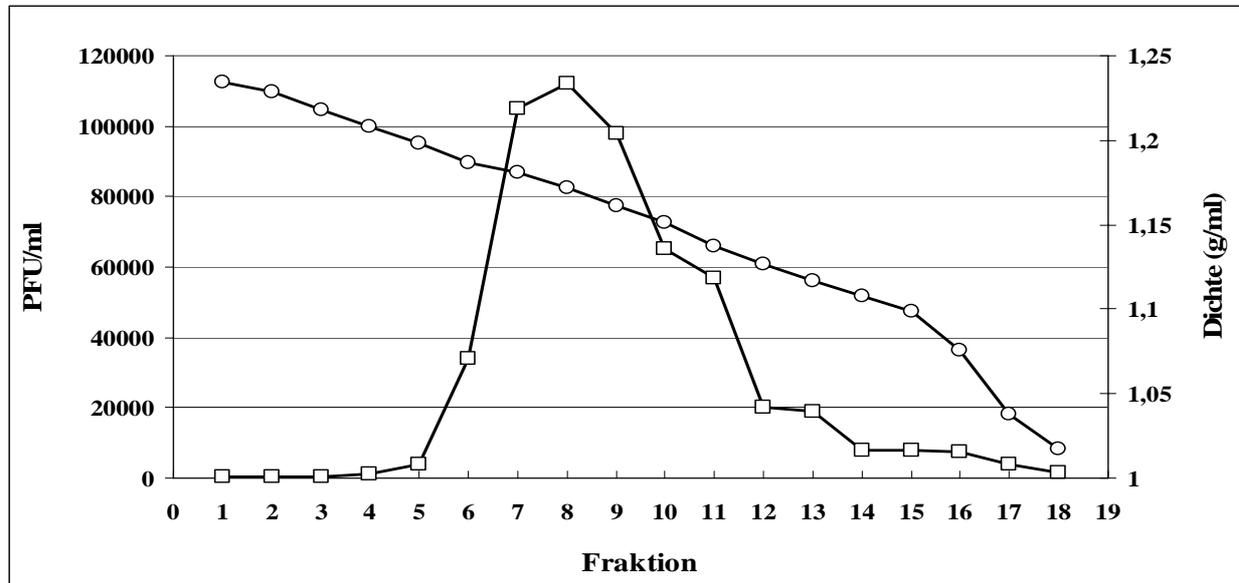


Abb. 27: Aufbau eines Saccharosegradienten.

Die Dichte des Gradienten ist im Diagramm in g/ml dargestellt (Kreise). Achtzehn Proben dieses Gradienten wurden auf ihre Infektiosität untersucht. Dazu wurden 10 µl Probe mit 990 µl DMEM versetzt und 48 Std. auf CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen inkubiert. Durch X-Gal-Färbung wurden die infizierten Zellen gefärbt und die positiven Cluster ausgezählt. Die Anzahl der gezählten infektiösen Einheiten (pro ml) sind ebenfalls im Diagramm dargestellt (Rechtecken).

Die Anzahl der Viruspartikel wurden durch Infektion von CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen mit 10 µl Probe (verdünnt in 990 µl DMEM) bestimmt, die mit den Proben 48 Std. inkubiert wurden. Nach erfolgter X-Gal-Färbung wurde die Anzahl der blauen Zellen pro Fraktion ausgezählt und auf 1 ml hochgerechnet. Wie in der Abb. 27 dargestellt, beginnt die Anzahl der infektiösen Partikel mit 200/ml (bei 1,234 g/ml) und steigt zwischen den Fraktionen 6 bis 10 bis auf $1,2 \times 10^5$ Partikel an, was einer Dichte von 1,181 g/ml (in Fraktion 8) entspricht. In der letzten Fraktion (1,017 g/ml) finden sich noch 1450 Partikel/ml.

Nachdem die Dichte und Infektiosität bestimmt worden sind, wurde von jeder Fraktion 20 µl mit 20 µl Proteinprobenpuffer versetzt und die Proben im Western Blot mit einem αFFV Gag-Antiserum getestet. Die Verteilung der Viruspartikel über den Gradienten kann so mit Hilfe der nachgewiesenen Gag-Proteine dargestellt werden. Wie auch in dem oben demonstriertem Diagramm, findet man einen Peak der FFV-Gag-Proteine im Zentrum des Gradienten (Abb. 28).

Aus 175 μl wurde mit Hilfe des QIAamp[®] Blood Mini Kit die virale DNA isoliert, die für die folgende Southern Blot-Analyse verwendet. Ziel des Experiments war es, das Vorhandensein von DNA in Viruspartikeln zu beweisen und dessen Grösse zu bestimmen.

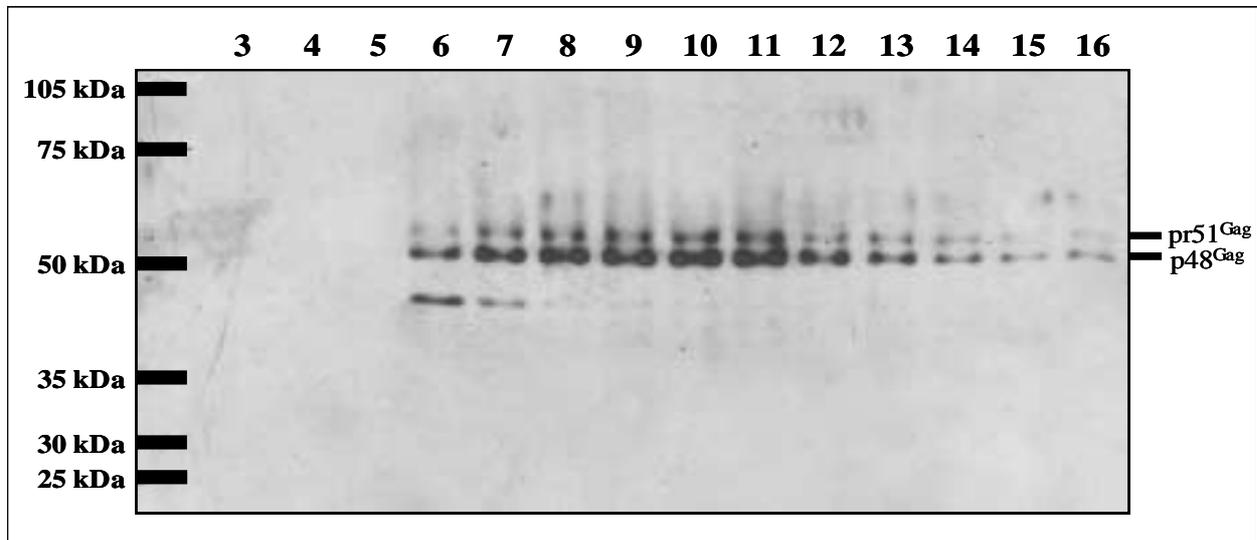


Abb. 28: Nachweis von FFV-Gag-Protein durch Western-Blot-Analyse.

Je 20 μl Probenvolumen wurden von jeder Fraktion abgenommen und mit 20 μl Proteinprobenpuffer gemischt. Nach dem Blotten wurden die Proteine mit einem $\alpha\text{FFV Gag}$ -Antiserum (polyklonales Kaninchenserum gegen FFV Gag) nachgewiesen, gegen den ein 2. $\alpha\text{Rabbit-Peroxidase}$ -Antikörper gerichtet war. Die Verteilung der typischen Gag-Doppelbanden ist konzentriert auf die Fraktionen 8 bis 11, weniger Proteine und Spaltprodukte sind in den übrigen Fraktionen zu erkennen.

Die isolierte virale DNA wurde mit einer an den 3'-Bereich des FFV *pol*-Gens hybridisierenden [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]-dATP-Sonde mit einer Grösse von 1,5 kb nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, volle-Länge DNA mit ca. 12 kb aus extrazellulären Viruspartikeln nachzuweisen. In Abb. 29 ist die Verteilung der viralen DNA über die Fraktionen 6 bis 11 präsentiert. Das in den Fraktionen 8 bis 11 nachgewiesene Maximum an Virusgenomen bestätigt die zuvor gezeigten Western Blot-Daten, in denen die grösste Menge an FFV-Partikeln ebenfalls in den Fraktionen 8 bis 11 gefunden wurde. Beide Ergebnisse weichen vom Infektionsexperiment, in dem das Maximum in den Fraktionen 7, 8 und 9 liegt, etwas ab. Bei den DNA-Banden kleinerer Grösse, die ebenfalls in der Abb. 29 zu erkennen sind, mag es sich um Abbauprodukte der viralen volle-Länge DNA handeln, die durch die Präparationsmethoden entstanden sind. Da für PFV ein zentraler Polypurintrakt im Virusgenom beschrieben worden ist (Kupiec *et al.*, 1988, Tobaly-Tapiero *et al.*, 1991), gibt es vermutlich diesen zentralen PPT auch in FFV. In der einzelsträngigen DNA könnte leicht zu Strangbrüchen kommen, die zum Auftreten dieser kürzeren Fragmente führen würden.

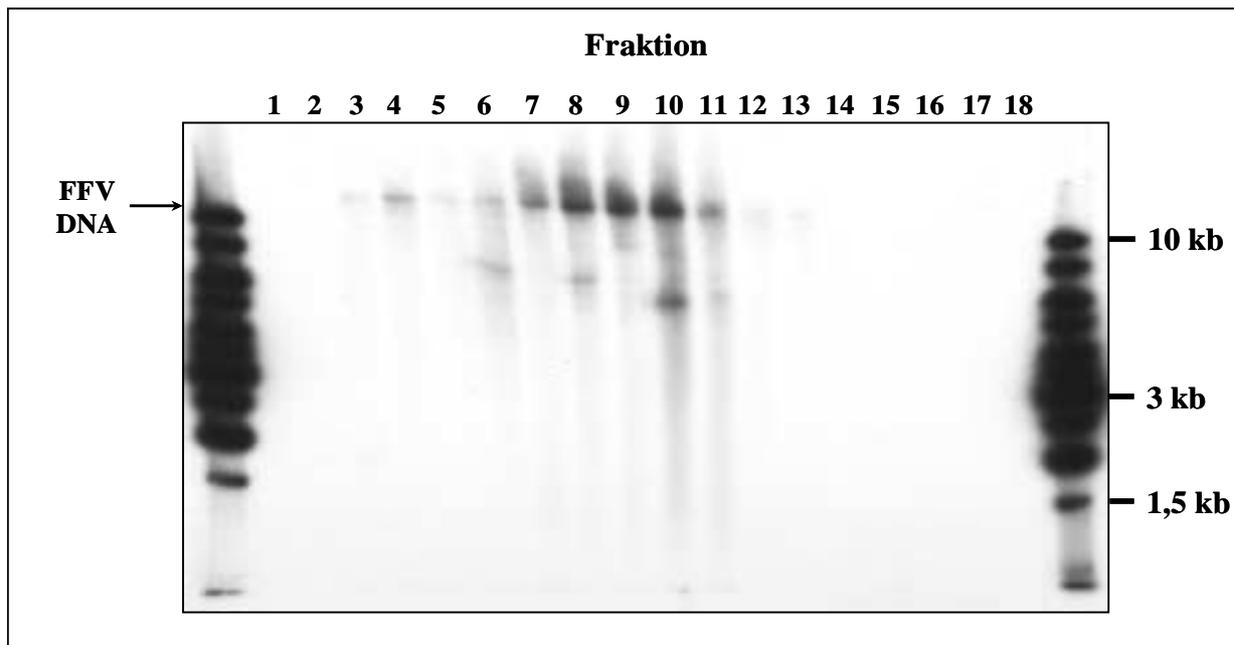


Abb. 29: Nachweis von volle-Länge DNA aus extrazellulären FFV-Partikeln.

Aus 175 μ l-Fraktionsvolumen wurde die virale DNA isoliert und mit einer FFV-*pol*-hybridisierenden radioaktiven Sonde im Southern Blot nachgewiesen. Mit einer Grösse von ca. 12 kb konnte diese DNA in den Fraktionen 7 bis 11 nachgewiesen werden.

