

UNTERSUCHUNGEN ZUM GAG- UND POL-PROTEIN DES
PROTOTYPISCHEN FOAMYVIRUS (PFV)

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

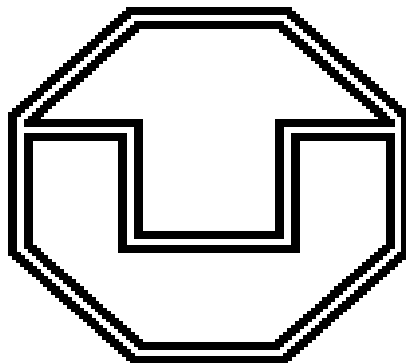
vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Marc Cartellieri

geboren am 07. November 1971 in Hanau



eingereicht am: 11.10.2005

Gutachter: Prof. Dr. Axel Rethwilm
Prof. Dr. Gerold Barth
Prof. Dr. Dieter Neumann-Haefelin

Verteidigung: 24.03.2006

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Axel Rethwilm, der die Betreuung meiner Promotion übernommen hat und die Entwicklung der Arbeit stets mit großem Interesse verfolgte. Auch über die lange Entstehungszeit hat er nie die Geduld verloren.

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

Mein herzlichster Dank gilt meinen beiden Betreuern, Herrn Dr. Ottmar Herchenröder und Herrn PD Dr. Dirk Lindmann. Herr Dr. Ottmar Herchenröder übernahm die schwierige Aufgabe, mich in die Welt der Molekularbiologie und Virologie einzuführen und hat mich im Labor in jeder erdenklichen Weise optimal unterstützt und gefördert. Nach seinem Weggang hätte ich mir keinen besseren „Ersatz“ vorstellen können als Herrn PD Dr. Dirk Lindmann, der mich während der letzten zwei Jahre intensiv betreut hat und durch viele nützliche Anregungen und Hinweise maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat.

Bei allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der „Foamy“-Arbeitsgruppen in Dresden und Würzburg sowie der „Calici“-Arbeitsgruppe in Dresden möchte ich mich für die fachliche Hilfe, die gute Stimmung, förderliche Ratschläge aber auch wohlmeinende Kritik bedanken.

Last, but not least, danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Dresden, den 30.09.2005

Marc Cartellieri

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Retroviren	7
1.1.1. Geschichte und taxonomische Einteilung	7
1.1.2. Morphologie und Genomorganisation	9
1.1.3. Die Replikation von Orthoretroviren	12
1.2. Foamyviren	14
1.2.1. Geschichte und Vorkommen	14
1.2.2. Genomorganisation und -expression	16
1.2.3. Der foamyvirale Replikationszyklus	21
1.3. Die Morphogenese retroviraler Partikel	22
1.3.1. Strategien der retroviralen Partikelmorphogenese	22
1.3.2. Funktionen des Strukturproteins Gag während der Morphogenese retroviraler Partikel	24
1.3.3. Die Morphogenese orthoretroviraler Partikel	27
1.3.4. Die Morphogenese foamyviraler Partikel	28
1.4. Fragestellung	30
1.4.1. Gag/Pol-Zusammensetzung foamyviraler Viruspartikel am Beispiel von PFV	30
1.4.2. Die Rolle des Strukturproteins von PFV bei der Morphogenese und Freisetzung von Viruspartikeln	31
2. Material & Methoden	32
2.1. Verwendete Materialien	32
2.1.1. Chemikalien	32
2.1.2. Enzyme und Reaktionspuffer	32
2.1.3. Größen- und Längenstandards	32
2.1.4. Antibiotika	33
2.1.5. Bakterienstämme	33
2.1.6. Plasmide	33
2.1.7. Oligonukleotide	38
2.1.8. Zelllinien	43
2.1.9. Antikörper/Antiseren	43
2.1.10. Kommerzielle Methodenkits	44
2.1.11. Weitere Materialien	44
2.2. Puffer und Lösungen	44
2.2.1. Bakterienkultur	44
2.2.2. Lösungen und Puffer zur Analyse und Klonierung von DNA	45
2.2.3. Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden	47
2.2.4. Medien, Lösungen und Puffer für zellbiologische Methoden	50
2.3. Molekularbiologische Methoden	52
2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.3.2. Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning-Kit	54

2.3.3. DNA-Agarosegelelektrophorese	54
2.3.4. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	55
2.3.5. Restriktionsverdau von DNA	55
2.3.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	56
2.3.7. Verdau von 3'- Überhängen mit der T4-Polymerase	56
2.3.8. Präzipitation von DNA.....	56
2.3.9. Phenol-Chloroform Extraktion von DNA.....	57
2.3.10. Ligation von linearen DNA-Fragmenten	57
2.3.11. Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	58
2.3.12. Transformation von DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien.....	58
2.3.13. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini- bzw. Midi-Präparation).....	59
2.3.14. Spektrometrische Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration	61
2.3.15. Sequenzierung von DNA	61
2.4. Zellbiologische Methoden	62
2.4.1. Kultivierung adhärenter Zelllinien.....	62
2.4.2. Transfektion.....	62
2.4.3. Herstellung von Zelllysaten.....	64
2.4.4. Indirekte Immunfluoreszenz.....	64
2.4.5. Histochemische β -Galactosidase-Färbung.....	65
2.4.6. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	65
2.5. Virologische Methoden.....	66
2.5.1. Vektorsysteme für die Analyse von PFV Gag	66
2.5.2. Produktion zellfreier virushaltiger Überstände.....	68
2.5.3. Präparation von intrazellulären Viruspartikeln nach der „Freeze-Thaw“- Methode	68
2.5.4. Quantitative Bestimmung des Virustiters	69
2.5.5. Viruspartikelpräparation aus Zellkulturüberständen	70
2.5.6. Aufkonzentration von Viruspartikeln in einem kontinuierlichen Dichte- gradienten	71
2.5.7. Fixierung tranzfizierter Zellkulturen für die elektronenmikroskopische Analyse ...	71
2.6. Proteinchemische Methoden	72
2.6.1. Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	72
2.6.2. Western Blot.....	73
2.6.3. Quantifizierung eines Western Blots	74
2.6.4. „Stripping“ eines Western Blots.....	75
2.6.5. Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine mit C-terminalem His- Tag	75
2.6.6. Dialyse rekombinanter Proteine	77
2.6.7. Photometrische Proteinbestimmung mit der BCA-Methode	78
2.6.8. Photometrische Quantifizierung von Comassie-Blau gefärbten SDS-Gelen.....	78
3. Ergebnisse	80
3.1. Gag/Pol-Zusammensetzung foamyviraler Viruspartikel am Beispiel von PFV	80
3.1.1. Herstellung von Proteinstandards für eine Eichgerade	81
3.1.2. Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen des Immunoassays.....	84

3.1.3. Aufreinigung der PFV Virionen.....	86
3.1.4. Bestimmung des Gag/Pol-Verhältnisses im Gradientenmaterial	88
3.1.5. Ergebnisse der Gag/Pol-Bestimmung in PFV Virionen.....	90
3.2. Funktionale Charakterisierung des PFV Gag-Proteins	94
3.2.1. Herstellung und Untersuchung C-terminaler Gag-Deletionsmutanten.....	94
3.2.2. Herstellung und Untersuchung N-terminaler Gag-Deletionsmutanten.....	104
3.2.3. N-terminale Gag-Deletionen im Provirus.....	107
3.2.4. Alanin-Substitution konservierter Aminosäuren im N-Terminus von PFV Gag ..	112
3.2.5. Intrazelluläre Lokalisation der Gag-Proteine	119
3.2.6. Untersuchung von Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box.....	120
3.2.7. Untersuchung von Alanin-Substitutionsmutanten mit N-terminalem Myristilierungssignal	125
3.2.8. Untersuchung der PFV W45A-Mutation im FFV Gag-Protein.....	129
3.2.9. Elektronenmikroskopische Analyse von Gag-Mutanten	131
4. Diskussion	138
4.1. Gag/Pol-Zusammensetzung foamyviraler Viruspartikel am Beispiel von PFV	138
4.2. Funktionale Charakterisierung von PFV Gag für Morphogenese und Freisetzung von Viruspartikeln.....	146
5. Zusammenfassung.....	162
6. Literaturverzeichnis	165
7. Anhang	183
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	183
7.2. Tabellenverzeichnis.....	185
7.3. Abkürzungsverzeichnis.....	186
7.4. Erklärung	188
7.5. Lebenslauf.....	189
7.6. Publikationsliste	190

1. EINLEITUNG

1.1. RETROVIREN

Die Familie der Retroviren verdankt ihren Namen einer Besonderheit ihres Replikationszyklus. Bis in die 60er Jahre des letzten Jahrhunderts galt in der Biologie das zentrale Dogma des unidirektionalen genetischen Informationsflusses von DNA auf RNA und weiter auf die Aminosäureabfolge der Proteine. Doch dann entdeckten Wissenschaftler Ende der 60er Jahre bei einer Gruppe onkogener RNA-Viren ein Enzym, welches RNA in DNA umschreiben konnte und somit eine Umkehrung des genetischen Informationsflusses bewerkstelligte (Baltimore 1970, Temin und Mizutani 1970). Die Wissenschaftler Howard Temin und David Baltimore wurden für diese Entdeckung mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet. Die Virusgruppe mit dem Reverse Transkriptase (RT) genannten Enzym wurde nach diesem Charakteristikum als Retroviren benannt. Die retrograde Umschreibung des eigenen Genoms von RNA in DNA kann also zurecht als das Hauptmerkmal der Retroviren bezeichnet werden, auch wenn später RT-Aktivitäten bei den Hepadnaviren (Summers und Mason 1982) und als Teilfunktion des zellulären Ribonukleoproteins Telomerase (Zakian 1995) beschrieben wurden. Das zweite charakteristische Merkmal der Retroviren ist die obligate Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle durch das viruseigene Enzym Integrase (Vogt 1997a).

In das breite Licht der Öffentlichkeit gerieten die Retroviren erst im Zuge der Entdeckung des erworbenen Immunschwächesyndroms AIDS (engl.: acquired immunodeficiency syndrom) und seines Auslösers, des „Human Immunodeficiency Virus“ (HIV, Barré-Sinoussi et al. 1983, Gallo et al. 1984, Coffin et al. 1986). Seitdem hat die Erforschung dieser Virusgruppe große Aufmerksamkeit erfahren.

1.1.1. Geschichte und taxonomische Einteilung

Die aktuelle taxonomische Einteilung unterscheidet innerhalb der Familie der Retroviren zwei Unterfamilien, die der *Orthoretrovirinae* und die der *Spumaretrovirinae*. Die Unterfamilie der Orthoretroviren besteht aus sechs Genera, während die Unterfamilie der Spumaviren nur ein Genus, die Foamyviren, umfasst. In Tabelle 1 sind zu jedem Genus die charakteristischen Vertreter aufgelistet. Nach der Struktur des Genoms unterscheidet man zwischen einfachen Retroviren (Alpha-, Beta- und Gammaretroviren), deren Genom nur für die Strukturproteine Gag und Env sowie die viralen Enzyme des *pro*- und *pol*-Gens kodiert. Die Genome der

Tab. 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren (nach Rethwilm 2003, verändert).