Neben der viralen DNA wurde ausserdem die virale RNA präpariert, um auszuschliessen, dass in extrazellulären Viruspartikeln RNA als funktionelles Genom vorliegt. Mit Hilfe des QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen) wurde die RNA aus den präparierten Fraktionen (175 μ l) gewonnen und mittels Northern Blot auf FFV-RNA getestet. Als radioaktive Sonde wurde die auch für den Southern Blot eingesetzte Sonde benutzt. Während durch die Southern Blot-Analyse distinkte DNA-Banden nachgewiesen werden konnten, war im Falle des Northern Blots keine RNA nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.6. Nachweis der Infektiosität von FFV-DNA aus extrazellulären Viruspartikeln

Durch Yu und Mitarbeiter (1999) konnte gezeigt werden, dass bei PFV das funktionale Genom durch DNA repräsentiert wird. Da auch bei FFV durch Southern Blot-Analyse DNA im Viruspartikel nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden festgestellt, ob diese DNA infektiöser Natur ist. Zu diesem Zweck wurden infektiöse FFV-Überstände (37 ml) geerntet und nach 0,45 μ m Sterilfiltration in der Ultrazentrifuge aufkonzentriert (SW28-Rotor, 28000 rpm, 2 Std., 4°C). Die Viruspellets wurden anschliessend in 200 μ l PBS resuspendiert und über Nacht bei 37°C mit 4U DNase I (Promega) inkubiert, um möglicherweise aufkonzentrierte Virus-DNA aus den infizierten Zellen, die nicht durch Kapside geschützt ist, zu eliminieren. Am nächsten

Tag wurde die Virus-DNA mit Hilfe des QIAamp[®] Blood Mini Kits (Qiagen) isoliert und in 24 µl H₂O eluiert. Für die Bestimmung der DNA-Menge wurden 4 µl eingesetzt, 20 µl wurden für die Transfektion von CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen verwendet. Diese wurden ein Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 4×10^4 /ml in 12-Well-Platten eingesät; die Transfektion selbst erfolgte mit Hilfe von Polyfect (Qiagen). Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen in T25-Gewebekultuflaschen überführt und nach weiteren zwei Tagen gefärbt. Die Überstände wurden nach 0,45 µm Sterilfiltration auf frisch eingeeäte CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen transferiert und diese ebenfalls nach 48 Std. gefärbt. In allen 6 durchgeführten Ansätzen, in denen die gemessene DNA-Menge zwischen 1,4 und 6,8 µg betrug, konnte infektiöse FFV DNA nachgewiesen werden. Die Anzahl der infektiösen Einheiten war jedoch deutlich geringer als die Anzahl der infektiösen Einheiten der nach Transfektion von pChatul-3 DNA als Positivkontrolle. In einem zusätzlichen Kontrollexperiment wurde den aufkonzentrierten Viruspartikeln 10 µg infektiöse FV Plasmid-DNA zugefügt (pcHSRV2 und pSFV-1) und diese über Nacht mit bzw. ohne DNase I inkubiert. Nach der DNA-Isolierung wurden die Ansätze geteilt und die entsprechenden Indikatorzellen transfiziert. Während nach Färbung der CrFK/LTR(FFV)*lacZ*-Zellen die erfolgreiche Isolierung der infektiösen FFV DNA gezeigt werden konnte, blieben transfizierte BHK/LTR(PFV)*lacZ*-Zellen bzw. BHK/LTR(SFV-1)*lacZ*-Zellen negativ. Dieses Ergebnis weist auf einen kompletten Verdau von Plasmid-DNA durch DNase I hin. Damit kann ausgeschlossen werden, dass eventuell nicht-verpackte DNA aus den aufkonzentrierten Viruspartikeln für die Infektiosität verantwortlich ist.

4. Diskussion

Die Foamyviren gehören zu den Retroviren, unterscheiden sich jedoch in einer Reihe von Merkmalen von den besser bekannten Orthoretroviren. Die Orthoretroviren, wie z.B. HIV, werden charakterisiert durch ein diploides ssRNA-Genom. Die reverse Transkription findet bei ihnen unmittelbar nach Eintritt des Virus in die Zelle statt. Die lineare DNA wird anschliessend vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert, wo sie als Provirus in das Wirtszellgenom integriert. Die Integration des Virusgenoms ist Voraussetzung für die Expression der Gene (Vogt, 1997a). Für die Freisetzung von Viruspartikeln ist die Expression eines Hüllproteins nicht erforderlich (Boulangier & Jones, 1996, Einfeld, 1996, Kräusslich & Welker, 1996). Die Abwesenheit des Hüllproteins führt stattdessen zur Bildung so genannter „Virus Like Particles“ (VLPs), die unter künstlich erschaffenen Bedingungen sogar infektiös sein können (Bour *et al.*, 1996, Ritter *et al.*, 1996). Ein weiteres Merkmal der Retroviren ist die Prozessierung der Gag- und Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteine in den freigesetzten Partikeln durch die virale Protease, wodurch infektiöse, gereifte Viruspartikel entstehen (Dickson *et al.*, 1984, Vogt, 1996).

Im Gegensatz dazu enthalten Hepadnaviren ein unvollständiges, zirkuläres dsDNA-Genom, das nach Infektion der Zelle in eine kovalent geschlossene, zirkuläre DNA (cccDNA) überführt und als Matrize für die Transkription einer prägenomischen RNA benutzt wird. Verglichen mit den Retroviren, bei denen die Integration ins Wirtszellgenom ein obligater Schritt ist, integrieren cccDNA-Moleküle üblicherweise nicht in die Wirtszell-DNA. Die Tatsache, dass alle Hepadnaviren ein RNA-Prägenom replizieren, weist auf eine mögliche phylogenetische Verwandtschaft zu den Retroviren und führte zu dem Beinamen Pararetroviren. Die reverse Transkription stellt bei Pararetroviren ein spätes Ereignis im Replikationszyklus dar und knospende Virionen enthalten wieder ein zirkuläres dsDNA-Genom. Als Alternative zur Freisetzung der Viruspartikel kann das Genom in den Zellkern zurückwandern, um dort als Matrize für weitere Transkriptionsrunden zur Verfügung zu stehen. Für die Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle ist die Expression des Glykoproteins S unbedingt erforderlich (Ganem, 1996, Nassal & Schaller, 1993).

Für die Foamyviren der Primaten konnte gezeigt werden, dass die reverse Transkription nicht wie bei den herkömmlichen Retroviren nach Eintritt des Virus in die Zelle erfolgt, sondern ein spätes Ereignis der viralen Replikation darstellt (Moebes *et al.*, 1997), das zur intrazellulären Retrotransposition fähig ist (Heinkelein *et al.*, 2000). Diese besondere Eigenschaft hat zur Folge, dass freigesetzte infektiöse Partikel analog zu den Hepadnaviren funktionale dsDNA-Genome enthalten (Yu *et al.*, 1996a, Yu *et al.*, 1999). Ausserdem enthalten diese Partikel nicht wie

konventionelle Retroviren Matrix-, Kapsid- oder Nukleokapsidprotein, sondern verfügen über zwei grosse Gag-Proteine, die sich nur durch das Fehlen eines 3 kDa-Peptids am C-terminalen Ende unterscheiden (Giron *et al.*, 1997, Vogt, 1997b). Zusätzlich zeichnen sich die Foamyviren durch ihre Eigenschaft aus, ohne ein FV-Hüllprotein keine Viruspartikel freizusetzen (Baldwin & Linial, 1998, Fischer *et al.*, 1998).

Für die ausführlichere Untersuchung des Felinen Foamyvirus wurde zunächst ein infektiöser molekularer Klon konstruiert und analysiert. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Pseudotypisierbarkeit von FFV-Kapsiden angegangen. Mit Hilfe von *bet*-Deletionsmutanten wurde der Einfluss dieses Proteins im proviralen Kontext analysiert. Um einen Einblick in die Replikationsstrategie von FFV zu erhalten, wurde der Zeitpunkt der reversen Transkription bestimmt und die Fähigkeit zur intrazellulären Retrotransposition untersucht. Durch Quantifizierung der Nukleinsäuren extrazellulärer FFV-Partikel wurde die Anzahl der DNA-Kopien mit der Anzahl der RNA-Kopien verglichen. Schliesslich wurde das Genom aus extrazellulären FFV-Partikeln isoliert, seine Grösse und mögliche Infektiosität bestimmt.

4.1. Charakterisierung der infektiösen molekularen FFV-Klone

Wie auch die anderen Vertreter der Foamyviren wird FFV durch einen komplexen Genomaufbau charakterisiert, der neben den *gag*-, *pol*- und *env*-Genen am 3'-Ende noch über akzessorische Leserahmen verfügt. Weitere Gemeinsamkeiten bestehen in der Existenz eines internen Promotors (IP) im 3'-Bereich des *env*-Gens und der Gag-unabhängigen Pol-Expression. Ein Unterschied zu den Primaten-FV besteht z.B. im fehlenden nukleären Lokalisationssignal in Gag (Helps & Harbour, 1997, Winkler *et al.*, 1997). Um die Molekularbiologie von FFV genauer analysieren zu können, wurden zunächst infektiöse provirale FFV-Klone hergestellt. Der FFV-Klon pChatul-1 wurde aus subgenomischen DNA-Fragmenten kloniert (Helps & Harbour, 1997) und unterscheidet sich von pChatul-2 nur durch die Abwesenheit des SV40 ori im Vektorrückgrat. Im Gegensatz dazu leitet sich der FFV-Klon pChatul-3 vom replikationskompetenten Virus ab, das durch Zellkulturvermehrung von pChatul-2-abgeleitetem Virus entstanden ist.

Im Falle von pChatul-1 und pChatul-2 ergaben die Transfektionen von 293T-Zellen und der folgende Transfer der zellfreien Überstände auf geeignete Indikatorzellen nur sehr niedrige FFV-Titer. Im Vergleich dazu führte die Transfektion von pChatul-3 zu einer sehr effizienten Virusproduktion, die mit Virustitern nach Transfektion von der beiden Provirusklone von

Primaten-FV, die als Referenz zur Verfügung standen, pCHSRV2 und pSFV-1, vergleichbar waren (vgl. Tab. 5). Die nachfolgende Sequenzierung und der Vergleich der beiden Klone pChatul-2 und pChatul-3 identifizierte 27 Mutationen, die alle Bereiche des proviralen Genoms betreffen (vgl. Tab. 6).

Für die verminderte Replikation von pChatul-1 und pChatul-2 könnten mehrere Gründe verantwortlich sein. Vermutlich sind ein oder mehrere Defekte im *env*- oder *bet*-Gen von pChatul-1 und pChatul-2 vorhanden und das Virus konnte sich erst durch die vielen Passagen in der Zellkultur etablieren. Mit Hilfe der Sequenzierung wurden 6 Aminosäureaustausche im *env*-Gen identifiziert, von denen möglicherweise eine, mehrere oder auch alle Mutationen zu der oben beschriebenen verminderten Partikelfreisetzung führen. Mit Hilfe mehrerer Versuche konnte diese These untermauert werden. Nach Transfektion der infektiösen Klone wurde nicht nur die Menge der freigesetzten Viren im Überstand analysiert, sondern auch die Menge an Partikeln, die in der Zelle verblieben sind. Es konnte gezeigt werden, dass der extrazelluläre Titer nach Transfektion von pChatul-3 verglichen mit pChatul-1 und pChatul-2 signifikant höher war. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der intrazellulären, infektiösen Partikel nach Transfektion von pChatul-1 und pChatul-2 um ca. zwei Log-Stufen höher als im Fall von pChatul-3. Angenommen, es fände bei pChatul-1 und -2 in der Zelle zwar eine Zusammenlagerung der Virionen statt, jedoch können diese aufgrund eines Env-Defekts nicht über die Zellmembran freigesetzt werden, so müsste die Kotransfektion eines intakten Env-Plasmids diese Blockade aufheben. Daher wurden entsprechende Kotransfektionsexperimente durchgeführt und dadurch tatsächlich nachgewiesen, dass die Koexpression eines intakten FV-Env-Proteins die Blockierung aufhebt (Daten nicht gezeigt). Da pChatul-2-abgeleitete *gag-pol*-Konstrukte erfolgreich exprimieren, kann man davon ausgehen, dass die Mutationen im *gag*- und *pol*-Leserahmen weniger relevant für die bessere Replikation von pChatul-3 sind. Schliesslich wurde gefunden, dass bei pChatul-3 im Gegensatz zu pCHSRV2 und pSFV-1 das Verhältnis extrazellulärer zu intrazellulären Viren auf der Seite der extrazellulären liegt.

Von den Env-Proteinen der Orthoretroviren ist bekannt, dass diese über den sekretorischen Syntheseweg der Zelle zur Plasmamembran gelangen (Swanstrom & Wills, 1997), während im Gegensatz dazu die Foamyviruspartikel von Primaten vornehmlich an den intrazellulären Membranen knospen (Goepfert *et al.*, 1999, Goepfert *et al.*, 1997). Da bei der Analyse von pChatul-3 das Verhältnis der extrazellulären und intrazellulären FFV-Partikel ungefähr gleich ist, könnte eventuell dieses Merkmal der Primaten-Foamyviren für FFV nicht zutreffen. Diese Möglichkeit muss allerdings noch durch die elektronenmikroskopische Analyse von infizierten Zellen überprüft werden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden konnte.

4.2. Pseudotypisierung von FFV-Kapsiden

Unter Pseudotypisierung versteht man die Fähigkeit, dass das Kapsid eines gegebenen Virus das Glyko- bzw. Hüllprotein eines heterologen Virus benutzen kann. In den letzten Jahren konnte für PFV gezeigt werden, dass heterologe Hüllproteine wie das MuLV-Glykoprotein oder das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), die andere retrovirale Kapside sehr gut pseudotypisieren können, die Funktion des homologen FV-Hüllproteins weder physikalisch noch funktional übernehmen können (Pietschmann *et al.*, 1999, Rizvi & Panganiban, 1992, Yee *et al.*, 1994). Eine Möglichkeit dafür besteht in der Tatsache, dass Foamyviren speziell an intrazellulären Membranen knospen und die Hüllproteine von MuLV oder VSV über den sekretorischen Weg an die Zellmembran transportiert werden (Swanstrom & Wills, 1997). Diese räumliche Trennung in Bezug auf die Verpackung würde die fehlende Pseudotypisierbarkeit erklären. Eine andere Möglichkeit besteht in der Notwendigkeit, dass bestimmte Sequenzen in den FV Hüllproteinen, die verantwortlich für die Membranhüllung sind, von den heterologen Hüllproteinen nicht kodiert werden.

Mittlerweile ist bekannt, dass die spezifischen Interaktionen zwischen PFV-Kapsiden mit ihrem Hüllprotein und die resultierende Partikelfreisetzung durch das Leaderpeptid sowie den N-terminalen Bereich der Transmembrandomäne vermittelt werden (Lindemann *et al.*, 2001, Pietschmann *et al.*, 1999, Pietschmann *et al.*, 2000). Bei dem Leaderpeptid handelt es sich um den N-terminalen Bereich des Env-Proteins, der dafür verantwortlich ist, dass das Protein am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) gebildet wird und in den sekretorischen Syntheseweg der Zelle gelangt. Die Transmembrandomäne macht den 3'-Bereich des Proteins aus und ist für die Verankerung in den zellulären Membranen (ER und Plasmamembran) verantwortlich (Wang & Mulligan, 1999). Es wird angenommen, dass der N-terminale Bereich des Leaderpeptids die primäre Interaktion mit dem Kapsid vermittelt und die Interaktion mit der membranspannenden Domäne (MSD), die sich innerhalb der Transmembrandomäne befindet, erst später eine Rolle im Prozess der Knospung spielt (Lindemann *et al.*, 2001). Fakt ist, dass die Interaktion von Kapsid und Hüllprotein für die Freisetzung von Partikeln des PFV essentiell ist und dass Hüllproteine fremder Spezies, wie VSV oder MuLV die Funktionen des PFV-Hüllproteins nicht übernehmen können (Pietschmann *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern FFV-Kapside durch die heterologen FV-Hüllproteine pseudotypisiert werden und ob eventuell eine Interaktion von FFV-Kapsiden mit Hüllproteinen anderer Spezies erfolgen kann.

Die entsprechenden Pseudotypisierungsexperimente mit verschiedenen FFV-Vektoren zeigten, dass FFV-Kapside nicht nur in Gegenwart des homologen Hüllproteins, sondern auch effizient

mit PFV- und SFV-1-Hüllproteinen freigesetzt werden können (vgl. Abb. 13, Tab. 7). Die für die Verpackung verantwortlichen Domänen der Env-Proteine von PFV und SFV-1 müssen also denen des FFV-Hüllproteins so ähnlich sein, dass die Proteine die Funktion des FFV Hüllproteins ausüben können und infektiöse Partikel freisetzen können. Umgekehrt sollte auch im reziproken Experiment die Pseudotypisierung von verschiedenen Foamyvirus- und Retrovirkapsiden durch das FFV-Hüllprotein getestet werden. Während im Experiment zuvor gezeigt worden ist, dass PFV-Env FFV-Kapside erfolgreich umhüllen und freisetzen kann, ergab diese Analyse, dass PFV-Kapside nicht durch das FFV-Env pseudotypisiert werden können. Allerdings können SFV-1 Kapside, die phylogenetisch sehr nah mit PFV verwandt sind, sehr gut mit FFV-Env pseudotypisiert werden. Der Vergleich der intrazellulären mit den extrazellulären Titern gibt einen Hinweis darauf, dass es auch in der Zelle nicht zu einer Zusammenlagerung von PFV-Kapsiden mit dem FFV-Env kommt. Die Frage, warum das Hüllprotein von FFV zwar SFV-1-Kapside, aber nicht PFV-Kapside pseudotypisieren kann, bleibt im Rahmen dieser Arbeit leider unbeantwortet.

Überraschenderweise konnten durch FFV-Hüllprotein auch infektiöse MuLV-Kapside und HIV-1-Kapside umhüllt und freigesetzt werden. Die Frage, ob die gleichen Domänen, die die Interaktion von FFV-Kapsid mit dem FFV-Hüllprotein vermitteln, für die Interaktionen zwischen dem MuLV- bzw. HIV-Kapsid und dem FFV-Hüllprotein verantwortlich sind, bleibt ungeklärt. Es konnte allerdings erstmals gezeigt werden, dass ein unverändertes FV-Hüllprotein Kapside von phylogenetisch weniger verwandten Viren erfolgreich umhüllen und aus der infizierten Zelle freisetzen kann (Lindemann *et al.*, 1997).

4.3. Untersuchungen zum FFV-Partikelexport

Wie bereits oben erläutert, besteht ein fundamentaler Unterschied zwischen den Orthoretroviren und den Foamyviren in der Notwendigkeit, ein funktionales Hüllprotein zu exprimieren, um Viruspartikel freisetzen zu können. Während alle anderen Retroviren in Abwesenheit des Hüllproteins so genannte „virus like particles“ (VLPs) freisetzen können, sind die Foamyviren dazu nicht in der Lage (Baldwin & Linial, 1998, Einfeld, 1996, Fischer *et al.*, 1998, Kräusslich & Welker, 1996). Hinsichtlich ihrer Reifung kann man die Retroviren grob in zwei Gruppen einteilen. Von der ersten Gruppe (z.B. MMTV und MPMV) ist bekannt, dass sich die Gag-Polyproteinmoleküle frei im Zytoplasma befinden und dort so genannte intrazytoplasmatische A-Partikel (ICAPs) bilden können (Swanstrom & Wills, 1997). Nach dem Transport dieser

sphärischen Strukturen an die Plasmamembran kommt es zur Knospung und Freisetzung der Viruspartikel. Bei der zweiten Gruppe (z.B. ASLV, HIV und MuLV) findet man im Gegensatz dazu keine vorgefertigten Kapside im Zytoplasma. Hier sammeln sich makromolekulare Aggregate direkt an der Plasmamembran und die Partikel werden als unreife Viren von der Plasmamembran abgeschnúrt. Erst nach der Ausreifung sind bei diesen Viren charakteristische Kapsidstrukturen im Elektronenmikroskop erkennbar (Craven *et al.*, 1995, Swanstrom *et al.*, 1990). In beiden Fällen sind Sequenzen in der Matrix-Domäne des Gag-Proteins für diesen Prozess verantwortlich (Rhee & Hunter, 1990a, Rhee & Hunter, 1990b). Diese speziellen Sequenzen vermitteln die Interaktion der Vorläuferproteine mit der Plasmamembran und fördern die Freisetzung der Viruspartikel auch in Abwesenheit des Env-Proteins aus der Zelle (Einfeld, 1996, Kräusslich & Welker, 1996). Im Fall einer bestimmten Gruppe defekter, endogener Retroviren (intrazisternale A Partikel, IAPs) unterscheidet sich der Morphogeneseprozess nur ein wenig vom dem der Orthoretroviren (Kuff & Lueders, 1988, Teich, 1984, Welker *et al.*, 1997). Auch diese Viren, denen ein funktionales Hüllprotein fehlt, assemblieren sich während der Umhüllungsphase, knospen jedoch nicht an der Plasmamembran sondern an den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. IAPs enthalten nicht-prozessierte Gag-Polyproteine und weisen eine unreife Morphologie auf (Kuff & Lueders, 1988, Teich, 1984). Auch diese Interaktion zwischen Kapsidprotein und ER-Membran wird durch Motive der Matrix-Domäne vermittelt. Wie die IAPs knospen auch die Foamyviren vornehmlich an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Ein so genanntes „ER retrieval signal“, ein Trilysin-Motiv, lokalisiert in der sehr kurzen zytoplasmatischen Domäne des Env-Proteins, ist teilweise für die Knospung im ER und den eingeschränkten Transport der Partikel an die Plasmamembran verantwortlich (Goepfert *et al.*, 1999, Goepfert *et al.*, 1997, Goepfert *et al.*, 1995).

Da für FFV noch keine Daten über den Zusammenbau der Viruspartikel bzw. deren Freisetzung bekannt waren, sollte dieser Schritt der Virusreplikation hier näher untersucht werden. Wie in der Literatur beschrieben, konnte für PFV kein Partikelexport nach Transfektion von 293T-Zellen mit einem Gag-Pol-Konstrukt beobachtet werden (vgl. Abb. 14) und erst mit der Kotransfektion von PFV-Env erfolgte die Freisetzung der Partikel in den Überstand (Baldwin & Linial, 1998, Fischer *et al.*, 1998). Betrachtet man die Untersuchungen zur FFV-Partikelbildung, so konnte hier ebenso viel Gag-Protein im Zellkulturüberstand in Abwesenheit wie in Anwesenheit von Env-Protein gezeigt werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass FFV genauso wie die Orthoretroviren ohne Koexpression eines Hüllproteins zur Freisetzung von Viruspartikeln in der Lage ist. Auch bei SFV-1 konnte eine sehr geringe Freisetzung von Viruspartikeln in Abwesenheit eines Hüllproteins demonstriert werden. Da diese

Untersuchungen jedoch stark von der Sensitivität der Antikörperbindung abhängen, die für den Nachweis der Proteine eingesetzt wurden, sind die einzelnen Tests untereinander nicht wirklich vergleichbar. Da neben dieser physikalischen Freisetzung aus den Pseudotypisierungsdaten bekannt war, dass z.B. PFV-Env oder SFV-1-Env Kapside von FFV signifikant effizienter funktional-aktiv umhüllen als das homologe FFV-Hüllprotein, sollte in nachfolgenden Untersuchungen der Vergleich dieser Freisetzung untereinander erfolgen. Um diese Frage allerdings eindeutig klären zu können, müssten von Antikörper-Antigen-Bindungen unabhängige Methoden eingesetzt werden. Durchgeführte elektronenmikroskopische Analysen würden nicht nur Aufschluss über den Export der Partikel liefern, sondern auch über die Zusammensetzung dieser in der Zelle. Weiterhin besteht die Möglichkeit, durch metabolische Markierung der transfizierten Zellen exportierte Viruspartikel auch ohne Immunoblot nachzuweisen.

4.4. Das *bet*-Gen ist für die effiziente FFV-Replikation unbedingt erforderlich

Über die Funktion des akzessorischen Proteins Bet weiss man bis heute relativ wenig. Das Protein, das aus dem ersten Teil von *tas* und der gesamten kodierenden Region von *bet-2* besteht, wird von einer doppelt-gespleissten mRNA synthetisiert und als Fusionsprotein translatiert (Muranyi & Flügel, 1991). Das Protein wird von infizierten Zellen in grossen Mengen gebildet, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Hahn *et al.*, 1994, Löchelt *et al.*, 1991). Die Funktion ist bisher noch unbekannt und Ähnlichkeiten zu irgendeinem bekannten zellulären oder viralen Protein konnten nicht gezeigt werden (Flügel, 1991).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des FFV-Bet-Proteins auf die Virusreplikation im pChatul-3-Kontext sowie auf die Pseudotypisierung untersucht werden. Die Konstruktion eines FFV-Klons mit deletiertem *bet*-Gen sollte die Rolle für die FFV-Replikation im proviralen Kontext aufklären. Nach Transfektion von 293T- und CrFK-Zellen mit pChatul-3 konnte in den 293T-Zellen eine sehr hohe Bet-Expression gezeigt werden (vgl. Abb. 15), wohingegen die Bet-Expression nach Transfektion von CrFK-Zellen deutlich geringer war. Da jedoch auch die Gag-Expression nach Transfektion von CrFK-Zellen verringert war, ist dieser Unterschied wahrscheinlich auf Differenzen in der Transfektionseffizienz und transienten Proteinexpression zwischen 293T- und CrFK-Zellen zurückzuführen. Weiterhin war keine Bet-Expression nach Transfektion von 293T- und CrFK-Zellen mit der *bet*-Deletionsmutante pJR43 nachweisbar. Die transiente Virusproduktion in 293T-Zellen war dabei nur geringfügig beeinträchtigt, während in CrFK-Zellen kein Bet⁻-Virus nachgewiesen werden konnte (vgl. Tab.

8). Nach dem zellfreien Transfer der Überstände von pJR43-transfizierten Zellen auf CrFK-Zellen konnte keine Virusreplikation mehr nachgewiesen werden. Dieser erste Befund deutet also auf eine Rolle von Bet bei der Virusreplikation hin, da durch das Fehlen des Proteins die Infektiosität des Virus verloren geht. Ob die Infektiosität durch Transkomplementation mit einem Bet-Expressionsplasmid wiederhergestellt werden kann, muss noch geprüft werden.

4.5. FFV-Bet hat einen Einfluss auf die Pseudotypisierung von FFV-Kapsiden

Zur Untersuchung des Einflusses von Bet auf die Pseudotypisierung wurden zunächst die beiden Bet-Expressionsplasmide pJR26 und pJR42 hergestellt. Bei der Klonierung von pJR42 war zu beachten, dass die DNA des infektiösen Klons pChatul-3 nicht direkt als Matrize verwendet werden kann, da es sich bei Bet um ein Fusionsprotein aus Teilen von Tas und Bel-2 handelt, welches von einem gespleissten Transkript translatiert wird. In den Jahren 1993 und 1995 konnte die Existenz von zwei verschiedenen proviralen Genomen der Foamyviren gezeigt werden, die sich dadurch unterscheiden, dass die etwas kleinere Form sich von einer revers transkribierten RNA fast genomischer Länge ableitet, die das wenige hundert Nukleotide lange Spleissereignis, das normalerweise zum Bet-Protein führt, aufweist (Herchenröder *et al.*, 1995, Saïb *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu Wildtyp-Foamyviren exprimieren diese Δ Tas-Mutanten keinen Transaktivator sondern ausschliesslich sehr geringe Mengen an Bet-Protein, dessen Expression vom internen Promoter getrieben wird (Saïb *et al.*, 1995). Diese Besonderheit der Foamyviren erlaubte es folglich, dass für die Amplifikation von *bet* cDNA genomische DNA aus FFV-infizierten CrFK-Zellen verwendet werden konnte.