Subfamilie	Genus	Wichtigste Vertreter	Genom	Virusmorphologie
Orthoretroviren	α -Retroviren	Rous Sarcoma Virus (RSV) Avian Leukosis Virus (ALV)	einfach	Zentral liegende, sphärische Kapside „C-Partikel“
	β -Retroviren	Mouse-Mammary-Tumor-Virus (MMTV) Mason-Pfizer Monkey Virus (M-PMV)	einfach	Exzentrisch liegende, sphärische Kapside „B-Partikel“ (MMTV) Zylindrische Kapside „D-Partikel“ (M-PMV)
	χ -Retroviren	Murine Leukemia Viruses (MLVs) Feline Leukemia Viruses (FeLVs)	einfach	Zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	δ -Retroviren	Human T-Cell Leukemia Virus 1 und 2 (HTLV-1 und 2) Bovine Leukemia Virus (BLV)	komplex	Zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	ϵ -Retroviren	Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus (WDSV)	komplex	Zentral liegende, sphärische Kapside, „C-Partikel“
	Lentiviren	Human Immunodeficiency Virus 1 und 2 (HIV-1 und 2) Simian Immunodeficiency Viruses (SIVs)	komplex	Konusförmige Kapside
Spumaretroviren	Foamyviren	Prototypic Foamy Virus (PFV) Feline Foamy Virus (FFV)	komplex	Zentral liegende, sphärische Kapside

komplexen Retroviren verfügen zusätzlich über akzessorische Gene, die regulatorische Funktionen erfüllen (nach Vogt 1997c). Morphologisch wurden die Retroviren früher nach der Gestalt und Genese ihrer Viruspartikel eingeteilt, wie man sie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifizieren konnte (Tab. 1, vgl. Kapitel 1.3.1).

Die Entdeckung vieler Retroviren geht auf ihre tumorindizierenden Fähigkeiten in den Wirtszellen zurück. So wurden als erste Retroviren zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts das „Rous Sarkoma Virus“ (RSV) und das „Avian Leukosis Virus“ (ALV) als infektiöse, filtrierbare Agenzien aus Tumorerkrankungen von Vögeln beschrieben (Ellermann und Bang 1908, Rous 1911, nach Vogt 1997a). Mit der Entdeckung des ersten tumorindizierenden Retrovirus „Human T-Cell Leukemia Virus“ (HTLV) beim Menschen begann die humane Retrovirologie (Poiesz et al. 1980). Als weitere pathogene Vertreter der Retroviren verursachen viele Vertreter der Lentiviren inflammatorische und degenerative Erkrankungen (Übersicht in Rosenberg und Jolicoeur 1997). Der bekannteste Vertreter dürfte das bereits erwähnte HI-Virus als Erreger von AIDS beim Menschen sein. Heute geht man davon aus, dass neben den bekannten retroviralen Krankheitserregern bislang nicht entdeckte Retroviren direkt oder indirekt mit humanen Erkrankungen in Zusammenhang stehen, die bisher als Autoimmunerkrankungen klassifiziert sind (Chermann 2001). Neben

dem pathogenen Potential macht die Fähigkeit von Retroviren, in Zielzellen zu integrieren, sie aber auch zu einem Werkzeug bei der Entwicklung von Vektorsystemen zur Gentherapie (u.a. Temin 1989, Gilboa 1990).

1.1.2. Morphologie und Genomorganisation

Retroviren sind sphärische Proteinpartikel mit einer Größe von 80 - 120 nm, die von einer Lipidmembran umhüllt werden (Abb. 1A, Übersicht in Vogt 1997b). Die Lipidmembran erhält das Virion bei der Knospung durch die Zytoplasmamembran, in ihr verankert befindet sich das virale Hüllprotein (Env). Das Innere des Partikels besteht aus dem Kapsid, einer sphärisch oder konisch geformten elektronendichten Proteinhülle, die aus Monomeren des Kapsidproteins (CA) besteht. Als Virusgenom enthält das Kapsid zwei identische Moleküle einzelsträngiger (+)-Strang RNA. Die genomische RNA wird von Nukleokapsidproteinen (NC) stabilisiert. Als weitere virale Komponenten befinden sich im Viruspartikel die Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Zwischen Kapsid und Lipidmembran befindet sich eine weitere Proteinhülle, die aus dem Matrixprotein (MA) gebildet wird.

Das RNA-Genom der Retroviren weist mit der 5' Cap-Struktur und der 3' Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf (Abb. 1B, Übersichten in Vogt 1997c, Modrow und Falke 2003). Die Größe des Genoms variiert zwischen etwa 7 000 Bp und 13 000 Bp. Die kleinsten Genome weisen einfache Retroviren wie z.B. das „Murine Leukemia Virus“ (MLV) auf, die größten Genome haben Spumaviren. An den 5'- und 3'-Enden befindet sich jeweils eine redundante Region (R) von 15 bis 240 Nukleotiden, darauf folgen für die 5'- und 3'-Enden spezifische Abschnitte, die als U5- und U3-Regionen bezeichnet werden (engl.: U = unique). Die U5-Region enthält bei vielen Retroviren spezifische Erkennungssequenzen für die Reverse Transkription und die Verpackung der genomischen mRNA in das Viruspartikel. Zwischen diesen beiden „Unique“-Regionen liegt der für die Virusproteine kodierende Genomabschnitt. Eine 18 Bp lange Sequenz im 5'-Bereich des Genoms bildet die Primer-Bindungsstelle (pbs, Abb. 1B). An diese bindet eine virusspezifische zelluläre tRNA, die als Primer zur Initiation der reversen Transkription dient. Am 3'-Ende des kodierenden Bereiches findet sich der Polypurintrakt (ppt, Abb. 1B), eine virusspezifische Folge von neun Adenosin- und Guanosinresten, der von der RT als Primer für die Initiation der DNA-Plusstrangsynthese benutzt wird.

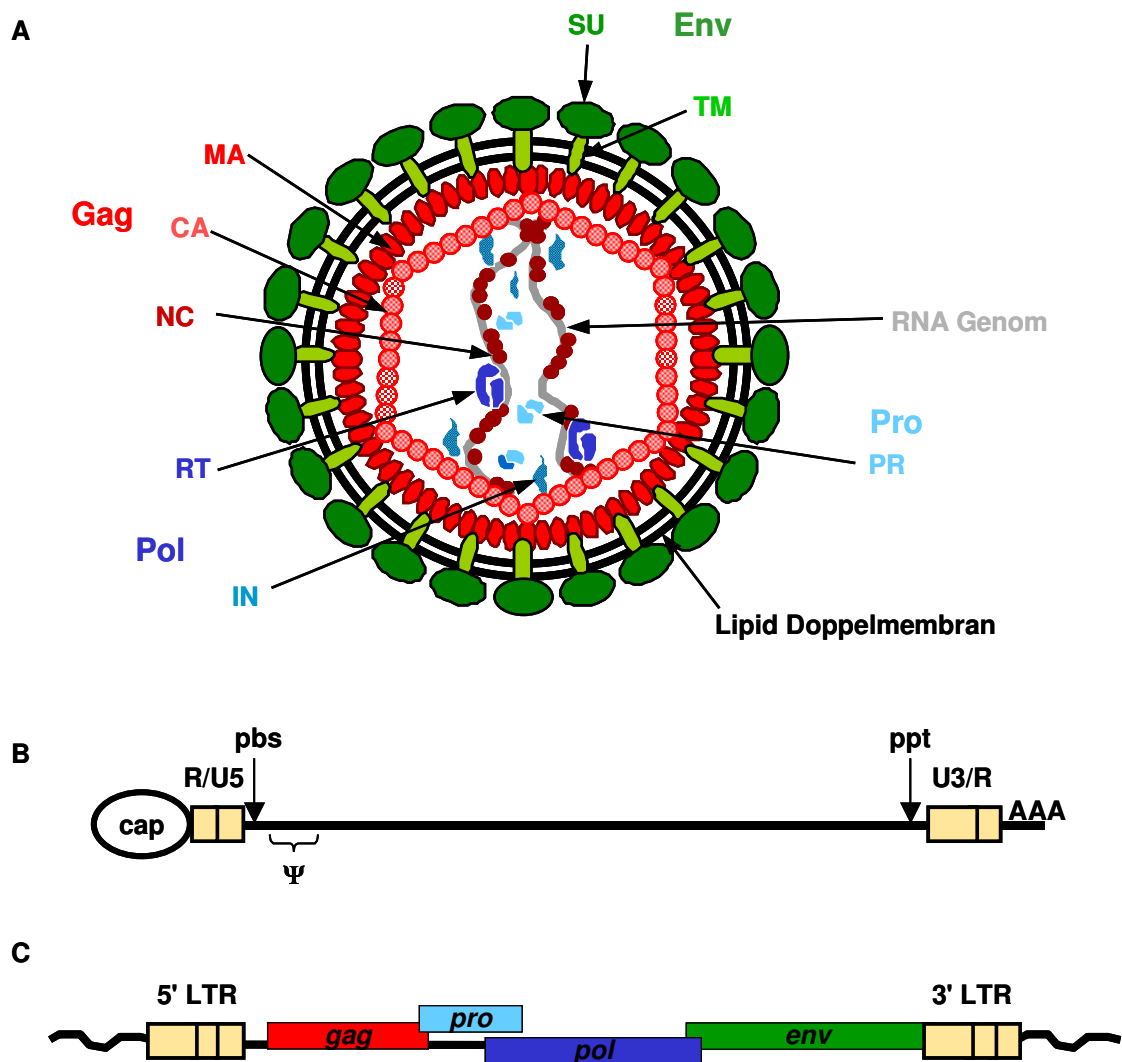


Abb. 1: Struktur und Genomorganisation von Retroviren.

(A) Schematische Darstellung eines retroviralen Virions. Die prozessierten Untereinheiten der drei kanonischen retroviralen Genprodukte Gag, Pol und Env sind farblich voneinander abgehoben. Die Farbkodierung entspricht den Darstellungen in B und C. SU: Oberflächenprotein; TM: Transmembranprotein; PR: Protease; IN: Integrase; RT: Reverse Transkriptase; MA: Matrixprotein; CA: Kapsidprotein; NC: Nukleokapsidprotein. (B) und (C) Generalisierte Darstellung der genetischen Organisation eines einfachen Retrovirus. In B ist die genomische RNA abgebildet. Für die Replikation relevante Sequenzabschnitte sind in den Bereichen des Genoms eingezeichnet, an denen sie üblicherweise zu finden sind. pbs: „Primer Binding Site“; ψ : Verpackungssignal; ppt: Polypurintrakt. In C ist das in das Wirtszellgenom integrierte Provirus abgebildet. Es wird zu beiden Seiten von den im Laufe der Reversen Transkription gebildeten „long terminal repeats“ (LTR) abgeschlossen. Voneinander unabhängige Gene, die je nach Virus in zueinander unterschiedlichen Leserastern kodiert werden, sind durch eigene Rechtecke dargestellt. Die Gene für Gag, Pro, Pol und Env treten immer in der angedeuteten Reihenfolge auf und werden von genomischen (Gag, Gag-Pro-Pol) bzw. subgenomischen (Env) mRNAs exprimiert.

Nach der Reversen Transkription liegt das Virusgenom als doppelsträngiges DNA-Molekül vor. Das in das Genom der Wirtszelle integrierte DNA-Virusgenom wird als Provirus bezeichnet (Abb. 1C, Übersicht in Vogt 1997c). Das Provirus ist von den LTR-Regionen (engl. „long terminal repeats“) flankiert, die regulatorische Sequenzen enthalten und für reverse Transkription sowie Integration essentiell sind. Im U3-Bereich sind zahlreiche

Sequenzen zur Kontrolle der Replikation und Genexpression (Promotoren und Enhancer) vorhanden. Die Bindungssignale für die Integrase befinden sich an beiden Enden des DNA-Genoms im U5- und U3-Bereich. Das Genom eines einfachen Retrovirus enthält vier offene Leseraster (ORF: engl. „open reading frame“), die für die obligaten Strukturproteine und Enzyme kodieren (Abb. 1C).