Nach der Klonierung der Bet-Expressionskonstrukte pJR26 und pJR42 konnte für pJR26 eine sehr effiziente Bet-Proteinexpression nach der Transfektion von 293T-Zellen gezeigt werden, die Bet-Expression nach Transfektion von pJR42 war im Vergleich dazu deutlich geringer (vgl. Abb. 16). Es ist bekannt, dass die Anwesenheit von Introns am 5'-Ende einer inserierten cDNA zu einer Steigerung der Genexpression führt (Buchman & Berg, 1988, Huang & Gorman, 1990). Die Umklonierung des *bet*-Gens in ein solches Expressionsplasmid sollte wieder zu einer effizienten Bet-Expression führen. Die Untersuchung dazu konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abgeschlossen werden.

Auch nach Transfektion von CrFK-Zellen konnte die Bet-Expression belegt werden, allerdings mit einer vielfach geringeren Effizienz. Dies war zu erwarten, da von 293T-Zellen eine gesteigerte Proteinexpression gegenüber anderen Zelltypen bekannt war.

Kotransfektionsanalysen von verschiedenen Gag-Pol-Konstrukten zusammen mit einem Hüllprotein sowie pJR26 führten im Falle von transfizierten 293T-Zellen zu einer sehr starken Reduktion der Transduktionseffizienzen (vgl. Abb. 16). Die Koexpression des Bet-exprimierenden Plasmids scheint demnach Auswirkungen auf die Expression der Gag-Pol-Konstrukte zu haben. Ob das Protein eventuell die Promotoraktivität des CMV-Promotors herunterreguliert oder sich indirekt auf die Genexpression auswirkt, konnte anhand dieser ersten Daten noch nicht geklärt werden. Nach der Kotransfektion von pJR42 war diese verminderte Transduktionseffizienz ebenfalls erkennbar, allerdings nicht mit derselben Intensität. Eventuell ist diese Beobachtung auf die verminderte Bet-Expression nach Transfektion von pJR42 zurückzuführen. Nach der Transfektion von CrFK-Zellen mit den verschiedenen Gag-Pol- und Env-Konstrukten konnte im Gegensatz zu den 293T-Zellen nur eine sehr geringe Transduktionseffizienz nachgewiesen werden. Die Kotransfektion von pJR42 führte im Vergleich zu den Transfektionen in Abwesenheit von Bet zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz. Somit trifft die These der inhibierenden Wirkung von Bet speziell auf die CrFK-Zellen nicht zu. Möglicherweise spielt innerhalb dieser Untersuchungen der untersuchte Zelltyp eine wesentliche Rolle, da in beiden Zelllinien unterschiedliche Reaktionen nach der Bet-Expression beobachtet wurden.

4.6. Die reverse Transkription stellt ein spätes Ereignis im Replikationszyklus von FFV dar

Betrachtet man den Replikationszyklus von Orthoretroviren, so stellt die reverse Transkription einen essentiellen Schritt im frühen Stadium der Replikation dar (Telesnitsky & Goff, 1997). Durch bestimmte Inhibitoren, wie z.B. dem Thymidinanalogon Azidothymidin (AZT) wird die reverse Transkription und damit die Virusreplikation verhindert (Mitsuya & Broder, 1987). Während des Umschreibens des ssRNA-Genoms in dsDNA bewirkt AZT einen Kettenabbruch und der Infektionszyklus der Retroviren wird unterbrochen.

Wie Saïb und Mitarbeiter (1997) gezeigt haben, kann auch die FV-Replikation durch AZT erfolgreich unterdrückt werden. Für PFV ist es möglich, mit einem funktionalen AZT-Test den Zeitpunkt der reversen Transkription zu bestimmen (Moebes *et al.*, 1997). In diesem Test konnte dargelegt werden, dass beim Verlassen der Viruspartikel aus der Zelle die reverse Transkription nahezu abgeschlossen ist. Dieser Test wurde ebenfalls für die Untersuchung der FFV-Replikation eingesetzt. Dafür wurden die zu transfizierenden und die zu infizierenden Zellen in An- oder Abwesenheit von AZT kultiviert (siehe Fließschema Abb. 19). Die Ergebnisse aus

diesen Daten belegen, dass auch bei FFV die reverse Transkription fast vollständig abgelaufen ist, wenn die Partikel die Zelle verlassen (vgl. Tab. 9 und Abb. 20). Somit unterscheidet sich auch FFV in Bezug auf die Replikationsstrategie eindeutig von den Orthoretroviren, bei denen die reverse Transkription direkt nach der Infektion der Zielzelle stattfindet (Mitsuya & Broder, 1987, Vogt, 1997a). Die reverse Transkription der prägenomischen RNA als ein spätes Ereignis in der Virusreplikation ist auch ein wichtiges Merkmal der Hepadnaviren (Ganem & Schneider, 2001, Nassal & Schaller, 1993), d.h. nicht nur die Foamyviren der Primaten, sondern auch FFV verfolgt teilweise die Replikationsstrategie der Hepadnaviren.

4.7. Die intrazelluläre Retrotransposition ist kein Merkmal von FFV

Wie schon in der Einleitung erwähnt, unterscheidet sich PFV von den Orthoretroviren durch die Besonderheit der intrazellulären Retrotransposition (Heinkelein *et al.*, 2000). Bei diesem Prozess kommt es zu einem Transport des cDNA-Genoms zurück in den Zellkern, wo dieses wieder in das Wirtszellgenom integrieren kann. Dieser Verlauf setzt jedoch voraus, dass die reverse Transkription bereits stattgefunden hat und das virale Genom in Form von DNA vorliegt. Um festzustellen, ob auch FFV intrazellulär retrotransponieren kann, wurden verschiedene Zelllinien mit FFV- und PFV-Plasmiden transfiziert, die neben den *gag*- und *pol*-Genen über eine EGFP-Reporterkassette verfügen. Dieser Marker ermöglicht die einfache Messung der Zellen im Durchflusszytometer über einen längeren Zeitraum. Wie erwartet war eine „EGFP-Markerpersistenz“ über einen Zeitraum von 21 Tagen für das Konstrukt pMH92 nachweisbar (vgl. Abb. 21). Für dieses Plasmid konnte bereits eine intrazelluläre Retrotransposition nach Transfektion von 293-Zellen gezeigt werden (Heinkelein *et al.*, 2000). Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pMH97 verwendet, das im Unterschied zu pMH92 eine mutierte Integrase aufweist (Enssle *et al.*, 1999). Diese Mutation verhindert die Integration in das Wirtszellgenom und nach Transfektion des Plasmids dürfte keine intrazelluläre Retrotransposition nachweisbar sein. Analog dazu wurden 293-, CrFK- und HeLa-Zellen mit dem Plasmid pWR6 transfiziert und die EGFP-Expression über einen Zeitraum von 21 Tagen bestimmt. Unabhängig von der eingesetzten Zelllinie verhielt sich pWR6 wie die Negativkontrolle pMH97, d.h. eine intrazelluläre Retrotransposition war hier nicht nachweisbar. Da in den Pseudotypisierungsexperimenten gezeigt werden konnte, dass pWR6 funktionell aktiv ist, kann man einen Defekt von Seiten des Konstrukts ausschliessen.

Bei der Interpretation dieser Daten muss folgender Punkt berücksichtigt werden. Im PFV-*gag*-Gen ist ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) identifiziert worden, das für den Transport des Gag-Proteins in den Zellkern verantwortlich ist (Schliephake & Rethwilm, 1994). Dieses NLS könnte weiterhin eine Rolle in der Anreicherung von zusätzlichen Proviruskopien über den intrazellulären Weg spielen (Heinkelein *et al.*, 2000, Meiering *et al.*, 2000). Verglichen mit den Hepadnaviren, konnte auch dort die Akkumulation von cccDNA im Zellkern, hervorgerufen durch einen intrazellulären Weg, beobachtet werden (Wu *et al.*, 1990). Das Kapsid- oder *Core*-Protein, das in diesem Fall den Transport der cccDNA vermittelt, enthält ebenso wie PFV ein Arginin-reiches nukleäres Lokalisationssignal (Hatton *et al.*, 1992, Nassal, 1992, Yeh *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu ist bei FFV ein solches nukleäres Lokalisationssignal nicht vorhanden. Die Transfektion eines EGFP-Gag-Plasmids führte zu einer perinukleären Gag-Lokalisation (Bodem *et al.*, 1998b). Demzufolge kann auch das nach der Transfektion von pWR6 exprimierte FFV-Gag-Protein nicht in den Zellkern transportiert werden. Andere Gründe für das Fehlen der intrazellulären Retrotransposition können allerdings nicht ausgeschlossen werden.

4.8. Extrazelluläre FFV-Partikel enthalten mehr RNA als DNA

Es konnte also für FFV gezeigt werden, dass es sich bei dem funktionalen Genom um DNA handelt, über die infektiöse Natur und über die Struktur dieser DNA war bislang aber noch nichts bekannt. Für PFV konnte nicht nur nachgewiesen werden, dass die reverse Transkription vor einer erneuten Infektionsrunde abgeschlossen und die extrazellulären Partikel ein volle-Länge dsDNA-Genom enthalten (Yu *et al.*, 1999). Yu und Mitarbeiter haben weiterhin gezeigt, dass lediglich ein Fünftel der extrazellulären PFV-Partikel ein DNA-Genom aufweisen.

Um das DNA zu RNA-Verhältnis bei FFV zu untersuchen, wurden quantitative kompetitive PCR- und RT-PCR-Studien durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Quantifizierung der relativen Mengen an PCR-Produkt, abgeleitet von einer Ziel-DNA und einer Kompetitor-DNA, d.h. einer internen Standard-DNA (Piatak *et al.*, 1993, Souza *et al.*, 1996, Zimmermann & Mannhalter, 1996). Wie bei Yu und Mitarbeitern beschrieben, wurden zwei Primerpaare verwendet, die sowohl Produkte der frühen Phase als auch der späten Phase der reversen Transkription erkennen. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil der RNA in extrazellulären FFV-Partikeln, unter der Berücksichtigung eines hohen Schwankungsbereichs, höher ist als der DNA-Anteil (vgl. Tab. 10).

Aufgrund dessen wurde neben dieser Methode eine zweite Methode angewandt, die eine genauere Quantifizierung der Nukleinsäuren ermöglicht. Mit Hilfe der *Real-Time* PCR sollten die relativen Nukleinsäuremengen aus FFV mit denen aus einem konventionellen Retrovirus verglichen werden. Wir verwendeten für diese Untersuchungen das Friend-Maus-Leukämie-Virus (FrMuLV), da hier zusätzlich die Virustiter leicht bestimmt werden konnten (Dittmer *et al.*, 1998). Die Annahme, dass die RNA-Mengen, isoliert aus den extrazellulären FrMuLV-Viruspartikeln deutlich höher sind als die DNA-Mengen, erwies sich als richtig (vgl. Abb. 26). Wie es für ein RNA-enhaltendes Retrovirus typisch ist, konnte mit Hilfe dieser Methode 100000mal mehr RNA als DNA nachgewiesen werden. Demgegenüber ergaben die Ergebnisse aus der *Real-Time* PCR- und RT-PCR für FFV ein DNA zu RNA Verhältnis von ungefähr 1:5,6. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus den quantitativen kompetitiven PCR- und RT-PCR-Analysen, dass ebenso wie bei PFV die extrazellulären FFV-Partikel signifikant grössere Mengen RNA als DNA enthalten. Da es sich bei den Foamyviren um DNA-Viren handelt, sind diese grossen Mengen RNA natürlich ungewöhnlich. Eine mögliche Erklärung bieten kürzlich publizierte Ergebnisse zu PFV, nach denen die prägenomische RNA verantwortlich für die Inkorporation des Pol-Proteins ist (Heinkelein *et al.*, 2002). Zusammen mit einer früheren Arbeit, in der gezeigt wurde, dass die prägenomische RNA unabhängig von Pol in Viruskapside verpackt wird, die dann auch bei Anwesenheit von Glykoprotein aus der Zelle ausgeschleust werden (Baldwin & Linial, 1998), ergibt sich folgendes Szenario: Bei der Infektion von Zellen mit Foamyviren werden eine Vielzahl von Nachkommenviruskapsiden gebildet, die alle Anteile prägenomischer RNA enthalten. Allerdings ist diese nur bei ca. einem Fünftel der Nachkommenviren so vollständig, dass Pol-Protein in die Viren eingebaut werden kann. Dies ist selbstverständlich eine Bedingung für die reverse Transkription, die sich dann anschliesst, noch bevor die Nachkommenviren die Zelle verlassen. Diese funktional aktiven Viren enthalten dann DNA-Genome. In der Mehrzahl werden aber defekte Nachkommenviren gebildet, die RNA-Genomanteile ohne für eine reverse Transkription ausreichende Mengen an Pol-Protein enthalten. Diese RNA bleibt allerdings mit den hier angewandten sensitiven Nachweismethoden detektierbar.

4.9. Extrazelluläre FFV-Partikel enthalten "infektiöse" DNA voller Länge

Da über die Struktur der funktionalen FFV-DNA noch nichts bekannt war, wurde sie in dieser Arbeit aus extrazellulären Partikeln isoliert und eingehender analysiert. Analog zu

durchgeführten PFV-Studien wurden zellfreie FFV-Überstände über Saccharosegradienten fraktioniert und diese Fraktionen weiter untersucht (Yu *et al.*, 1996a). Die Infektionsdaten zeigten ein Maximum der infektiösen Partikel im Gradienten, der mit dem Nachweis der Gag-Expression durch Western Blot-Analysen übereinstimmte (vgl. Abb. 27 und Abb. 28). In diesem Bereich konnte wie erwartet die virale DNA voller Länge erfolgreich nachgewiesen werden (vgl. Abb. 29). Detektiert wurden zusätzlich DNA-Fragmente halber Genomgröße, die wahrscheinlich auf Einzelstrangbrüche am zentralen Polypurintrakt in der *pol*-Region zurückzuführen sind (Kupiec *et al.*, 1988, Tobaly-Tapiero *et al.*, 1991). Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse zur Untersuchung der reversen Transkription. Es zeigt sich, dass die reverse Transkription bereits bei der Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle stattgefunden haben muss und die FFV-Partikel ein volle-Länge-DNA-Genom enthalten.

Um zu bestimmen, ob die Virus-assoziierte DNA nach Transfektion zur Bildung von infektiösen Virionen führt, wurde die DNA extrazellulärer Partikel isoliert. Die Transfektion von geeigneten Zielzellen mit der isolierten DNA führte zur erfolgreichen Produktion von FFV-Partikeln und der nachfolgende zellfreie Transfer auf empfängliche Zielzellen bewies die Infektiosität dieser DNA. Da nach der erfolgten DNA-Extraktion die Präparation zusätzlich mit RNase behandelt worden ist, können wir ausschliessen, dass eventuell Spuren von RNA für die Infektiosität verantwortlich sind. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von PFV überein, bei denen die infektiöse Natur der viralen DNA bereits gezeigt werden konnte (Yu *et al.*, 1999). Da bisher kein geeignetes Zellkultursystem für Hepadnaviren etabliert werden konnte, bleibt die Frage der infektiösen Natur der DNA aus Hepadnaviruspartikeln offen.

Innerhalb dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass sich FFV nicht nur durch eine Reihe von Merkmalen von den Orthoretroviren und Hepadnaviren abgrenzt, sondern teilweise auch von seinem nahen Verwandten PFV. Jedoch sind auch hier die wesentlichen Eigenschaften vorhanden, die eine Stellung der Foamyviren zwischen den Hepadnaviren und den Orthoretroviren rechtfertigen. In der Tab. 11 sind zusammenfassend einige Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Orthoretroviren, PFV, FFV und den Hepadnaviren aufgelistet, auf die in der Diskussion eingegangen wurde.

Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Orthoretroviren, Foamyviren und Hepadnaviren				
	Orthoretroviren	PFV	FFV	Hepadnaviren
funktionales Genom	ssRNA	lineare dsDNA	lineare dsDNA	unvollständige zirkuläre dsDNA
Integration	obligatorisch	obligatorisch	obligatorisch	nicht erforderlich
Reverse Transkription	frühes Ereignis	spätes Ereignis	spätes Ereignis	spätes Ereignis
Intrazelluläre Retrotransposition	nein	ja	nein	ja
Knospung	in Abwesenheit von Env Bildung von „virus like particles“	Glykoprotein erforderlich	(evtl. kein Glykoprotein erforderlich)	Glykoprotein erforderlich
Infektiöses Genom	nein	ja	ja	?

Tab. 11: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Retroviren, Foamyviren und Hepadnaviren.

Zusammenfassend sind noch einmal einige Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen diesen Vertretern aufgelistet.

5. Literaturverzeichnis

- Achong, B. G., Mansell, P. W., Epstein, M. A. & Clifford, P. (1971). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **46**, 299-307.
- Alke, A., Schwantes, A., Kido, K., Flotenmeyer, M., Flugel, R. M. & Löchelt, M. (2001). The bet gene of feline foamy virus is required for virus replication. *Virology* **287**, 310-20.
- Alke, A., Schwantes, A., Zemba, M., Flugel, R. M. & Löchelt, M. (2000). Characterization of the humoral immune response and virus replication in cats experimentally infected with feline foamy virus. *Virology* **275**, 170-6.
- Baldwin, D. N. & Linial, M. L. (1998). The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus. *J Virol* **72**, 3658-65.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-11.
- Baunach, G., Maurer, B., Hahn, H., Kranz, M. & Rethwilm, A. (1993). Functional analysis of human foamy virus accessory reading frames. *J Virol* **67**, 5411-8.
- Berkowitz, R., Fisher, J. & Goff, S. P. (1996). RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 177-218.
- Blair, W. S., Bogerd, H. & Cullen, B. R. (1994). Genetic analysis indicates that the human foamy virus Bel-1 protein contains a transcription activation domain of the acidic class. *J Virol* **68**, 3803-8.
- Bodem, J., Löchelt, M., Delius, H. & Flugel, R. M. (1998a). Detection of subgenomic cDNAs and mapping of feline foamy virus mRNAs reveals complex patterns of transcription. *Virology* **244**, 417-26.
- Bodem, J., Zemba, M. & Flugel, R. M. (1998b). Nuclear localization of the functional Bel 1 transactivator but not of the gag proteins of the feline foamy virus. *Virology* **251**, 22-7.
- Boeke, J. D. & Stoye, J. P. (1997). Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. *In Retroviruses, J.M. Coffin, S.H. Hughes und H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 343-435.
- Boulanger, P. & Jones, I. (1996). Use of heterologous expression systems to study retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 237-60.
- Bour, S., Schubert, U., Peden, K. & Strebel, K. (1996). The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J Virol* **70**, 820-9.

-
- Braaten, D., Franke, E. K. & Luban, J. (1996). Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* **70**, 3551-60.
- Brown, P., Nemo, G. & Gajdusek, D. C. (1978). Human foamy virus: further characterization, seroepidemiology, and relationship to chimpanzee foamy viruses. *J Infect Dis* **137**, 421-7.
- Buchman, A. R. & Berg, P. (1988). Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol Cell Biol* **8**, 4395-405.
- Burstein, H., Bizub, D. & Skalka, A. M. (1991). Assembly and processing of avian retroviral gag polyproteins containing linked protease dimers. *J Virol* **65**, 6165-72.
- Campbell, M., Renshaw-Gegg, L., Renne, R. & Luciw, P. A. (1994). Characterization of the internal promoter of simian foamy viruses. *J Virol* **68**, 4811-20.
- Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-4.
- Charneau, P., Alizon, M. & Clavel, F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**, 2814-20.
- Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H. & Clavel, F. (1994). HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* **241**, 651-62.
- Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**, 9677-86.
- Coffin, J. M. (1990). Retroviridae and their replication. *In fundamental Virology 2nd edn*, 645-708.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-4.
- Craven, R. C., Leure-duPree, A. E., Weldon, R. A., Jr. & Wills, J. W. (1995). Genetic analysis of the major homology region of the Rous sarcoma virus Gag protein. *J Virol* **69**, 4213-27.
- Cullen, B. R. (1991). Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *J Virol* **65**, 1053-6.
- Davies, D. R. (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 189-215.

-
- Dayton, A. I., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., Goh, W. C. & Haseltine, W. A. (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**, 941-7.
- Dickson, C., Eisenman, R., Fan, H., Hunter, E. & Teich, N. (1984). Protein biosynthesis and assembly. In *Molecular biology of tumor viruses, 2nd edition: RNA tumor viruses I/Text* (ed. R. Weiss et al.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 513-648.
- Dittmer, U., Brooks, D. M. & Hasenkrug, K. J. (1998). Characterization of a live-attenuated retroviral vaccine demonstrates protection via immune mechanisms. *J Virol* **72**, 6554-8.
- Dong, J. Y., Dubay, J. W., Perez, L. G. & Hunter, E. (1992). Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein define a requirement for dibasic residues for intracellular cleavage. *J Virol* **66**, 865-74.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. & Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**, 379-87.
- Einfeld, D. (1996). Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 133-76.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U. & Rethwilm, A. (1997). Carboxy-terminal cleavage of the human foamy virus Gag precursor molecule is an essential step in the viral life cycle. *J Virol* **71**, 7312-7.
- Enssle, J., Jordan, I., Mauer, B. & Rethwilm, A. (1996). Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4137-41.
- Enssle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D. & Rethwilm, A. (1999). An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J Gen Virol* **80**, 1445-52.
- Feng, Y. X., Yuan, H., Rein, A. & Levin, J. G. (1992). Bipartite signal for read-through suppression in murine leukemia virus mRNA: an eight-nucleotide purine-rich sequence immediately downstream of the gag termination codon followed by an RNA pseudoknot. *J Virol* **66**, 5127-32.
- Ferry, N., Duplessis, O., Houssin, D., Danos, O. & Heard, J. M. (1991). Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8377-81.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Muller, J. G. & Rethwilm, A. (1998). Foamy virus particle formation. *J Virol* **72**, 1610-5.

-
- Fisher, A. G., Feinberg, M. B., Josephs, S. F., Harper, M. E., Marselle, L. M., Reyes, G., Gonda, M. A., Aldovini, A., Debouk, C., Gallo, R. C. & et al. (1986). The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**, 367-71.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2000). Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis, and control. *American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, DC*, 198-234.
- Flügel, R. M. (1991). Spumaviruses: a group of complex retroviruses. *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**, 739-50.
- Freed, E. O. & Martin, M. A. (2001). HIVs and their replication. In *Fields Virology, 4th edn*, Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1971-2041.
- Freed, E. O., Myers, D. J. & Risser, R. (1989). Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J Virol* **63**, 4670-5.
- Ganem, D. (1996). Hepadnaviridae and their replication. In *Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (eds.), Virology, Vol. 2 Lippincott-Raven, New York*, 2703-2737.
- Ganem, D. & Schneider, R. J. (2001). Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In *D.M. Knipe, and P.M. Howley (eds), Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA*, 2923-2969.
- Giron, M. L., Colas, S., Wybier, J., Rozain, F. & Emanoil-Ravier, R. (1997). Expression and maturation of human foamy virus Gag precursor polypeptides. *J Virol* **71**, 1635-9.
- Giron, M. L., de The, H. & Saïb, A. (1998). An evolutionarily conserved splice generates a secreted env-Bet fusion protein during human foamy virus infection. *J Virol* **72**, 4906-10.
- Goepfert, P. A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B. H. & Mulligan, M. J. (1999). An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* **73**, 7210-7.
- Goepfert, P. A., Shaw, K. L., Ritter, G. D., Jr. & Mulligan, M. J. (1997). A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J Virol* **71**, 778-84.
- Goepfert, P. A., Wang, G. & Mulligan, M. J. (1995). Identification of an ER retrieval signal in a retroviral glycoprotein. *Cell* **82**, 543-4.

- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**, 1425-31.
- Hahn, H., Baunach, G., Brautigam, S., Mergia, A., Neumann-Haefelin, D., Daniel, M. D., McClure, M. O. & Rethwilm, A. (1994). Reactivity of primate sera to foamy virus Gag and Bet proteins. *J Gen Virol* **75**, 2635-44.
- Hatfield, D. L., Levin, J. G., Rein, A. & Oroszlan, S. (1992). Translational suppression in retroviral gene expression. *Adv Virus Res* **41**, 193-239.
- Hatton, T., Zhou, S. & Standring, D. N. (1992). RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* **66**, 5232-41.
- He, F., Blair, W. S., Fukushima, J. & Cullen, B. R. (1996). The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein. *J Virol* **70**, 3902-8.
- Heidmann, O. & Heidmann, T. (1991). Retrotransposition of a mouse IAP sequence tagged with an indicator gene. *Cell* **64**, 159-70.
- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H. & Rethwilm, A. (2002). Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of pol polyprotein into foamy virus capsids. *J Virol* **76**, 10069-73.
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenröder, O. & Rethwilm, A. (2000). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *Embo J* **19**, 3436-45.
- Helps, C. R. & Harbour, D. A. (1997). Comparison of the complete sequence of feline spumavirus with those of the primate spumaviruses reveals a shorter gag gene. *J Gen Virol* **78**, 2549-64.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A. & Luciw, P. A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* **201**, 187-99.
- Herchenröder, O., Turek, R., Neumann-Haefelin, D., Rethwilm, A. & Schneider, J. (1995). Infectious proviral clones of chimpanzee foamy virus (SFVcpz) generated by long PCR reveal close functional relatedness to human foamy virus. *Virology* **214**, 685-9.
- 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. *J Gen Virol* **80**, 2003-9.