Das *gag*-Gen (Gruppenspezifisches Antigen) kodiert für das retrovirale Strukturprotein, aus dem das Viruskapsid aufgebaut wird. Als gemeinsames Vorläuferprotein wird es an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert und gelangt mit Hilfe der zellulären Transportmaschinerie zum Ort der Partikelmorphogenese. Im Laufe der Partikelreifung wird es von der viruseigenen Protease in Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidprotein prozessiert (Übersicht in Swanstrom und Wills 1997).

Der *pro*-ORF (Protease) kodiert für die virale Protease, die bei Orthoretroviren zu einem späten Zeitpunkt des Replikationszyklus die viralen Proteine Gag, Pol und in manchen Fällen auch Env prozessiert (Übersicht in Swanstrom und Wills 1997).

Das *pol*-Gen (Polymerase) enthält die genetische Information für die beiden charakteristischen Virusenzyme. Dies ist zum einen die Reverse Transkriptase, welche sowohl eine DNA-Polymerase- als auch eine RNaseH-Aktivität enthält, sowie die Integrase (Übersicht in Swanstrom und Wills 1997). Bei Orthoretroviren werden *pro*- und *pol*-ORF nicht von gespleißten mRNAs als separate Proteine translatiert, sondern immer als Gag-Pro- und/oder Gag-Pro-Pol-Fusionsproteine von einer genomischen mRNA gebildet. Je nach Virusart liegen dabei alle drei Virusgene *gag*, *pro* und *pol* entweder in einem gemeinsamen Leserahmen vor (z.B. bei WDSV, MLV), in drei getrennten Leserahmen (z.B. im Fall von MMTV, M-PMV und HTLV) oder zwei der Gene teilen sich einen gemeinsamen Leserahmen (z.B. bei HIV, RSV und ALV). Das kann ein gemeinsamer *gag-pro*-Leserahmen wie im Fall von RSV und ALV sein oder, wie bei HIV, ein gemeinsamer *pro-pol*-Leserahmen (Vogt 1997c). Je nach Lage der Leserahmen zueinander haben die Retroviren zwei Mechanismen entwickelt, welche die Synthese eines Fusionsproteins an den Ribosomen ermöglicht. Bei der Translation einer genomischen mRNA wird zunächst immer ein Gag-Protein gebildet, das im Normalfall am Stop-Kodon des *gag*-ORF terminiert wird. Bei Retroviren, deren *gag*-, *pro*- und *pol*-ORF im gleichen Leseraster liegen, kommt es jedoch in einem gewissen Prozentsatz der Translationsereignisse zu einer Unterdrückung des Stop-Kodons im *gag*-ORF und es wird statt dessen eine Aminosäure in den Peptidstrang eingebaut. Liegen *gag*- und *pro/pol*-ORF in unterschiedlichen Leserastern, erfolgt während der Translation des *gag*-ORF ein Leserasterwechsel durch die Ribosomen. In beiden Fällen läuft die Translation über das Stop-Kodon des *gag*-ORF hinaus bis zum nächsten Stop-Kodon am Ende des *pro*- oder *pol*-ORF und ein Fusionsprotein wird gebildet. Beide Vorgänge werden im wesentlichen durch die Sekundärstruktur der mRNA katalysiert (ten Dam et al. 1990). Bei Retroviren,

deren Gene *gag*, *pro* und *pol* in drei verschiedenen Leserastern angeordnet sind, muss es während der Translation entsprechend zu einem zweifachen Leserasterwechsel durch die Ribosomen kommen. Es werden ein Gag-Pro- und ein Gag-Pro-Pol-Fusionsprotein gebildet (nach Swanstrom und Wills 1997).

Das für die Rezeptorerkennung und Penetration neuer Wirtszellen zuständige retrovirale Glykoprotein wird vom *env*-Gen (engl. Envelope) kodiert. Es wird als Vorläuferprotein von einer gespleißten mRNA am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Während des Transportes durch die zellulären Kompartimente erfolgen umfangreiche Modifizierungen des Proteins, z.B. durch Glykosylierungen, sowie die Spaltung des Vorläuferproteins durch zelluläre Proteasen in Oberflächen- (SU = surface) und Transmembran-Untereinheiten (TM = transmembrane). Die über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche gelangten Glykoproteine werden in die Zytoplasmamembran eingelagert. Env-Proteine sind in oligomeren Komplexen zu drei oder vier SU-TM Heterodimeren angeordnet. Für die Oligomerisierung ist die TM-Domäne verantwortlich (Einfeld und Hunter 1991, Chan et al. 1997).

Neben den obligatorischen ORFs *gag*, *pro*, *pol* und *env* enthalten die Genome der komplexen Retroviren weitere offene Leserahmen für akzessorische Proteine. Diese können eine regulatorische Funktion auf Transkriptions- oder Translationsebene haben, durch Interaktionen mit der Wirtszelle die Immunantwort des Wirtes behindern und die Verbreitung des Virus erleichtern (Übersicht in Rabson und Graves 1997).

1.1.3. Die Replikation von Orthoretroviren

Der retrovirale Replikationszyklus beginnt mit der Anheftung eines Viruspartikels an einen zellulären Oberflächenrezeptor (Abb. 2). Die Bindung an den zellulären Rezeptor wird durch die SU-Untereinheit des Glykoproteins vermittelt. Durch die Bindung an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Glykoproteins, in deren Folge die Penetration der Wirtszelle eingeleitet wird. Die Hüllmembran des Virus verschmilzt mit der Zellmembran und das Kapsid wird in das Zytoplasma freigesetzt. Virale Partikel können jedoch auch über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden. In diesem Fall wird durch den niedrigen pH-Wert der Lysosomen das Fusionspeptid im Env-Protein aktiviert und die Virushülle verschmilzt mit der Endosomenmembran, wodurch das Kapsid ebenfalls in das Zytoplasma gelangt (Übersicht in Hunter 1997). Im Cytoplasma zerfällt das nackte Kapsid und gibt das virale RNA-Genom frei, das nun durch die virale RT in DNA umgeschrieben wird. Bei diesem recht komplexen Vorgang kommt es zu einem zweifachen Wechsel der

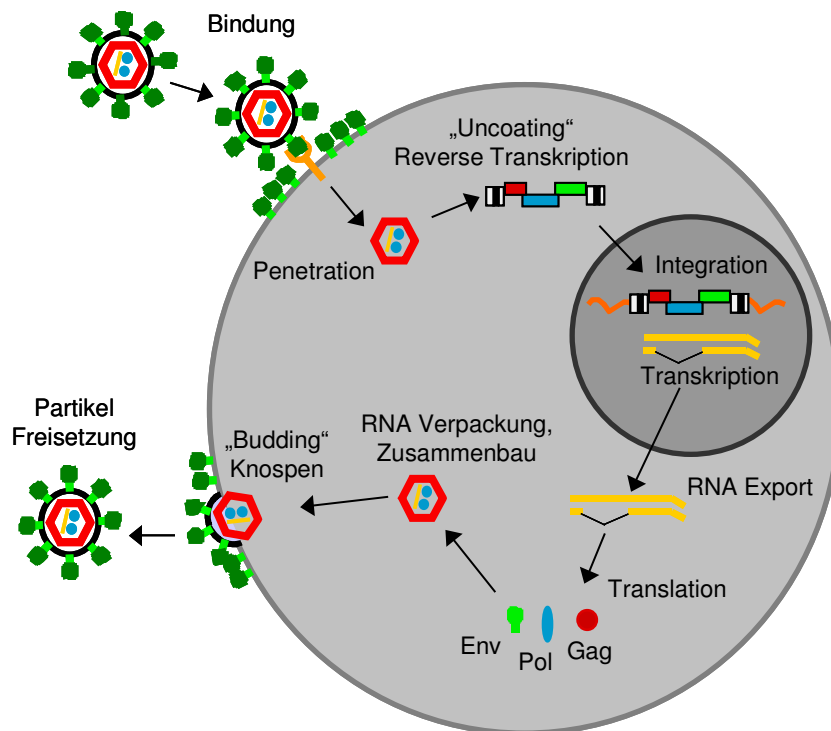


Abb. 2: Retroviraler Replikationszyklus.

Die Farbkodierung der retroviralen Proteine entspricht der aus Abb. 1.

Matrize durch die RT und einer Hydrolyse der RNA im RNA/DNA-Hybrid durch die RNaseH-Aktivität der RT, so dass am Ende eine doppelsträngige DNA vorliegt (Modrow und Falke 2003). An die DNA assoziiert sind neben der Integrase weitere virale und zelluläre Proteine. Sie bilden zusammen den Präintegrationskomplex, der nun in den Nukleus transportiert wird und dort die Integration des Provirus in das Wirtszellgenom vermittelt (Übersicht in Brown 1997). In Bezug auf die Replikation der Retroviren erfüllt die Integration in das Genom der Wirtszelle eine Doppelfunktion. Zum einen wird sichergestellt, dass das Provirus auch in sich teilenden Zellen nicht verloren geht und statt dessen auf genetischem Wege bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Zum anderen ist das Provirus als regulärer Bestandteil der zellulären DNA der Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle zugänglich, so dass diese zur Expression genutzt werden kann. Dazu sind allerdings eine Reihe cis-aktiver Sequenzen nötig, die sich vor allem in den LTR-Regionen befinden. Die Transkription des Provirus beginnt nach dem Promotor in der U3-Region des 5' LTR und verläuft bis zum Polyadenylierungssignal in der R-Region des 3' LTR. Die viralen RNAs werden wie zelluläre mRNAs mit einer 5' Cap-Struktur versehen, gegebenenfalls gespleißt und in das Zytoplasma transportiert. Dort werden die Genprodukte translatiert und anschließend im Laufe eines komplexen Morphogeneseprozesses zu Viruspartikeln zusammengefügt. Auf diesen Teil des Replikationszyklus wird in Kapitel 1.3 noch ausführlicher eingegangen. Die Knospung der fertigen Partikel erfolgt an einer zellulären

Membran. Bei diesem Vorgang erhält das Viruspartikel seine äußere Lipidmembran mit den inserierten Env-Proteinen. Nach Freisetzung aus der Wirtszelle kommt es meist noch zu einer Umlagerung der Proteinstruktur im Virion, die durch die Prozessierung vor allem des Gag-Vorläuferproteins durch die virale Protease ausgelöst wird. Dieser Vorgang wird als „Reifung“ beschrieben. Erst durch ihn erhält das Virion seine endgültige morphologische Gestalt und seinen infektiösen Charakter.

1.2. FOAMYVIREN

1.2.1. Geschichte und Vorkommen

Die zweite Unterfamilie innerhalb der Retroviren, die Spuma- oder Foamyviren (FV), weisen in ihrem Replikationszyklus viele Abweichungen und Besonderheiten im Vergleich zu den Vertretern der Orthoretroviren auf. Die ersten Vertreter dieser Gruppe wurden Mitte der 50er Jahre aus Zellkulturen isoliert (Enders und Peebles 1954, Rustigian et al. 1955). Ein Spumavirus wurde auch als erstes Retrovirus 1971 aus menschlichem Gewebe isoliert (Achong et al. 1971). Dieses früher HFV (Humanes Foamyvirus), heute PFV (Prototypisches Foamyvirus) genannte Isolat stammt aus dem Nasopharynx-Karzinom eines kenianischen Patienten und galt bis zur Entdeckung von HTLV als erster Hinweis, dass Retroviren auch im Menschen Tumore verursachen können. Neuere seroepidemiologische Studien haben allerdings gezeigt, dass der Mensch kein natürlicher Wirt für Foamyviren ist (Ali et al. 1996, Schweizer et al. 1995, Heneine et al. 2003). Sequenzanalysen haben überdies die hohe Übereinstimmung des ursprünglichen PFV-Isolates mit verschiedenen Isolaten aus dem Schimpansen gezeigt (Herchenröder et al. 1994, 1995, Schweizer und Neumann-Haefelin 1995). So wird heute davon ausgegangen, dass es kein ursprüngliches menschliches Spumavirus gibt, sondern das damalige Isolat aufgrund einer zoonotischen Übertragung von einem Schimpansen in den Patienten gelangt war. Solche zoonotischen Übertragungen sind seitdem auch mehrmals bei Tierwärtern beobachtet worden und scheinen regelmäßig bei Angehörigen afrikanischer Jägergruppen aufzutreten (Schweizer et al. 1997, Heneine et al. 1998, Sandstrom et al. 2000, Switzer et al. 2004). Mit Ausnahme des Menschen sind bei fast allen höheren Primaten arteigene Spumaviren entdeckt worden, ebenso in vielen Affenarten der Alten wie der Neuen Welt (Tab. 2). Darüber hinaus sind auch von anderen Säugetierfamilien Spumaviren beschrieben worden (Tab. 2). Im natürlichen Wirt etablieren Foamyviren trotz hoher Antikörpertiter persistierende Infektionen, die allerdings ohne erkennbare pathologische Folgen bleiben. Es konnte bisher noch keine Krankheit mit foamyviralen Infektionen in Mensch und Tier assoziiert werden (Meiering und Linial 2001, Heneine et al. 2003). Die benigne Natur der Foamyviren bei natürlichen Infektionen steht im

Tab. 2: Foamyvirus-Isolate und ihre Wirte (nach Meiering und Linial 2001, Falcone et al. 2003).

Art	Virusisolat*	Referenz
<u>Höhere Primaten (<i>Hominoidae</i>):</u>		
(Mensch (<i>Homo sapiens</i>))**	PFV (SFV _{cpz(hu)} , HFV)	Achong et al. 1971
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	SFV _{cpz}	Rogers et al. 1967, Hooks et al. 1972, Herchenröder et al. 1994,
Orang-Utan (<i>Pongo pymaeus</i>)	SFV _{ora}	McClure et al. 1994
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	SFV _{gor} (SFV _{gg})	Bieniasz et al. 1995
<u>Altweltaffen (<i>Catarrhini</i>):</u>		
Rundgesichtsmakkake (<i>Macaca cyclopsis</i>),	SFV _{mac}	Johnston 1961
Javaneraffe (<i>Macaca fascicularis</i>)	SFV _{mac}	Johnston 1961
Afrik. Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	SFV _{agm}	Stiles et al. 1964
Steppenpavian (<i>Papio cynocephalus</i>)	SFV _{bab}	Rhodes-Feuillette et al. 1979
<u>Neuweltaffen (<i>Platyrrhini</i>)::</u>		
Totenkopfaaffe (<i>Saimiri sciureus</i>)	SFV _{squ}	Johnston 1971
Klammeraffe (<i>Ateles spec.</i>)	SFV _{spm}	Hooks et al. 1973
Kapuzineraffe (<i>Cebus spec.</i>)	SFV _{cap}	Hooks und Gibbs 1975
Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)	SFV _{mar}	Marczynska et al. 1981
<u>Lemuren (<i>Lemuriformes</i>):</u>		
Riesengalago (<i>Otolemur crassi-caudatus ssp.</i>)	SFV _{gal}	Johnston 1971
<u>andere Säuger:</u>		
Katze (<i>Felix domestica</i>)	FFV	Riggs et al. 1969
Rind (<i>Bos taurus</i>)	BFV (BSV)	Malmquist et al. 1969
Pferd (<i>Equus caballus</i>)	EFV	Tobaly-Tapiero et al. 2000

* angepasste Nomenklatur nach Meiering und Linial 2001, in Klammern weitere gebräuchliche Bezeichnungen.

** kein natürlicher Wirt, zoonotische Übertragung, vgl. Text.

scharfen Kontrast zu der *in vitro* beobachteten Zytopathogenität (Hill et al. 1999). Diese ist durch das Auftreten großer, vielkerniger, vakuolisierter Zellverbände (Synzytien) charakterisiert und war letztendlich ausschlaggebend für die Benennung der Virusgruppe (foamy (engl.) = schäumend, schaumig; Spuma (lat.) = Schaum). Gerade wegen des apathogenen Infektionsverlaufs, ihres breiten Wirts- und Gewebsspektrums, der Möglichkeit zur Persistenz trotz Anwesenheit neutralisierender Antikörper sowie ihrer Genomgröße ist die Familie der Foamyviren interessant für die Entwicklung retroviraler Vektoren mit Einsatzmöglichkeiten in der somatischen Gentherapie (Hill et al. 1999, Mergia und Heinkelein 2003). Infolgedessen hat diese Gruppe der Retroviren in den letzten Jahren zunehmend mehr Aufmerksamkeit auf sich gezogen, was zur Entdeckung zahlreicher molekularbiologischer Besonderheiten geführt hat.

In den folgenden zwei Kapiteln sollen die charakteristischen Eigenschaften der Foamyviren kurz umrissen werden. Stellvertretend für die gesamte Gruppe werden sich dabei die Ausführungen auf das prototypische Foamyvirus (PFV) konzentrieren, da dieses Isolat bislang molekularbiologisch am besten charakterisiert ist.

1.2.2. Genomorganisation und -expression

Der Genomaufbau der Foamyviren charakterisiert sie als typische Vertreter der komplexen Retroviren, die neben den *gag*-, *pol*- und *env*-Genen am 3'-Ende noch über weitere akzessorische Leseraster verfügen (Abb. 3). Das Genom von PFV gehört mit einer Proviruslänge von 13,25 kB und einer Länge der genomischen RNA von 11,68 kB zu den längsten retroviralen Genomen. Einmalig innerhalb der Retroviren ist das Vorhandensein eines zusätzlichen internen Promotors (IP) im 3'-Bereich des *env*-Gens neben dem U3-Promotor in der LTR-Region (Löchelt et al. 1993). Beide Promotoren werden vom viralen Transaktivator (Tas) reguliert. Während der LTR Promotor/Enhancer ohne Anwesenheit von Tas stumm ist (Baunach et al. 1993, Keller et al. 1991), hat der interne Promotor eine schwache Basalaktivität (Yang et al. 1997), die zur Bildung kurzer subgenomischer mRNAs und zur Translation von Tas und Bet führt (Abb. 3). Zunächst stimuliert Tas den internen Promotor, was zur verstärkten Bildung von Tas und Bet führt. Ab einer bestimmten Konzentration wird auch der LTR Promotor/Enhancer aktiviert, so dass nun auch genomische und einfach gespleißte mRNAs transkribiert werden, die zur zellulären Expression von Gag, Pol und Env führen (Abb. 3, nach Löchelt 2003).

Eine weitere Einmaligkeit innerhalb der Retroviren stellt die Gag-unabhängige Translation des Pro/Pol-Proteins dar. Während das Pro/Pol-Polyprotein bei allen anderen Retroviren als Gag-Fusionsprotein gebildet wird (Kapitel 1.1.2.), findet sich bei Foamyviren eine eigene gespleißte mRNA, die zur Synthese von Pol genutzt wird (PFV: Enssle et al. 1996, Jordan et al. 1996, FFV: Bodem et al. 1996,). In dieser Hinsicht erinnern die Foamyviren an die Hepadnaviren, die ihre Polymerase (P-Protein) ebenfalls unabhängig von ihrem Strukturprotein (Core-Protein) bilden (Ganem und Schneider 2001). Als Folge dieser Gag unabhängigen Pol-Expression entfällt der Kontrollmechanismus auf Translationsebene, der bei den Orthoretroviren das Mengenverhältnis zwischen synthetisierten Gag- und Pol-Protein reguliert.

Das Gag-Protein

Das FV Gag-Protein wird wie bei Orthoretroviren von einer ungespleißten genomischen RNA gebildet. Im Detail werden die Eigenschaften orthoretroviraler und foamyviraler Gag-Proteine in Kapitel 1.3. besprochen, an dieser Stelle sei vorab auf die deutlichsten Unterschiede hingewiesen.

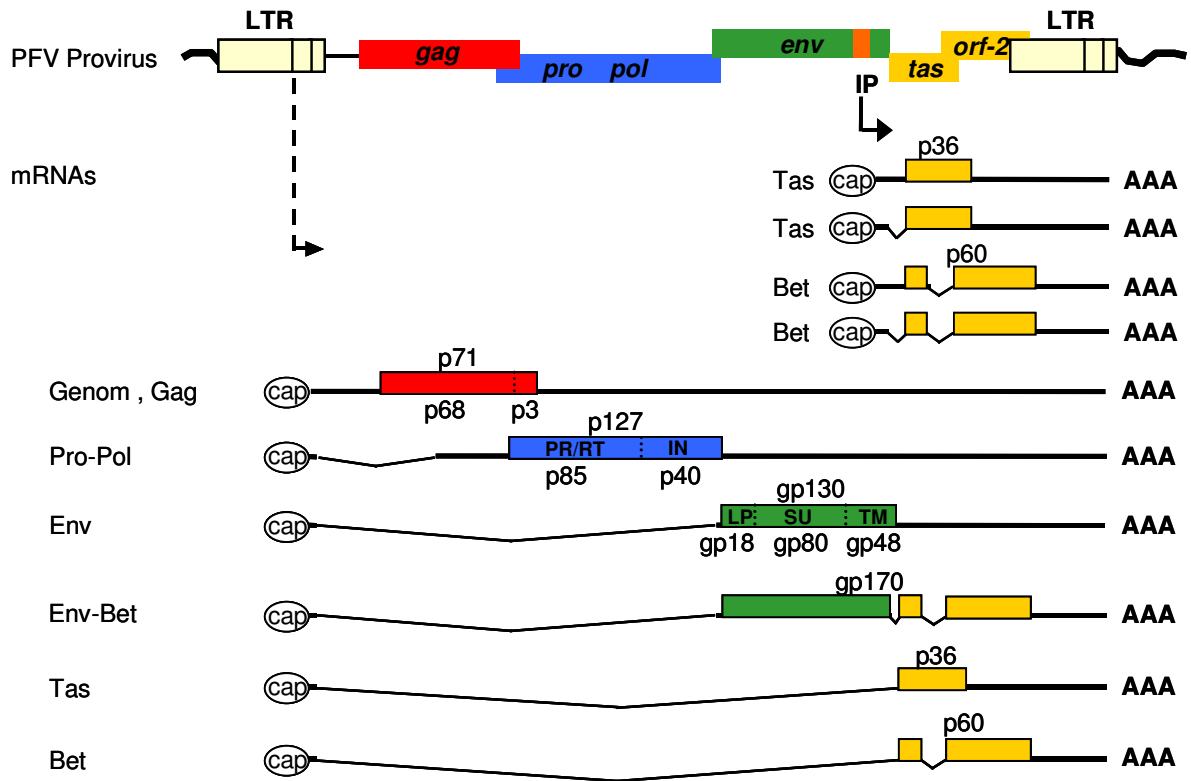


Abb. 3: Genom und Genexpression von PFV.