-
- Honigman, A., Wolf, D., Yaish, S., Falk, H. & Panet, A. (1991). cis Acting RNA sequences control the gag-pol translation readthrough in murine leukemia virus. *Virology* **183**, 313-9.
- Huang, M. T. & Gorman, C. M. (1990). Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res* **18**, 937-47.
- Hunter, E. (1997). Viral Entry and Receptors. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes und H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 71-119.
- Hunter, E. & Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**, 187-253.
- Imrich, H., Müller, J.G., Lindemann, D., Heinkelein, M. & Rethwilm, A. Pathogenicity of foamy virus in athymic mice. *Eingereichte Publikation* .
- Jacks, T. (1990). Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**, 93-124.
- Jordan, I., Enssle, J., Guttler, E., Mauer, B. & Rethwilm, A. (1996). Expression of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA. *Virology* **224**, 314-9.
- 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. *J Virol* **72**, 504-11.
- 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.
- Konvalinka, J., Löchelt, M., Zentgraf, H., Flügel, R. M. & Kräusslich, H. G. (1995). Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J Virol* **69**, 7264-8.
- Kräusslich, H. G. (1991). Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3213-7.
- Kräusslich, H. G. & Welker, R. (1996). Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 25-63.
- Kuff, E. L. & Lueders, K. K. (1988). The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv Cancer Res* **51**, 183-276.

- Kupiec, J. J., Tobaly-Tapiero, J., Canivet, M., Santillana-Hayat, M., Flugel, R. M., Peries, J. & Emanoil-Ravier, R. (1988). Evidence for a gapped linear duplex DNA intermediate in the replicative cycle of human and simian spumaviruses. *Nucleic Acids Res* **16**, 9557-65.
- Lecellier, C. H. & Saïb, A. (2000). Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology* **271**, 1-8.
- Leis, J., Baltimore, D., Bishop, J. M., Coffin, J., Fleissner, E., Goff, S. P., Oroszlan, S., Robinson, H., Skalka, A. M., Temin, H. M. & et al. (1988). Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* **62**, 1808-9.
- Levin, J. G., Hatfield, D. L., Oroszlan, S. & Rein, A. (1993). Mechanisms of translational suppression used in the biosynthesis of reverse transcriptase. In *Reverse transcriptase (ed. A.M. Skalka and S.P. Goff)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 5-31.
- Lindemann, D., Bock, M., Schweizer, M. & Rethwilm, A. (1997). Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J Virol* **71**, 4815-20.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H. & Rethwilm, A. (2001). A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* **75**, 5762-71.
- Lindemann, D. & Rethwilm, A. (1998). Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J Virol* **72**, 4088-94.
- Linial, M. (2000). Why aren't foamy viruses pathogenic? *Trends Microbiol* **8**, 284-9. _00001763 _00001763.
- Linial, M. L. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* **73**, 1747-55.
- Linial, M. L. & Miller, A. D. (1990). Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**, 125-52.
- Löchelt, M., Muranyi, W. & Flügel, R. M. (1993). Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7317-21.
- Löchelt, M., Zentgraf, H. & Flügel, R. M. (1991). Construction of an infectious DNA clone of the full-length human spumaretrovirus genome and mutagenesis of the bel 1 gene. *Virology* **184**, 43-54.
- Lutcke, H. (1995). Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur J Biochem* **228**, 531-50.

- Malmquist, W. A., Van der Maaten, M. J. & Boothe, A. D. (1969). Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res* **29**, 188-200.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**, 159-62.
- Martoglio, B. & Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**, 410-5.
- Meiering, C. D., Comstock, K. E. & Linial, M. L. (2000). Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells. *J Virol* **74**, 1718-26.
- Meiering, C. D. & Linial, M. L. (2001). Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clin Microbiol Rev* **14**, 165-76.
- Mergia, A. (1994). Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3' end of the env gene. *Virology* **199**, 219-22.
- Mergia, A., Leung, N. J. & Blackwell, J. (1996). Cell tropism of the simian foamy virus type 1 (SFV-1). *J Med Primatol* **25**, 2-7.
- Mergia, A., Renshaw-Gegg, L. W., Stout, M. W., Renne, R. & Herchenroeder, O. (1993). Functional domains of the simian foamy virus type 1 transcriptional transactivator (Taf). *J Virol* **67**, 4598-604.
- Mergia, A. & Wu, M. (1998). Characterization of provirus clones of simian foamy virus type 1. *J Virol* **72**, 817-22.
- Mikovits, J. A., Hoffman, P. M., Rethwilm, A. & Ruscetti, F. W. (1996). In vitro infection of primary and retrovirus-infected human leukocytes by human foamy virus. *J Virol* **70**, 2774-80.
- Mitsuya, H. & Broder, S. (1987). Strategies for antiviral therapy in AIDS. *Nature* **325**, 773-8.
- Modrow, S. & Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*. **1. Aufl., Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag**.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O. & Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* **71**, 7305-11.
- Montagnier, L. (1984). AIDS priority. *Nature* **310**, 446.

-
- Muranyi, W. & Flügel, R. M. (1991). Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J Virol* **65**, 727-35.
- Nassal, M. (1992). The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive- strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* **66**, 4107-16.
- Nassal, M. & Schaller, H. (1993). Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol* **1**, 221-8.
- Netzer, K. O., Rethwilm, A., Maurer, B. & ter Meulen, V. (1990). Identification of the major immunogenic structural proteins of human foamy virus. *J Gen Virol* **71**, 1237-41.
- Oroszlan, S. & Luftig, R. B. (1990). Retroviral proteinases. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**, 153-85.
- Ossipow, V., Laemmli, U. K. & Schibler, U. (1993). A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **21**, 6040-1.
- 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. *J Biol Chem* **270**, 2957-66.
- Perez, L. G. & Hunter, E. (1987). Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein that block processing to gp85 and gp37. *J Virol* **61**, 1609-14.
- Pfrepfer, K. I., Rackwitz, H. R., Schnolzer, M., Heid, H., Löchelt, M. & Flügel, R. M. (1998). Molecular characterization of proteolytic processing of the Pol proteins of human foamy virus reveals novel features of the viral protease. *J Virol* **72**, 7648-52.
- Philipson, L., Andersson, P., Olshevsky, U., Weinberg, R., Baltimore, D. & Gesteland, R. (1978). Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: enhancement of the gag-pol polypeptide with yeast suppressor tRNA. *Cell* **13**, 189-99.
- Piatak, M., Jr., Luk, K. C., Williams, B. & Lifson, J. D. (1993). Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* **14**, 70-81.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (2003). Foamy Virus Envelope Glycoprotein-Mediated Entry Involves a pH- Dependent Fusion Process. *J Virol* **77**, 4722-30.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (1999). Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* **73**, 2613-21.

-
- Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (2000). An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *J Virol* **74**, 4474-82.
- Rabson, A. B. & Graves, B. J. (1997). Synthesis and Processing of viral RNA. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes und H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 205-261.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the Light Cycler. In *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. S. Meuer, C. Wittwer und K. Nakagawara (Eds.) Springer-Verlag, 21-34.
- Rein, A. (1994). Retroviral RNA packaging: a review. *Arch Virol Suppl* **9**, 513-22.
- Rethwilm, A. (1996). Unexpected replication pathways of foamy viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13**, S248-53.
- Rhee, S. S. & Hunter, E. (1990a). A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell* **63**, 77-86.
- Rhee, S. S. & Hunter, E. (1990b). Structural role of the matrix protein of type D retroviruses in gag polyprotein stability and capsid assembly. *J Virol* **64**, 4383-9.
- Riggs, J. L., Oshirls, Taylor, D. O. & Lennette, E. H. (1969). Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* **222**, 1190-1.
- Ritter, G. D., Jr., Yamshchikov, G., Cohen, S. J. & Mulligan, M. J. (1996). Human immunodeficiency virus type 2 glycoprotein enhancement of particle budding: role of the cytoplasmic domain. *J Virol* **70**, 2669-73.
- Rizvi, T. A. & Panganiban, A. T. (1992). Simian immunodeficiency virus vectors: replication and pseudotyping. *J Med Primatol* **21**, 69-73.
- Russell, D. W. & Miller, A. D. (1996). Foamy virus vectors. *J Virol* **70**, 217-22.
- Saïb, A., Koken, M. H., van der Spek, P., Peries, J. & de The, H. (1995). Involvement of a spliced and defective human foamy virus in the establishment of chronic infection. *J Virol* **69**, 5261-8.
- Saïb, A., Peries, J. & de The, H. (1993). A defective human foamy provirus generated by pregenome splicing. *Embo J* **12**, 4439-44.
- Saïb, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J. & de The, H. (1997). Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol* **71**, 1155-61.

-
- Schliephake, A. W. & Rethwilm, A. (1994). Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* **68**, 4946-54.
- Schmidt, M. & Rethwilm, A. (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210**, 167-78.
- Schweizer, M., Falcone, V., Gange, J., Turek, R. & Neumann-Haefelin, D. (1997). Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual. *J Virol* **71**, 4821-4.
- Schweizer, M., Turek, R., Hahn, H., Schliephake, A., Netzer, K. O., Eder, G., Reinhardt, M., Rethwilm, A. & Neumann-Haefelin, D. (1995). Markers of foamy virus infections in monkeys, apes, and accidentally infected humans: appropriate testing fails to confirm suspected foamy virus prevalence in humans. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**, 161-70.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* **23**, 628-33.
- Souaze, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C. Y., Rostene, W. & Forgez, P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* **21**, 280-5.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- Swanstrom, R., Kaplan, A. H. & Manchester, M. (1990). The aspartic proteinase of HIV-1. *Semin. Virol.* **1**, 175-186.
- Swanstrom, R. & Wills, J. W. (1997). Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes und H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 263-334.
- Teich, N. (1984). Taxonomy of Retroviruses. In *Molecular biology of tumor viruses, 2nd edition: RNA tumor viruses1/Text* (ed. R. Weiss et al.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 25-207.
- Telesnitsky, A. & Goff, S. P. (1997). Reverse Transcriptase and the generation of Retroviral DNA. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes und H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 121-160.
- Temin, H. M. & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-3.

- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Neves, M., Guillemin, M. C., Lecellier, C. H., Puvion-Dutilleul, F., Gicquel, B., Zientara, S., Giron, M. L., de The, H. & Saïb, A. (2000). Isolation and characterization of an equine foamy virus. *J Virol* **74**, 4064-73.
- Tobaly-Tapiero, J., Kupiec, J. J., Santillana-Hayat, M., Canivet, M., Peries, J. & Emanoil-Ravier, R. (1991). Further characterization of the gapped DNA intermediates of human spumavirus: evidence for a dual initiation of plus-strand DNA synthesis. *J Gen Virol* **72**, 605-8.
- Venkatesh, L. K. & Chinnadurai, G. (1993). The carboxy-terminal transcription enhancement region of the human spumaretrovirus transactivator contains discrete determinants of the activator function. *J Virol* **67**, 3868-76.
- Vogt, P. K. (1997a). Historical introduction to the general properties of retroviruses. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes und H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-25.
- Vogt, V. M. (1996). Proteolytic processing and particle maturation. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 95-131.
- Vogt, V. M. (1997b). Retroviral virions and genomes. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes und H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 27-69.
- Walter, P. & Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 87-119.
- Wang, G. & Mulligan, M. J. (1999). Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of foamy viruses. *J Gen Virol* **80**, 245-54.
- Welker, R., Janetzko, A. & Kräusslich, H. G. (1997). Plasma membrane targeting of chimeric intracisternal A-type particle polyproteins leads to particle release and specific activation of the viral proteinase. *J Virol* **71**, 5209-17.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S. D., Flugel, R. M. & Löchelt, M. (2001). Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J Virol* **75**, 7995-8007.
- Wilkinson, D. A., Mager, D. L. & Leong, J. A. (1994). Endogenous human retroviruses. In *Levy, J.A. (ed.), The Retroviridae* **3**, 465-535.
- Wills, N. M., Gesteland, R. F. & Atkins, J. F. (1991). Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6991-5.

- Winkler, I., Bodem, J., Haas, L., Zemba, M., Delius, H., Flower, R., Flugel, R. M. & Löchelt, M. (1997). Characterization of the genome of feline foamy virus and its proteins shows distinct features different from those of primate spumaviruses. *J Virol* **71**, 6727-41.
- Wittwer, C. (2001). Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. In *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. S. Meuer, C. Wittwer und K. Nakagawara (Eds.) Springer-Verlag, 1-8.
- Wolin, S. L. (1994). From the elephant to E. coli: SRP-dependent protein targeting. *Cell* **77**, 787-90.
- Wu, T. T., Coates, L., Aldrich, C. E., Summers, J. & Mason, W. S. (1990). In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* **175**, 255-61.
- Yang, P., Zemba, M., Aboud, M., Flügel, R. M. & Löchelt, M. (1997). Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the human foamy virus. *Virus Genes* **15**, 17-23.
- Yee, J. K., Friedmann, T. & Burns, J. C. (1994). Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* **43**, 99-112.
- Yeh, C. T., Liaw, Y. F. & Ou, J. H. (1990). The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* **64**, 6141-7.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S. & Linial, M. L. (1996a). Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* **271**, 1579-82.
- Yu, S. F., Edelmann, K., Strong, R. K., Moebes, A., Rethwilm, A. & Linial, M. L. (1996b). The carboxyl terminus of the human foamy virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J Virol* **70**, 8255-62.
- Yu, S. F. & Linial, M. L. (1993). Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay. *J Virol* **67**, 6618-24.
- Yu, S. F., Stone, J. & Linial, M. L. (1996c). Productive persistent infection of hematopoietic cells by human foamy virus. *J Virol* **70**, 1250-4.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D. & Linial, M. L. (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* **73**, 1565-72.