Genetische Organisation eines integrierten PFV Provirus. Zu beiden Seiten ist das Genom von den im Laufe der Reversen Transkription gebildeten „long terminal repeats“ (LTRs) eingeschlossen. Die viralen Gene sind durch Rechtecke dargestellt. Neben dem LTR Promotor enthält das PFV Genom einen internen Promotor (IP) im 3'-Bereich des *env*-Gens. Beide Promotoren werden vom viralen Transaktivator (Tas) stimuliert. Die verschiedenen Transkripte werden polyadenyliert, mit einer Cap-Struktur versehen und zum Teil mehrfach gespleißt. Die von den jeweiligen mRNAs exprimierten Proteine sind durch Rechtecke angedeutet. Die Molekulargewichte der Vorläuferproteine bzw. der unterschiedlichen Spaltprodukte sind angegeben. PR/RT: Protease/Reverse Transkriptase mit RNaseH-Funktion; IN: Integrase; LP: Leader-Peptid; SU: Surface-Untereinheit; TM: Transmembrane-Untereinheit.

Während alle retroviralen Gag-Proteine über sogenannte Cys-His Boxen in den NC-Domänen verfügen, welche an der Erkennung des Verpackungssignals auf der genomischen RNA beteiligt sind (Berkowitz et al. 1996), fehlen den Foamyviren diese Proteindomänen. Statt dessen hat man bei PFV drei Glyzin-Arginin-reiche Proteinabschnitte identifiziert (GR-Boxen I – III, Schliephake und Rethwilm 1994). Mutationsanalysen konnten zeigen, dass die GRI-Box zuständig für die Bindung von Nukleinsäuren ist (Yu et al. 1996), die GRII-Box dagegen ein Kernlokalisierungssignal enthält, das eine temporäre Konzentration des Proteins im Nukleus während des Infektionszyklus bewirkt (Schliephake und Rethwilm 1994, Yu et al. 1996). Die Bedeutung der transienten Kernlokalisierung der Gag-Proteine ist bisher nicht bekannt. Die Fähigkeit des FV Gag-Proteins, über die GR-Boxen sowohl RNA als auch DNA binden zu können, erinnert an das Core-Protein der Hepadnaviren, welches über spezifische Arginine an seinem C-Terminus ebenfalls RNA und DNA binden kann (Hatton et

al. 1992, Nassal 1992). Ein anderer, innerhalb der orthoretroviralen Gag-Proteine hoch konservierter Aminosäureabschnitt ist die „Major homology region“ (MHR), die etwa 20 Aminosäuren umfasst und in der C-terminalen Hälfte des CA-Proteins gefunden wird (Wills und Craven 1991). Die experimentellen Befunde an verschiedenen Orthoretroviren zur Funktion dieser Region widersprechen sich, so dass zur Rolle dieses Aminosäureabschnittes keine eindeutige Aussage möglich ist (Swanstrom und Wills 1997). Den foamyviralen Gag-Proteinen fehlt ein solcher homologer Bereich (Maurer et al. 1988, Renne et al. 1992).

Das Strukturprotein der Foamyviren wird auch nicht in Matrix-, Nukleokapsid- und Kapsiduntereinheiten gespalten, sondern es findet primär nur die Abspaltung eines kurzen C-terminalen Abschnittes ($p3^{\text{Gag}}$ im Fall von PFV) durch die virale Protease statt (Giron et al. 1997, Pfrepper et al. 1999). Eine gesonderte Funktion für das C-terminale $p3$ -Protein konnte bisher noch nicht festgestellt werden, dennoch ist die Prozessierung von Gag essentiell für die Virusreplikation (Konvalinka et al. 1995, Enssle et al. 1997, Zemba et al. 1998). Das Vorläuferprotein $p71^{\text{Gag}}$ und die prozessierte Form $p68^{\text{Gag}}$ lassen sich beide im Gegensatz zum $p3^{\text{Gag}}$ -Prozessierungsprodukt in Viruspartikeln nachweisen (Giron et al. 1997, Morozov et al. 1997).

Das Pol-Protein

Wie bereits erwähnt wird das PFV Pro-Pol-Protein unabhängig von Gag als 127 kDa Vorläuferprotein ($p127^{\text{Pol}}$) gebildet. Die Protease spaltet autokatalytisch das Vorläuferprotein in zwei Untereinheiten, ein 85 kDa großes Teilprotein ($p85^{\text{PR/RT}}$), welches Protease, Reverse Transkriptase und RNaseH umfasst, und die 40 kDa große Integraseuntereinheit ($p40^{\text{IN}}$, Netzer et al. 1990, Pfrepper et al. 1999). Eine eigene, von der Polymerase abgespaltene Protease konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Als eine weitere Besonderheit der Foamyviren bilden Protease und Reverse Transkriptase demnach wahrscheinlich eine bifunktionale Enzymbereinheit (Flügel und Pfrepper 2003). Der Zeitpunkt der autokatalytischen Prozessierung ist nicht bekannt, doch kann vermutet werden, dass es während oder nach der Morphogenese der intrazellulären Kapside zur Prozessierung kommt. Eine aktive virale Protease ist zur Bildung infektiöser Partikel notwendig (Konvalinka et al. 1995).

Das Env-Protein

Das Glykoprotein der Foamyviren wird als 988 Aa langes Vorläuferprotein ($gp130^{\text{Env}}$) von einer einfach gespleißten mRNA am rER synthetisiert und nimmt anfänglich eine Membrankonformation vom Typ III ein, bei der N- und C-Terminus in das Zytoplasma reichen. Es unterliegt einer umfangreichen N-Glykosylierung, bei der fast alle potentiellen N-Glykosylierungsstellen mit Ausnahme von einer modifiziert werden (Lüftenegger et al. 2005). Während eines späten Zeitpunktes des Transportes zur Oberfläche wird das Vorläuferprotein

posttranslational von einer zellulären Furin-ähnlichen Protease in drei Untereinheiten prozessiert (Duda et al. 2004, Geiselhart et al. 2004). Das N-terminale Prozessierungsprodukt erfüllt nicht nur die klassische Funktion eines Signalpeptides wie bei den Glykoproteinen der Orthoretroviren, sondern hat auch eine essentielle Funktion bei der Knospung der foamyviralen Partikel (Pietschmann et al. 1999). Es wird deshalb auch nicht als Signalpeptid, sondern als „Leader“-Peptid (LP: engl. *leader peptide*) bezeichnet. Sein zytoplasmatischer Anteil trägt ein konserviertes Sequenzmotiv WXXW, welches mit dem Gag-Protein während der Partikelmorphogenese interagiert (Lindemann et al. 2001, Wilk et al. 2001a). Das Signalpeptid wird an drei Stellen N-glykosyliert und umfangreich ubiquitiniert. Im Viruspartikel lassen sich hauptsächlich drei modifizierte Varianten nachweisen (gp18^{LP}, gp28^{LP}, gp38^{LP}). Die Transmembranuntereinheit (TM, gp48TM) am C-Terminus hat eine Typ I-Konformation, an seine extrazelluläre Domänen bindet die Oberflächenuntereinheit (SU, gp80^{SU}). Die sehr kurze zytoplasmatische Domäne der TM-Untereinheit des PFV Env-Proteins enthält ein Dilysin-Motiv, das als „ER-retrieval-signal“ wirkt und den Transport des PFV Hüllproteins an die Zelloberfläche einschränkt (Goepfert et al. 1995, 1997). Dieses Signal ist auch mitverantwortlich, dass PFV Viruspartikel hauptsächlich an intrazytoplasmatischen Membranen knospen (Goepfert et al. 1999). Daneben wird die intrazelluläre Verteilung und Oberflächenexpression des PFV Env-Proteins auch von der Membran-spannenden Domäne (MSD) der TM-Untereinheit und der LP-Untereinheit beeinflusst (Pietschmann et al. 2000, Lindemann et al. 2001). Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Ubiquitinierung von Lysinen im Bereich der LP-Untereinheit. Wird die Ubiquitinierung durch Substitution der Lysine gegen Arginin in der LP-Untereinheit verhindert, kommt es zu einer erhöhten Freisetzung subviraler Partikel (Lindemann pers. Mitteilung). Interessanterweise findet sich in der TM-Untereinheit des Env-Proteins von EFV kein funktionales „ER-retrieval-signal“. Als Konsequenz wird im Gegensatz zu PFV bei EFV daher auch eine Freisetzung der viralen Partikel überwiegend an der Plasmamembran beobachtet (Tobaly-Tapiero et al. 2000).

Im Unterschied zu allen anderen retroviralen Glykoproteinen ist die Koexpression des foamyviralen Hüllproteins essentiell für die Freisetzung von foamyviralen Partikeln aus der Wirtszelle (Pietschmann et al. 1999). Diese Funktion im foamyviralen Replikationszyklus kann auch nicht durch andere retrovirale Glykoproteine übernommen werden (Übersicht in Lindemann und Goepfert 2003). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen legen nahe, dass das Glykoprotein im Viruspartikel als Trimer vorliegt (Wilk et al. 2000).

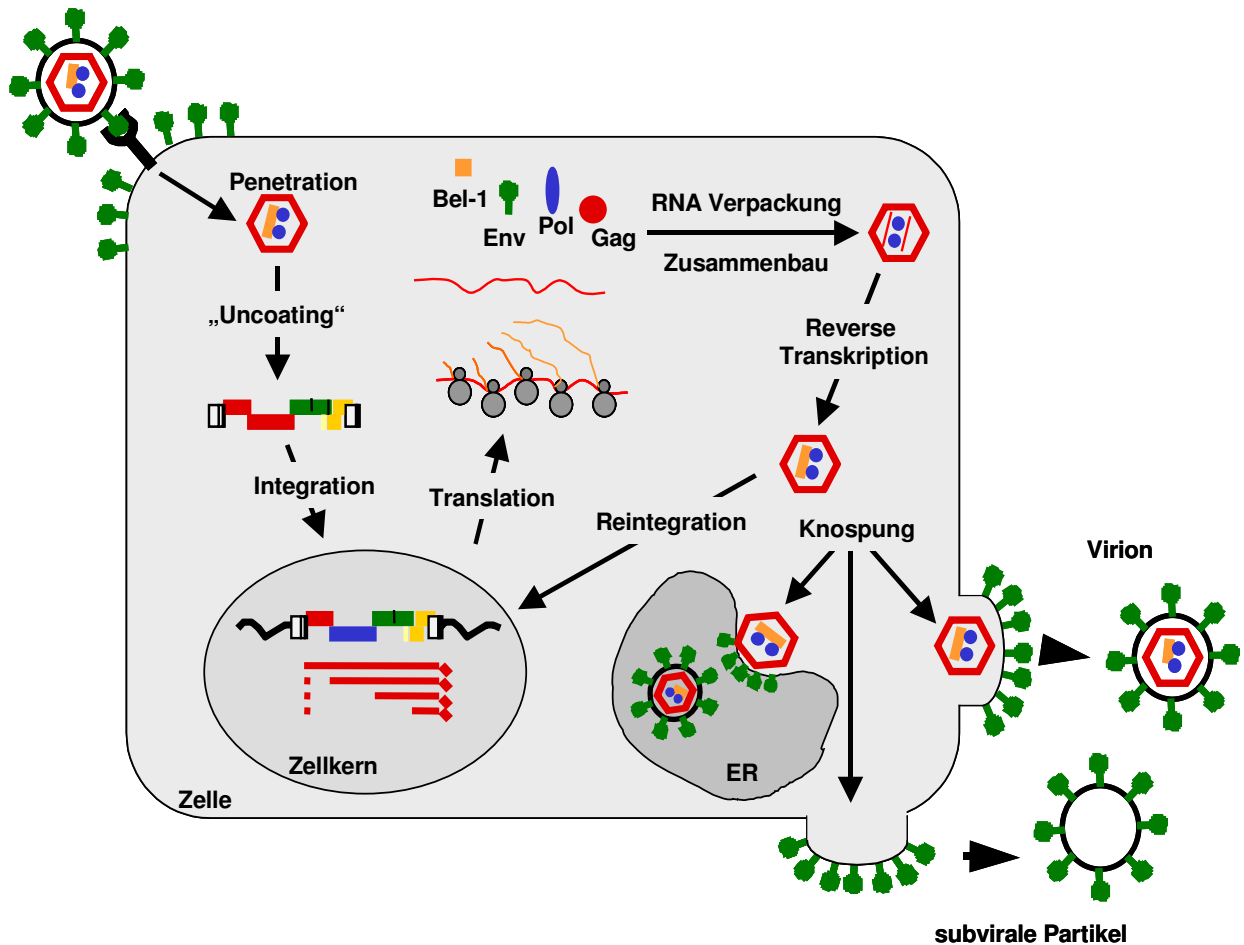


Abb. 4: Der foamyvirale Replikationszyklus.

Dargestellt ist der schematische Ablauf der wichtigsten Stationen des Replikationszyklus. Die Farbkodierung der retroviralen Proteine entspricht der aus Abb. 1. Virale genomische DNA ist durch dicke gelben Balken, virale genomische RNA durch dünne rote Balken dargestellt.

Akzessorische Proteine

Der foamyvirale transkriptionelle Transaktivator (Tas) weist keine Sequenzhomologien zu anderen retroviralen Transaktivatoren auf (Übersicht in Rethwilm 1995). Die Aktivierung der virale Transkription geschieht durch Bindung an die DNA im U3-Bereich des LTR. Dementsprechend wurde eine interne DNA-Bindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich des 36 kDa Proteins entdeckt (Venkatesh und Chinnadurai 1993, Garrett et al. 1993, Blair et al. 1994, He et al. 1996). Wie aus Abb. 3 hervorgeht, exprimiert PFV neben Tas noch ein weiteres akzessorisches Protein, das als Bet-Protein bezeichnet wird (Muranyi und Flügel 1991). Es wird von einer mehrfach gespleißten mRNA gebildet, die Teile des *tas*-Exons mit dem *bel-2*-Leseraster verbindet. Die genaue Funktion dieses Proteins war bisher unklar, da es für die Replikation in bestimmten Zelllinien *in vitro* entbehrlich ist. Neuere Untersuchungen konnten eine inhibitorische Funktion gegen den Einbau zellulärer APOBEC-Proteine (Apolipoprotein B editing complex), nachweisen (Löchelt et al. 2005, Russell et al. 2005, vgl. auch Kapitel 1.3.3.). Im

Zusammenhang mit Bet ist noch ein weiteres Genprodukt charakterisiert worden, das sich aus den extrazellulären Teilen des Hüllproteins und Bet zusammensetzt (Netzer et al. 1990, Lindemann und Rethwilm 1998, Giron et al. 1998). Dieses 170 kDa große Env-Bet Fusionsprotein wird aufgrund eines im *env*-ORF liegenden, konservierten Spleißdonor-/Spleißakzeptorpaars gebildet. Es kann nicht in PFV Partikeln nachgewiesen werden und ist für die Morphogenese infektiöser Partikel entbehrlich. Da sich Env-Bet auch nicht direkt auf das Replikationsverhalten *in vitro* auswirkt, konnte ihm bislang keine Funktion zugewiesen werden.

1.2.3. Der foamyvirale Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der Foamyviren weicht von dem der Orthoretroviren ab. Die Besonderheiten, die auf verschiedenen Ebenen entdeckt wurden, ergeben das Bild einer gemischten Replikationsstrategie, die Elemente von Retroviren, Retrotransposons und Hepadnaviren vereinigt und aufgrund derer die Foamyviren eine Sonderstellung innerhalb der Familie der Retroviren einnehmen (Abb. 4, Übersicht in Rethwilm 2003).

Foamyviren besitzen einen breiten Zelltropismus. So konnte noch keine Zelllinie gefunden werden, die resistent gegen eine FV-Infektion war (Übersicht in Mergia und Heinkelein 2003, Falcone et al. 2003). Bei dem foamyviralen Rezeptor muss es sich folglich um ein weit verbreitetes Oberflächenmolekül handeln (Lindemann und Goepfert 2003). Nach der Penetration der Wirtszelle, die wahrscheinlich einem pH-abhängigen Endozytoseweg folgt (Picard-Maureau et al. 2003), zerfällt das Kapsid und gibt das virale Genom frei (engl. „uncoating“, vgl. Abb. 4). Während bei allen anderen Retroviren die Umschreibung des RNA-Genoms in DNA zu einem frühen Zeitpunkt des Replikationszyklus vollzogen wird, also direkt nach der Infektion der Zelle, können Foamyviren die reverse Transkription des Genoms auch zu einem späten Zeitpunkt im Replikationszyklus ausführen, also noch bevor die infizierte Zelle verlassen wird (Abb. 4). Verschiedene experimentelle Befunde stützten diese Vorstellung. Zum einen treten in FV infizierten Zellen große Mengen viraler DNA auf (Moebes et al. 1997). Experimente mit dem RT-Inhibitor AZT zeigten, dass Foamyviren auch in der Gegenwart des RT-Inhibitors Zellen infizieren konnten, was eine bereits vorher weitgehend abgeschlossene DNA-Synthese voraussetzt (Moebes et al. 1997, Yu et al. 1999, Roy et al. 2003). Ferner konnte in extrazellulären Viruspartikeln sowohl RNA als auch DNA nachgewiesen werden (Yu et al. 1996, Roy et al. 2003). Die Existenz sowohl von genomischer viraler DNA als auch RNA in foamyviralen Partikeln bedeutet, dass der RT-Schritt bei Foamyviren sowohl zu einem frühen wie auch späten Zeitpunkt der Replikation erfolgen kann und diese Virusgruppe eine gemischte Replikationsstrategie verfolgt (vgl. Delelis et al. 2003). Ein bereits in der infizierten Zelle abgeschlossener RT-Schritt mit einem vorliegenden funktionellen DNA-Genom eröffnet auch die Möglichkeit eines internen

Replikationszyklus. Dabei kann das Virus, statt die Zelle zu verlassen, wieder in das Genom reintegrieren. Von den Hepadnaviren ist ein solcher „Kurzschluß“ der Replikation bekannt (Tuttleman et al. 1986, Ganem 1991, Nassal und Schaller 1993), für PFV konnte dieser Vorgang ebenfalls nachgewiesen werden (Heinkelein et al. 1998).

Im Anschluss an die Freisetzung der genomischen DNA wird der Präintegrationskomplex wahrscheinlich entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Saib et al. 1997, Petit et al. 2003). Nach erfolgreicher Integration des Provirus in das Genom der Wirtszelle erfolgt die sequentielle Expression der regulatorischen und später der strukturellen Proteine. Das Kapsid wird im freien Zytoplasma zusammengebaut und wird bei PFV überwiegend in das Lumen des ER freigesetzt, von wo es eventuell über Exozytose-Prozesse an die Zelloberfläche gelangt (Abb. 4, Goepfert et al. 1999). Wie bereits erwähnt unterbleibt eine Prozessierung des foamyviralen Gag-Proteins in MA-, CA- und NC-Anteil durch die virale Protease. Aus diesem Grund erfolgt nach der Freisetzung auch keine sichtbare morphologische Veränderung der Viruspartikel, sie behalten ihre ursprüngliche Gestalt bei.

1.3. DIE MORPHOGENESE RETROVIRALER PARTIKEL

Der Zusammenbau und die Abschnürung infektiöser viraler Partikel erfordert eine räumlich und zeitlich koordinierte Interaktion aller viralen Bausteine sowie ein Zusammenspiel mit zellulären Komponenten, die zur Ausschleusung der viralen Partikel aus der Wirtszelle benutzt werden. Dreh- und Angelpunkt dieses Prozesses ist das retrovirale Strukturprotein Gag, das deshalb auch als „particle making machine“ bezeichnet wird (Dickson et al. 1984). Die alleinige Expression von Gag in Wirtszellen führt bei Orthoretroviren zur Freisetzung virusähnlicher Partikel (VLPs). Das Strukturprotein besitzt also alle nötigen Informationen, die für den Morphogeneseprozess retroviraler Partikel benötigt werden. In diesem Kapitel werden zunächst die verschiedenen Strategien der Retroviren bei der Morphogenese ihrer Partikel erläutert, bevor auf die wichtigsten Schritte während der Morphogenese und insbesondere der Rolle des Gag-Proteins bei diesen Vorgängen eingegangen wird.

1.3.1. Strategien der retroviralen Partikelmorphogenese

Elektronenmikroskopische Beobachtungen der Morphogenese retroviraler Partikel führten zu einer ersten Klassifizierung der exogenen Retroviren in die Typen B, C und D anhand des Ablaufs der Morphogenese und der Form der Kapside (vgl. Tab. 1). Für den Ablauf der Partikelmorphogenese finden sich innerhalb der Retroviren zwei Varianten (Abb. 5, nach Swanstrom und Wills 1997).