Zemba, M., Alke, A., Bodem, J., Winkler, I. G., Flower, R. L., Pfrepper, K., Delius, H., Flugel, R. M. & Löchelt, M. (2000). Construction of infectious feline foamy virus genomes: cat antisera do not cross-neutralize feline foamy virus chimera with serotype-specific Env sequences. *Virology* **266**, 150-6.

Zemba, M., Wilk, T., Rutten, T., Wagner, A., Flugel, R. M. & Löchelt, M. (1998). The carboxy-terminal p3Gag domain of the human foamy virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology* **247**, 7-13.

Zimmermann, K. & Mannhalter, J. W. (1996). Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques* **21**, 268-72, 274-9.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung von einfachen und komplexen Retroviren.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Retroviruspartikel.....	4
Abb. 3: Reverse Transkription des viralen RNA-Genoms in lineare dsDNA.....	6
Abb. 4: Reverse Transkription.....	7
Abb. 5: Schematische Darstellung des Genoms und der Genomexpression der Foamyviren.....	12
Abb. 6: Tas-gesteuerte Genexpression bei Foamyviren.....	15
Abb. 7: Replikationszyklus der Foamyviren.....	17
Abb. 8: Prinzip des TOPO-TA-Cloning-Kit.....	33
Abb. 9: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von pChatul-1.....	61
Abb. 10: Zirkuläre Plasmidkarten der FFV-Klone pChatul-1 und pChatul-2.....	62
Abb. 11: Klonierung des infektiösen molekularen FFV-Klons pChatul-3.....	63
Abb. 12: Schematische Darstellung der FFV-Expressionsplasmide pWR6 und pWR7.....	68
Abb. 13: Analyse von FV-Kapsiden pseudotypisiert mit verschiedenen Hüllproteinen.....	70
Abb. 14: Vergleichende Western Blot-Analyse zum Partikelexport bei FFV, PFV und SFV-1.....	73
Abb. 15: Analyse der Bet-Proteinexpression in FFV.....	75
Abb. 16: Analyse der Bet-Expression in Bezug auf die Pseudotypisierung.....	77
Abb. 17: FFV-Pol-Expression nach Transfektion von 293T-Zellen.....	78
Abb. 18: Replikationsstrategien der Orthoretroviren, Hepadnaviren und Foamyviren.....	80
Abb. 19: Einfluss einer 5 µM AZT-Behandlung auf die FFV-Replikation.....	81
Abb. 20: Einfluss von AZT auf die pChatul-3-Replikation.....	83
Abb. 21: Analyse der intrazellulären Retrotransposition bei FFV.....	84
Abb. 22: Verwendete Primerpaare in der quantitativen kompetitiven PCR und RT-PCR.....	85
Abb. 23: Quantitative kompetitive PCR-Analyse von extrazellulärer FFV DNA.....	87
Abb. 24: Quantitative kompetitive RT-PCR von RNA aus extrazellulären FFV-Partikeln.....	87
Abb. 25: Klonierung der verwendeten Standards für die Real-Time PCR.....	89
Abb. 26: Quantifizierung der Nukleinsäuren aus FFV- und FrMuLV-Partikeln.....	91
Abb. 27: Aufbau eines Saccharosegradienten.....	92
Abb. 28: Nachweis von FFV-Gag-Protein durch Western-Blot-Analyse.....	93
Abb. 29: Nachweis von volle-Länge DNA aus extrazellulären FFV-Partikeln.....	94

6.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der Retroviren.	2
Tab. 2: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen PFV und FFV.	20
Tab. 3: Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide.....	26
Tab. 4: Für Klonierungen und Retransformationen verwendete chemisch kompetente Zellen.	28
Tab. 5: Infektionsanalyse von transfizierten infektiösen FFV-, PFV- und SFV-1-Klonen.....	65
Tab. 6: Sequenzierung der infektiösen molekularen FFV-Klone.....	67
Tab. 7: Infektionsanalyse von pWR7 mit verschiedenen Glykoproteinen.....	71
Tab. 8: Bet-Expression bei pChatul-3 mit einem pChatul-3-Bet-Deletionskonstrukt.	75
Tab. 9: Untersuchung des Einflusses von AZT auf die Replikation von Foamyviren.	82
Tab. 10: Zusammenfassung der quantitativen kompetitiven PCR und RT-PCR.	88
Tab. 11: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Retroviren, Foamyviren und Hepadnaviren.	109

6.3. Abkürzungen

α -	Anti	GALV	Gibbon Ape Leukemia Virus
°C	Grad Celcius	Gly	Glycin
μ	Mikro	GR	Glycinreich
mA	Milli Ampere	His	Histidin
Abb.	Abbildung	HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome	HSRV	Human Spuma Retrovirus
Ala	Alanin	HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
ALV	Avian Leukosis Virus	IN	Integrase
APS	Ammoniumpersulfoxid	IP	Interner Promotor
AS	Aminosäure	kDa	Kilodalton
Asp	Asparaginsäure	LB	Lipid-Bilayer
BFV	Bovine Foamy Virus	LTR	Long Terminal Repeat
Bp	Basenpaar	M	Molar
BPB	Bromphenolblau	MA	Matrix
BSA	Bovines Serumalbumin	MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
bzw.	beziehungsweise	MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
CA	Kapsid	MPMV	Mason-Phizer Monkey Virus
CAS	<i>cis</i> -Aktive Sequenzen	mRNA	messenger RNA
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	MuLV	Murine Leukemia Virus
CMV	Cytomegalievirus	nm	Nanometer
Cys	Cystein	NC	Nukleokapsid
FKS	Fötales Kälberserum	Neo	Neomyzin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Serum	NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OD	Optische Dichte
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat	ORF	Open Reading Frame
E. coli	Escherichia coli	ori	origin of replication
EFV	Equine Foamy Virus	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein	PBS	Phosphate Buffered Saline
Env	Envelope, Hüllprotein	PBS	Primer-Bindungsstelle
ERS	ER Retrieval Signal	PCR	Polymerasekettenreaktion
EtOH	Ethanol	PFV	Prototypic Foamy Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum	Pol	Polymerase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter	PPP	Proteinprobenpuffer
FFV	Feline Foamy Virus	PR	Protease
FrMuLV	Friend Murine Leukemia Virus	psi	Verpackungssignal
FSFV	Feline Syncytium Forming Virus	PPT	Polypurintrakt
Gag	Group specific antigen	R	Repeat

RH	Rase H
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SFV	Simian Foamy Virus
SU	Surface
TAR	Tat Responsive Region
Tat	Transactivator of Transcription
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit, Enzymeinheit
U3	Unique (einmalig am 3'-Ende)
U5	Unique (einmalig am 5'-Ende)
V	Volt
Vif	Viral infectiosity factor
VLPs	Virus Like Particles
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-G	Glykoprotein von VSV
WDSV	Walleye Dermal Sarcoma Virus
z.B.	zum Beispiel

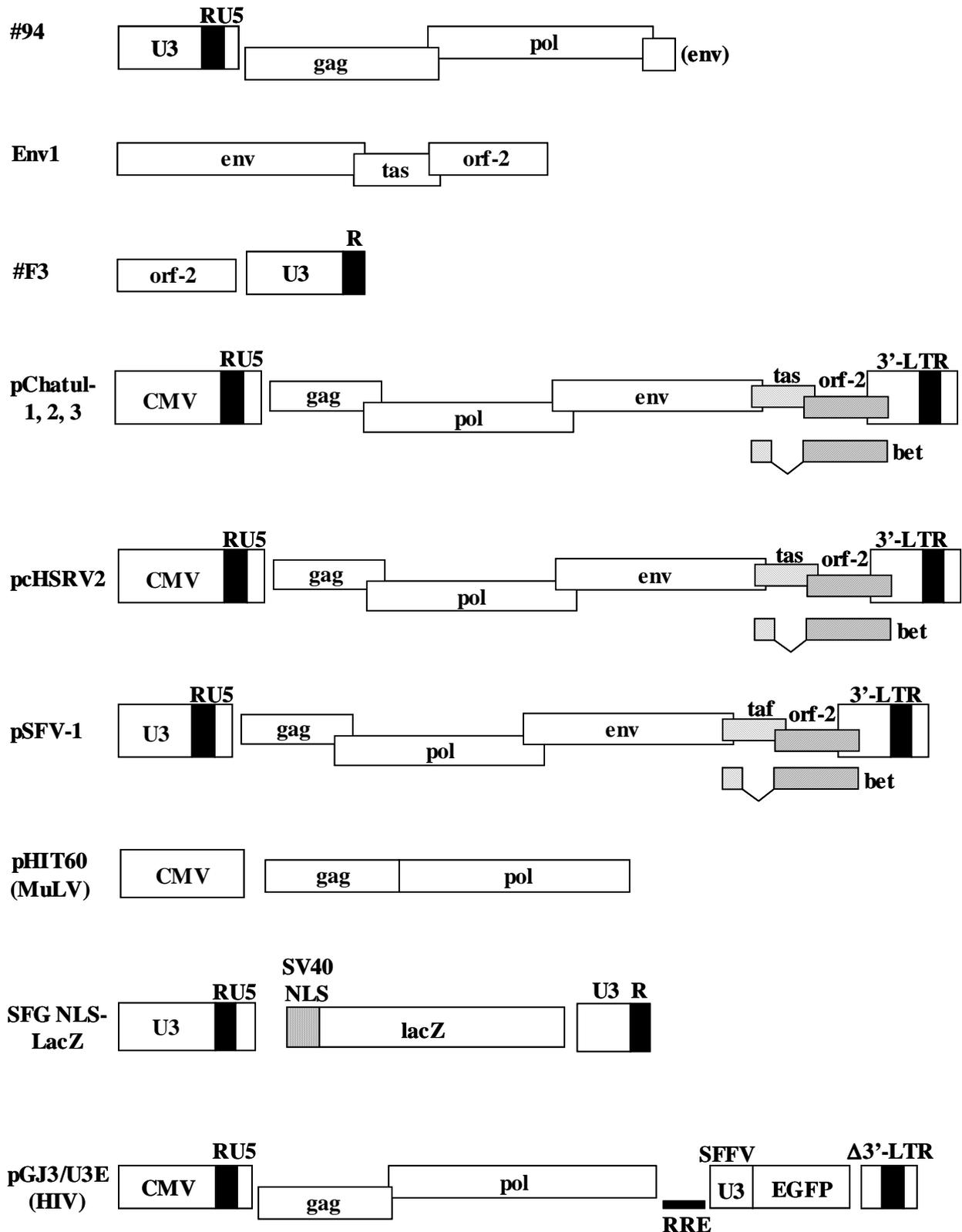
6.4. Sequenzierprimer für pChatul-2 und pChatul-3

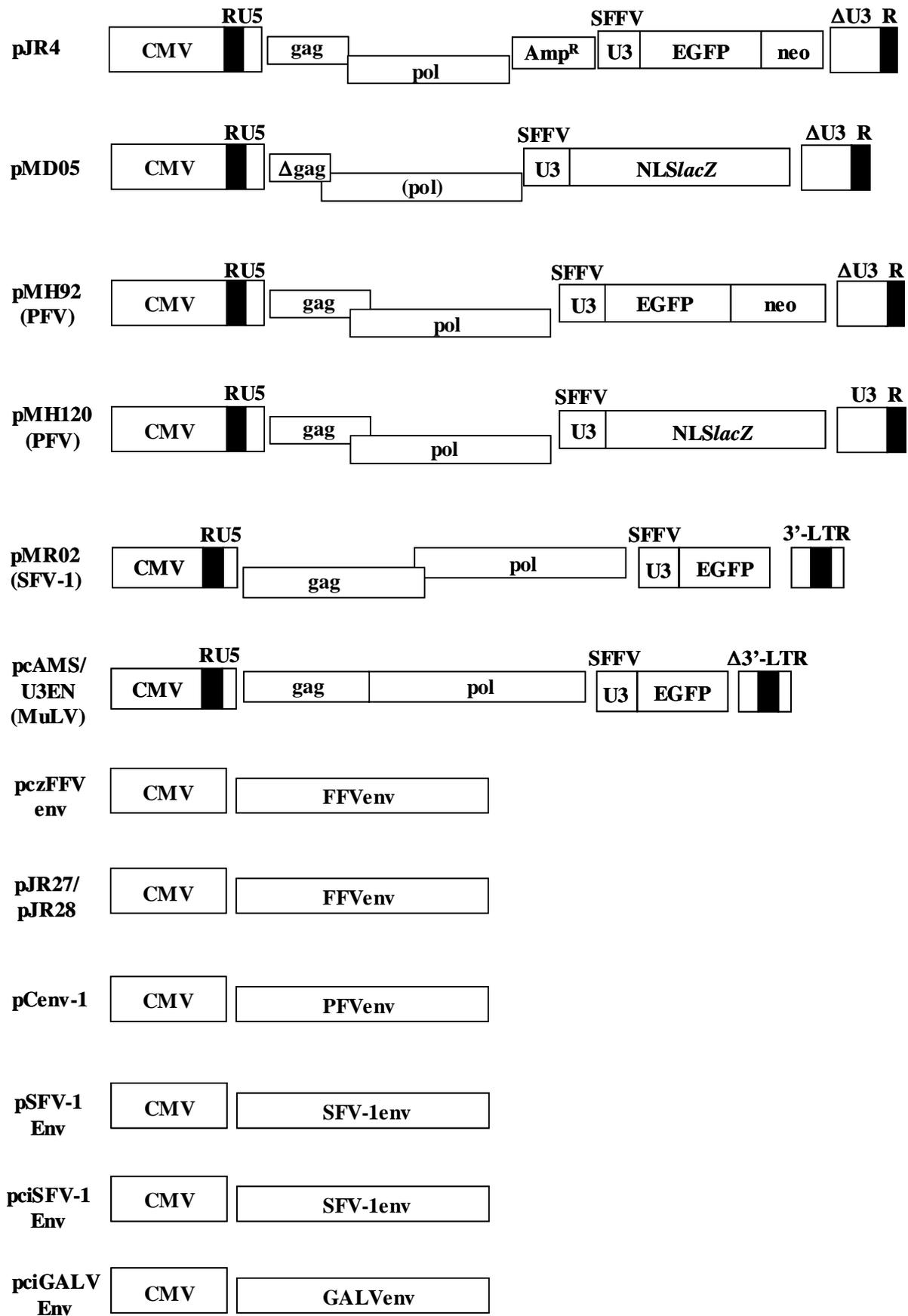
Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
#713	TGGCTTGAAGATCTACAGCCGC
#714	TCTCCGTCTGGAGGAAGAGG
#715	TGTGATGATCTTGAAGGAATGG
#716	TGGGATCCTGAGATGTTAACC
#752	TCCCAGCTCGAGTTAATCTTTACCCCCTTTC
#753	TCAGGTATGTCAAACTCGAGTCAGGATGAGTC
#754	TCTTAACCGCGGACCTGCTGAAGCCGTTGATAGT
#765	TATATTCGAGCCCCACGTTGGGCG
#784	TGAGGACTCGAGGCTCGTGAGTTAAATCCTCTC
#785	TCCCAGAATTCTTTAATCTTTACCCCC
#786	TCTACTCGAGGATCTGCTGAAGCCGTTGATAG
#787	TCACCATGGAACCTCAGGATGAGTCAACTG
#788	TGTACGGGAGCTCTTCTCACAGACTTGGC
#789	TCCCCACGTGTAGAGAAACACCACTC
#790	TCCTTGGACTGGACGCGTGAAGAAGAACTTGC
#791	TGCAAGTTCTTCTTACGCGTCCAGTCCAAGG
#792	TGGGAGCTCTAAAACCTGTACTGTTGGG
#793	TCACGTGCTGGGTTCGGTTCTAGAACCTG
#794	TGGTAAACACGTGCTTTCTATTCAGAGTC
#903	TGCTGGACTGTTTTACCACAAGGC
#923	TGGTGCTGCTAGAAATGAGATAAG
#924	TGGGGTCTTGGCTGATTTAGTTGACC
#929	TGAAAGACATGGTCCTTTTG
#930	TCACCCGTATGAGGGTAG
#931	TATGCTGGGCCTTAATATAC
#932	TACCGACGATTCGGAGACGG
#953	TGACCCGGGAGGAATGGATGGAATGGAATGCTC
#954	TGGAGCTCGAGTTAAAATCTTCTCAACCCCC
#955	TGGTAAACTCGAGCTTTCTATTCAGAGTC
#956	TCTTCTCGAGTACCTGAGGTAAGGTCC
#979	TGGACCTTACCTCAGGTAATAAAGAAG
#987	TGTGGAAACTTTGCTGCCTCTGC
#988	TTGGGCGCCAACCTGTTCGCGGC
#989	TCGAACCTTAAAGCTAGCAACCC
#990	TCGCTAGCTTGGGTAAGATTTTG
#991	TAATAGGGCCAGTAATACCG
#992	TTCACTGTGTGTAAGTGTGCGGCAGCG
#993	TGTATATTAAGGGCTAGCATAGTG

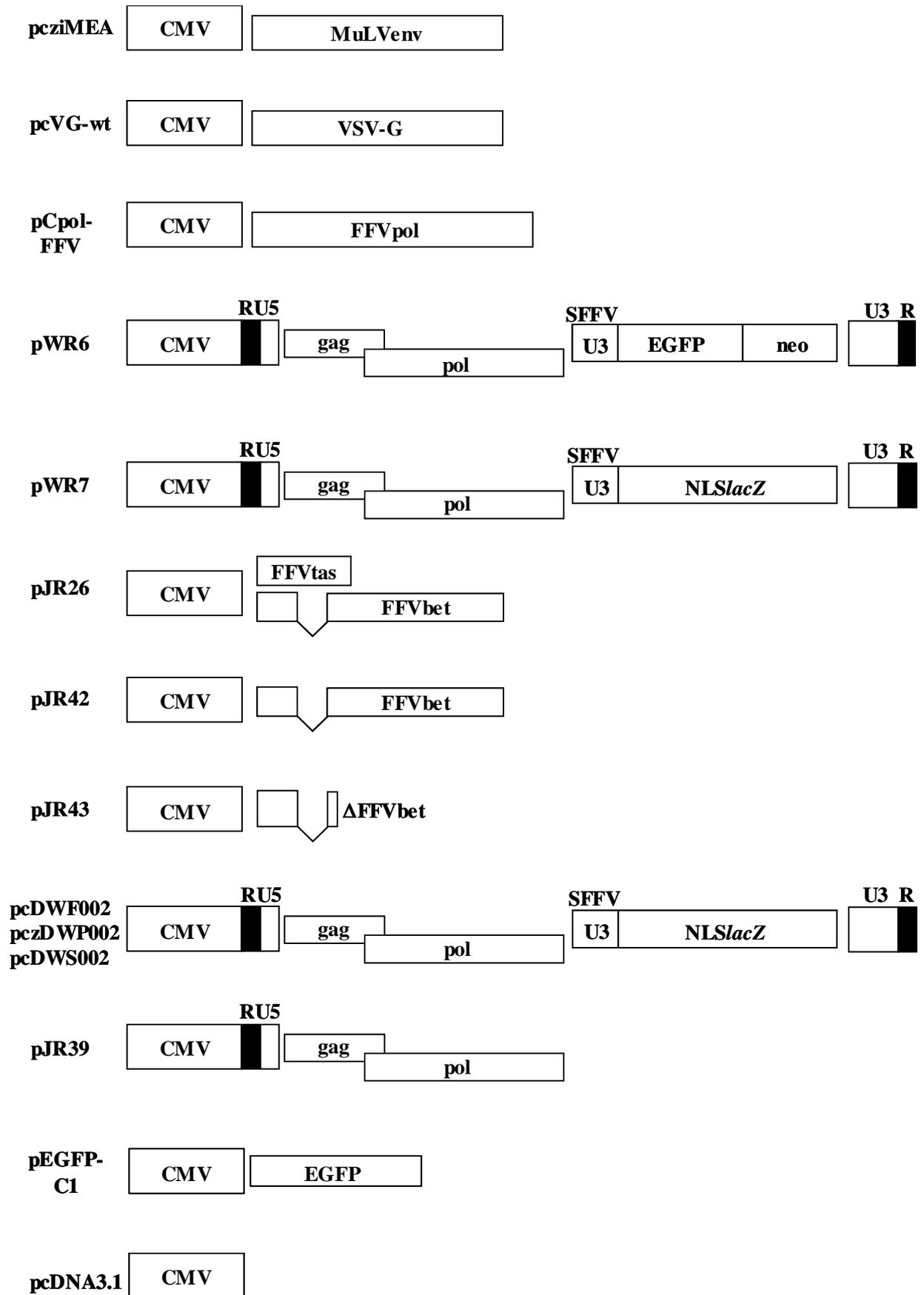
#994	TCGCTAGCAGCCTCAGCGCTACGG
#1139	TGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGC
#1140	CCTCTCGAATCTCTCCAAGCTGGAGAGTCTCAATC
#1141	GAGACTCTCCAGCTTGGAGAGATTCGAGAGGACC
#1158	TCTTCTCACAGACTTGGCTG
#1162	TCCTCTTCTCGTGACATCATCAG
#1163	TGCCTTGTGGCAAAGTTGGG
#1164	TGAATAGCCCTGGGTTGTTTACTG
#1165	TGGAAACTTTAATTACTAAACTC
#1166	TAAAGAGGGACATTTGAACG
#1167	TCAAAATAATGAAAGGTTACCTG
#1168	TCCAAGGCCACAATTAAGTTC
#1169	TTCCTCTTCCTCCAGACGGAGAC
#1170	TCTAACCCATATGGAGATGC
#1171	TGCCTCAATAAAATGCGTGGATG
#1172	TGTTGTCACTCTAATGGAAGC
#1173	TTGTGGAAATGGAAGTGGTTCAG
#1174	TCATAAAGGACACTGCTGGAGG
#1175	TGTAGTGGGCGATGTATTACAG
#1197	TCAATGGGCGGGGGTCGTTGGGC
#1198	TACTCCTTCAATAGCGGCTG
#1199	ATTGCCACTCTAGTCCATC
#1200	TGATACTGTTTCTGAGGTGTG
#1201	ATACATCATCCACATAGAC
#1202	TATCCTGTTGTATAACTAGC
#1203	ATTAATAGACCATTCCTGTTGC
#1204	TTGCCTTTATTTGCTCAATG
#1205	TTGGAATTGCAAGTCCAGTG
#1206	TACCAAGGATCCTTTAACTC
#1207	ATATATATACAAAGACCAG
#1208	ATCGTGCTGAGTCATCCACG
#1209	ATCATCCAAATTGGCTTCC
#1210	AATAGCTCCCATTCTTCAG
#1211	TCCCCAGATTCACCAGACGTG
#1212	TCAAAGTTTTTCATCATAATAC
#1213	TGACACTGATTTATATGGC
#1214	AAGAAGTATCTTTTGTCTCCTG
#1215	AAAGTGATACTTCCTGACGG
#1216	ACAGTCGAGGCTGATCAGCG

6.5. Plasmide

Es ist zu beachten, dass die Plasmidkarten nicht massstabgetreu abgebildet sind. Weitere Erläuterungen zu den Plasmiden siehe Kapitel Ergebnisse.







6.6. Erklärungen

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Molekularbiologische Charakterisierung des felineen Foamyvirus (FFV)“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre zudem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Dresden, den 06.05.2003

6.7. Lebenslauf

Persönliche Angaben

geboren 16. Januar 1975 in Osterburg (Sachsen-Anhalt)

Eltern Hans-Joachim Roy
Dagmar Roy

Ausbildung

Sept. 1981-Juli 1991 Polytechnische Oberschule in Gross Garz
Abschluss: 10. Klasse

Sept. 1991-Juli 1993 Winkelmann-Gymnasium in Seehausen (Altm.)
Abschluss: Abitur

Okt. 1993 Beginn des Biologiestudiums an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald

Feb. 1996 Diplomvorprüfungen in den Fächern Chemie, Physik,
Mikrobiologie und Zoologie

Okt. 1997 Diplomarbeit an der Albert-Ludwigs-Universität der
Universität Freiburg in Institut für Hygiene, Abt. Virologie
bei Prof. Dr. Peter Stäheli über:
„Herstellung und Charakterisierung von Expressions-
konstrukten für hocheffiziente Antigenpräsentation
im Borna Disease Virus Tiermodell“ (Note „sehr gut“)

Aug. 1998 Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie und
Molekularbiologie, Genetik und Immunologie
Abschluss mit Gesamtnote „gut“

Praktika und Auslandsaufenthalte

Juni-Sept. 1995	dreimonatiges virologisch orientiertes Praktikum am Insitut für Virologie der Universität Barcelona (Spanien)
1995-1997	Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Medizinische Mikrobiologie der EMAU Greifswald
1999-2003	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. A. Rethwilm am Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät „Carl Gustav Carus“ an der TU Dresden, Sachsen

6.8. Veröffentlichungen

Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., **Roy, J.**, Herchenröder, O. & Rethwilm, A. (2000). Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. *Embo J* 19, 3436-45.

In Vorbereitung:

Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., Gärtner, K., Bock, M., Herchenröder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M. & Rethwilm, A. (2003) Feline Foamy Virus Genome and Replication Strategy.

Roy, J., Westphal, D., Rudolph, W., Herchenröder, O., Berg, A., Rammling, M., Heinkelein, M., Lindemann, D. & Rethwilm, A. (2003) Feline Foamy Virus Particle Formation.

Kongressbeiträge:

Integration and Retrotransposition of Primate Foamy Virus Genomes. Third international Conference on Foamy Viruses. Gif-sur-Yvette, Frankreich, 1999.

Analysis of the feline foamy virus (FFV) replication strategy. Fourth international Conference on Foamy Viruses. Atlanta, USA, 2002.

Untersuchungen zur Molekularbiologie des felinen Foamyvirus (FFV). Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. 2001.

Analysis of the feline foamy virus (FFV) replication strategy. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. 2002.