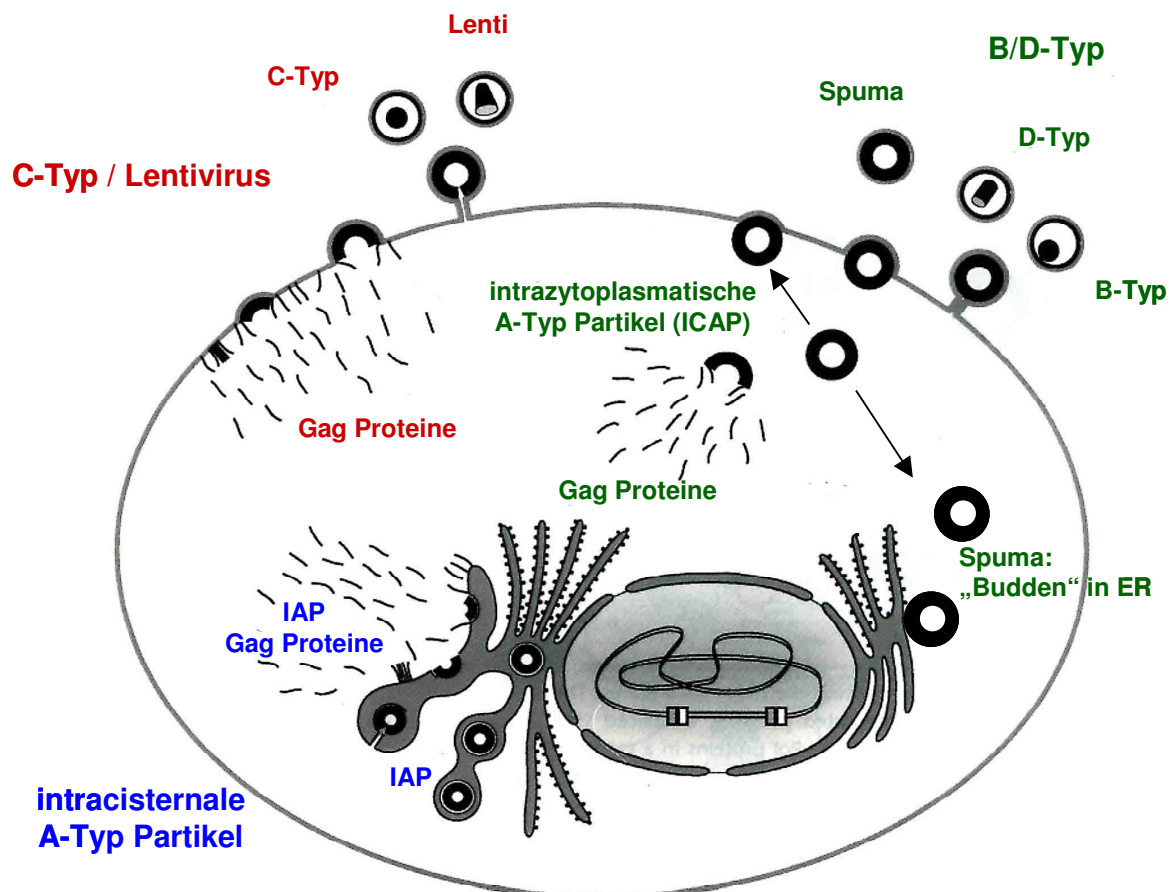


Abb. 5: Strategien der retroviralen Partikelmorphogenese.

Dargestellt sind die beiden Hauptstrategien der retroviralen Partikelmorphogenese vom Typ C (Rot) und Typ B/D (Grün). Die Partikelbildung endogener Retroviren (Blau) ist ebenfalls angedeutet (nach Swanstrom und Wills 1997, verändert).

Bei der ersten Variante bilden die Gag-Polypeptide bereits im freien Zytoplasma elektronenmikroskopisch erkennbare, stabile Strukturen, häufig als intrazytoplasmatische Partikel vom Typ A (ICAP) bezeichnet. Diese ICAPs werden im weiteren Verlauf der Morphogenese zur Plasmamembran transportiert, wo sie bei der Abschnürung ihre äußere Hülle erhalten. Gut charakterisierte Vertreter dieser Form der Partikelmorphogenese sind die jeweiligen Prototypen der Typ-B und Typ-D Retroviren, das „Mouse Mammary Tumor Virus“ (MMTV) und das „Mason-Pfizer Monkey Virus“ (M-PMV, vgl. Tab. 1). Auch Spumaviren bauen ihre Kapside im freien Zytoplasma zusammen, allerdings erfolgt bei ihnen die Abschnürung der Partikel vor allem an intrazellulären Membranen (Abb. 5, Goepfert et al. 1999).

Die zweite Variante wurde als C-Typ der Morphogenese bezeichnet. Es sind intrazellulär keine Kapsidstrukturen erkennbar, statt dessen finden sich elektronenmikroskopisch erkennbare Gag-Aggregate an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Es entstehen halbmondförmige Strukturen direkt unterhalb der sich kuppelförmig vorwölbenden Plasmamembran, aus denen sich das unreife Kapsid formt. Das fertige Kapsid wird

schließlich zusammen mit einer umhüllenden Lipidmembran von der Zellmembran abgeschnürt und freigesetzt. Diesem Morphogeneseweg folgen alle Alpha-, Gamma-, Delta-, und Epsilonretroviren sowie die Lentiviren. Gut charakterisierte Vertreter sind die „Avian Sarcoma/Leukosis Viruses“ (ASLVs), das „Murine Leukemia Virus“ (MLV) und für die Lentiviren das HI-Virus.

Ein dritter Weg der Partikelmorphogenese wird bei manchen endogenen Retroviren beobachtet. Die im Zytoplasma zusammengebauten Kapside werden dabei ausschließlich in das Lumen des ER freigesetzt. Die membranumhüllten Partikel werden als intrazisternale Partikel vom Typ A (IAP) bezeichnet. Eine Prozessierung des Strukturproteins findet nicht statt und die Partikel behalten ein „unreifes“ Aussehen. Dieses Verhalten ähnelt dem Morphogeneseweg von PFV, dessen Viruspartikel ebenfalls überwiegend in das ER-Lumen freigesetzt werden und keine morphologischen Veränderungen nach der Freisetzung zeigen. Allerdings sind diese Formen der Partikelmorphogenese nicht starr voneinander abgrenzbar. Eine einzige Punktmutation im Gag-Protein von M-PMV genügt, um dieses Virus vom Typ-D- in den Typ-C-Morphogeneseweg zu lenken (Rhee und Hunter 1990). Ebenso können die Abläufe der Partikelmorphogenese spezifisch für die jeweiligen Wirtszellen sein. In Fibroblastenzellen bauen sich HIV-1 Partikel an der Plasmamembran zusammen, folgen also dem Typ-C-Morphogeneseweg. In Makrophagen dagegen setzen sich die Kapside an den späten Endosomen im Zellinneren zusammen und werden in „Multiple Vesicular Bodies“ (MVB) freigesetzt (Pelchen-Matthews et al. 2003, Ono und Freed 2004).

1.3.2. Funktionen des Strukturproteins Gag während der Morphogenese retroviraler Partikel

Eine Einführung zu dem Gag-Protein der Retroviren im allgemeinen (Kapitel 1.1.2.) und im speziellen zum PFV Gag-Protein (Kapitel 1.2.2.) wurde schon gegeben. Aufgrund mangelnder Sequenzhomologien zwischen den Gag-Proteinen verschiedener Orthoretroviren ist es kaum möglich, universell vorhandene Aminosäureabschnitte gleicher Funktion zu identifizieren. Statt dessen wurden drei essentielle Interaktionsschritte im Morphogenese- und Freisetzungsprozess retroviraler Partikel definiert und nach funktionalen Domänen in verschiedenen Gag-Proteinen gesucht, die notwendig für diese Interaktionen sind (nach Swanstrom und Wills 1997):

- I-Domäne (engl.: interaction): Vermittelt die Gag–Gag–Wechselwirkung beim Zusammenbau des Partikels, verantwortlich für den korrekten Aufbau und Dichte der Partikel;
- M-Domäne (engl.: membrane binding): Dirigiert die Gag–Proteine zur Plasmamembran und ist verantwortlich für die Bindung der Proteine an die Plasmamembran;

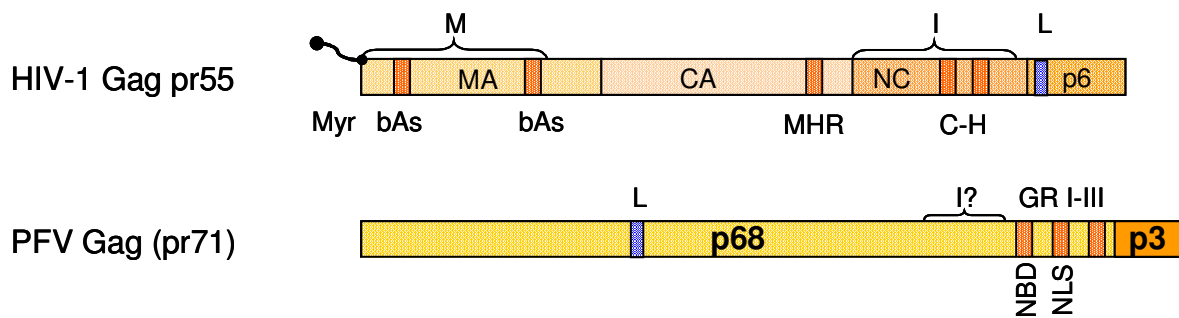


Abb. 6: Schematische Darstellung der unprozessierten Gag-Proteine von HIV-1 und PFV.

Prozessierungsprodukte und funktionelle Abschnitte des Proteins sind angedeutet.

MA: Matrix; CA: Kapsid; NC: Nukleokapsid; Myr: Myristinsäure; bAs: Proteinabschnitte mit basischen Aminosäuren; MHR: „Major Homology Region“; C-H: Cystein-Histidin reiche Proteinabschnitte; M: Membranbindungsdomäne; I: Interaktions-Domäne; L: Late-Domäne; GRI-III: Glyzin-Arginin reiche Proteinabschnitte; NBD: Nukleinsäurebindungsdomäne; NLS: Nukleäres Lokalisationssignal.

- L-Domäne (engl.: late): Dieser Bereich ist verantwortlich für die Abschnürung des Viruspartikels von der Zellmembran.

Für die Gag-Proteine verschiedener Retroviren konnten diese funktionalen Domänen lokalisiert und beschrieben werden. In Abbildung 6 ist am Beispiel des HIV-1 Gag-Proteins die Lage dieser Domänen schematisch dargestellt und als Vergleich dazu das PFV Gag-Protein mit seinen bekannten funktionalen Abschnitten abgebildet.

Die primären I-Domänen sind meist im NC-Anteil des Gag-Vorläuferproteins lokalisiert und zwischen den Gag-Proteinen verschiedener Retroviren austauschbar (u.a. Bennett et al. 1993, 1999, Weldon und Wills 1993, Übersicht in Craven und Parent 1996). Gemeinsam ist den Interaktionsdomänen verschiedener Gag-Proteine die hohe Anzahl basischer Aminosäuren. Im NC-Anteil des Gag-Proteins liegen auch die hoch konservierten Cys/His-Boxen, die mit ihren Zinkfingermotiven den Einbau der viralen Nukleinsäure vermitteln. Beim Zusammenbau des viralen Kapsids spielen diese konservierten Bereiche jedoch keine Rolle (u. a. Aldovini und Young 1990, Gorelick et al. 1990, Rein et al. 1994). Denkbar ist aber, dass die genomische RNA die Rolle eines Stützskelettes spielt, die eine erste Interaktion zwischen den Gag-Proteinen vermittelt (Muriaux et al. 2001). Wie durch Deletionsanalysen gezeigt werden konnte, spielen neben dem NC aber auch noch andere, virusspezifische, Proteinabschnitte eine Rolle bei der Gag-Gag-Interaktion (u.a. Li et al. 1997, Zabransky et al. 2005).

Für PFV wurden ebenfalls zwei funktionale I-Domänen zwischen Aminosäure 400 und 500 beschrieben (Abb. 6, Bowzard et al. 1998). Jüngste Untersuchungen legen nahe, dass ein konserviertes YEIL-Motiv in diesem Bereich des PFV Gag-Proteins eine wichtige Rolle bei der korrekten Zusammensetzung der Partikel spielt (Stange et al. 2005, Mannigel, Stange und Lindemann, pers. Mitteilungen).

Die M-Domäne retroviraler Gag-Proteine ist am N-Terminus im Matrixanteil lokalisiert. Die Verankerung des Gag-Proteins in eine zelluläre Membran wird bei den meisten Retroviren über eine posttranslational angefügte Myristinsäure am N-Terminus des Gag-Proteins und einer Reihe von basischen Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft vermittelt (Übersicht in Callahan und Wills 2000). Isolierte M-Domänen sind zwischen den Gag-Proteinen verschiedener Viren austauschbar. So kann mit der M-Domäne von HIV-1 (vgl. Abb. 6) unter anderem die M-Domänen von ASLV (Bennett et al. 1993, Parent et al. 1996) und von MLV (Deminie und Emerman 1993, 1994) ersetzt werden. Darüber hinaus können die retroviralen M-Domänen durch membranbindende myristilierte Domänen zellulärer Proteine funktional ersetzt werden (u. a. Wills et al. 1991, Lee und Linial 1994). Die für den zellulären Transport der Gag-Proteine zum Ort der Kapsidbildung und der Partikelfreisetzung verantwortlichen Sequenzabschnitte konnten bisher ebenfalls im N-Terminus retroviraler Gag-Proteine lokalisiert werden. Bei Retroviren, die dem Typ-C-Morphogeneseweg folgen, ist die Myristilierung des Gag-Proteins ein Signal für den Transport an die Plasmamembran als Ort des Kapsidzusammenbaus. Daneben spielen aber auch hydrophobe und basische Aminosäuren am N-Terminus des Proteins eine entscheidende Rolle (u.a. Yuan et al. 1993, Ono und Freed 1999, Ono et al. 2000). Für M-PMV, den Prototyp des Typ-D-Morphogeneseweges, konnte ein Zytoplasmatisches Retentionssignal (CTRS = „cytoplasmic targeting and retention signal“) am N-Terminus identifiziert werden. Dieses Signal rekrutiert die Gag-Proteine an die Zentrosomen, den Ort der Partikelmorphogenese (Choi et al. 1999, Sfakianos et al. 2003a). Für den Transport der fertigen Kapside zum Ort der Freisetzung an der Plasmamembran ist aber wiederum die Myristilierung des M-PMV Gag-Proteins notwendig (Rhee und Hunter 1987).

Foamyvirale Gag-Proteine werden weder myristiliert noch besitzen sie die typische Anhäufung basischer Aminosäuren in der Umgebung des N-Terminus (Abb. 6). Durch die Addition eines Myristilierungssignales des src-Proteins an das PFV Gag-Protein kann jedoch eine Env unabhängige Freisetzung von virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) ermöglicht werden (Eastman und Linial 2001, Stanke und Lindemann pers. Mitteilung und diese Arbeit).

Die L-Domäne ist der am besten charakterisierte funktionale Abschnitt des retroviralen Gag-Proteins. Late-Domänen interagieren im letzten Schritt der Partikelmorphogenese mit Teilen der zellulären Exportmaschinerie, um die Knospung und finale Abschnürung des Partikels durch eine zelluläre Membran zu gewährleisten. Die Konsensussequenzen P(T/S)AP, LXXL, PPXY und YPXL wurden bislang in den Gag-Proteinen verschiedenen Retroviren identifiziert (Übersichten in Freed 2002, Ott et al. 2003). Auch in den Strukturproteinen anderer Virusfamilien konnten Late-Domänen identifiziert werden, so im Vesikulärem Stomatitisvirus (VSV) aus der Familie der Rhabdoviren und im M-Protein (p40) des zu den Filoviren gehörenden Ebolavirus. Als zelluläre Interaktionspartner wurden Proteine des ESCRT-

Komplexes („endosomal sorting complex required for transport“) identifiziert, welche an der Proteinsortierung in den Endosomen („vacuolar protein sorting (VPS) pathway“) beteiligt sind (Übersichten in Demirov und Freed 2004, Pelchen-Matthews et al. 2004). Die VPS-Maschinerie ist in der Zelle für die Auswahl und den Einbau von Proteinen in Vesikel verantwortlich. Diese Vesikel fusionieren später zu multivesikulären Körperchen (MVB), die abgebaut oder aus der Zelle ausgeschleust werden (Garrus et al. 2001). Als Hauptsignal für die VPS-Sortierung dient das Anfügen eines Ubiquitinmoleküls an die Seitenketten von Lysinen in einem Protein (Monoubiquitinylierung, Martin-Serrano et al. 2004). Late-Domänen sind an den unterschiedlichsten Positionen der Gag-Vorläuferproteine lokalisiert worden und sind sowohl innerhalb eines als auch zwischen verschiedenen Gag-Proteinen austauschbar (u. a. Wills et al. 1994, Parent et al. 1995, Yuan et al. 2000). Für das PFV Gag-Protein konnte kürzlich ein PSAP-Motiv mit Late-Domänen Funktion charakterisiert werden (Abb. 6, Stange et al. 2005, Patton et al. 2005).

1.3.3. Die Morphogenese orthoretroviraler Partikel

Das Gag-Protein baut nicht nur das retrovirale Kapsid auf, sondern vermittelt auch den Einbau der weiteren viralen Komponenten in das entstehende Viruspartikel. Die Bildung von Gag-Pro-Pol-Fusionsproteinen (Kapitel 1.1.2.) gewährleistet bei allen Orthoretroviren eine effektive Verpackung der viralen Enzyme in das Virion durch die passive Kopplung an das Gag-Protein. Der Einbau der viralen Nukleinsäure wird durch die Zinkfinger motive der ein bis zwei Cystein/Histidin-reichen Abschnitte (Cys-His-Boxen) im NC-Anteil orthoretroviraler Gag-Proteine übernommen. Eine effektive Unterscheidung zwischen zellulären oder subgenomischen viralen mRNAs und den viralen prägenomischen mRNAs ermöglichen spezifische cis-aktive Verpackungssequenzen (Ψ), mit denen die Zinkfinger motive der Gag-Proteine interagieren. Bei einigen Retroviren sind diese Verpackungssequenzen klar abgrenzbar (z.B. Alpharetroviren, Banks und Linial 2000), bei anderen Retroviren wie z.B. HIV-1 sind die Strukturen komplex und diffus über das Genom verteilt (Übersicht in Berkowitz et al. 1996).

Für die Rekrutierung der Hüllproteine in die Partikelmembran gibt es zwei konkurrierende Modelle. Zum einen wurde ein passiver Einbau der Glykoproteine bei der Freisetzung des Viruspartikels durch die Zellmembran vorgeschlagen (Young et al 1990, Hunter und Swanstrom 1990). Unterstützung erhält dieses Modell durch die Tatsache, dass retrovirale Kapside mit fremden Hüllproteinen versehen werden können und mit diesen auch produktiv neue Wirtszellen infizieren können. Dieser Vorgang wird als Pseudotypisierung bezeichnet und gelingt nicht nur mit Envelope-Proteinen verschiedener Retroviren, sondern auch mit Hüllproteinen von Vertretern anderer Virusfamilien (Übersicht in Garoff et al. 1998). Zudem können die zytoplasmatischen Anteile verschiedener retroviraler Glykoproteine

weitestgehend deletiert werden, ohne die Produktion infektiöser Partikel signifikant zu reduzieren (u.a. Freed und Martin 1995, 1996). Andererseits konnten Studien an verschiedenen Retroviren spezifische Interaktionen zwischen dem Matrixanteil von Gag und dem zytoplasmatischen Anteil des Hüllproteins zeigen. In polarisierten Zellen werden HIV-1 VLP's sowohl auf der apikalen wie basolateralen Seite der Zelle freigesetzt, bei Koexpression des authentischen Glykoproteins dagegen erfolgt eine Freisetzung der Partikel ausschließlich von der basolateralen Membran (Owens et al. 1991, Lodge et al. 1994). Obwohl bei Orthoretroviren prinzipiell die Gag-Expression in Wirtszellen ausreichend für die Bildung und Freisetzung von VLPs ist, kann durch die Koexpression des authentischen Glykoproteins die Freisetzungsrates von Viruspartikeln erhöht werden (Sfakianos et al. 2003b). Die Notwendigkeit einer Interaktion zwischen Gag- und Env-Protein zur Freisetzung viraler Partikel ist anscheinend virus- und situationsspezifisch. Zelluläre Proteine sind ebenfalls in viralen Partikeln enthalten. Größtenteils handelt es sich um Membranproteine, die passiv bei der Freisetzung des Viruspartikels in die Hüllmembran eingebaut werden (Hammarstedt et al. 2000). In HIV-1 Partikeln konnten auch Bestandteile des zellulären Zytoskelettes (Actin, Clathrin) nachgewiesen werden (Hammarstedt und Garoff 2004). Bestimmte zelluläre Bestandteile werden aber auch aktiv in den Virionen angereichert, so wurden in HIV-1 Virionen hohe Konzentrationen an Cyclophilin A und Tsg-101, einem Protein des ESCRT-Komplexes, gefunden (Hammarstedt und Garoff 2004). Für Cyclophilin A konnte eine direkte Interaktion mit dem HIV-1 Gag Protein durch einen „yeast two-hybrid screen“ nachgewiesen werden (Luban et al 1993). In den letzten Jahren wurde mehr und mehr die Bedeutung zellinterner Abwehrmechanismen gegen retrovirale Infektionen entdeckt (Übersicht in Bieniasz 2004). Am besten untersucht ist dabei die Rolle der APOBEC-Proteinfamilie, einer Gruppe von Deaminasen. Werden diese Deaminasen mit in das Virion verpackt, können sie während der Reversen Transkription Hypermutationen im viralen Genom bewirken (u. a. Harris et al. 2003). Lentiviren besitzen als Gegenspieler das Vif-Protein, das den Einbau von APOBEC in die Virionen unterbinden kann (vgl. Bet-Protein bei FV, Kapitel 1.2.2.). Die Zell- und Wirtsspezifität von Lentiviren beruht auf dem Vermögen der Vif-Proteine einzelner Virusarten, die jeweiligen APOBEC-Proteine einer Zelle ausschalten zu können. Der aktive Einbau oder Ausschluss zellulärer Proteine aus dem Virion kann folglich für eine erfolgreiche Replikation essentiell sein.

1.3.4. Die Morphogenese foamyviraler Partikel

Über die Morphogenese foamyviraler Partikel ist wesentlich weniger bekannt als über die orthoretroviraler Partikel. Im Unterschied zu den Orthoretroviren ist bei Foamyviren eine Interaktion von Gag- und Env-Protein essentiell für die Freisetzung viraler Partikel. Die alleinige Expression des foamyviralen Strukturproteins Gag führt zwar zu Bildung nackter

Kapside im Zytoplasma der Zellen (Baldwin und Linial 1998, Fischer et al. 1998), für eine Freisetzung dieser Kapside aus der Wirtszelle ist aber die Koexpression von FV Env notwendig (Baldwin und Linial 1998, Fischer et al. 1998, Pietschmann et al. 1999). In dieser Hinsicht ähneln Foamyviren den Hepadnaviren, bei denen zwar das Core-Protein und die Polymerase ausreichend für die Bildung von Viruskapsiden sind, die Koexpression der Membranproteine aber obligat für eine Freisetzung der Partikel aus der Wirtszelle ist (Ganem 1991). Die Interaktion zwischen Hüllprotein und Kapsid bei Foamyviren ist hoch spezifisch, da ein funktioneller Ersatz des FV Glykoproteins durch die Env-Proteine anderer Retroviren (Pseudotypisierung) nicht möglich ist (Pietschmann et al. 1999, Shikova-Lekova 2003). Nur in Anwesenheit des Strukturproteins Gag wiederum erfolgt ein quantitativer Transport des Glykoproteins zur Zellmembran und der typische zytopathische Effekt einer foamyviralen Infektion stellt sich ein (Pietschmann et al. 2000). Im PFV Hüllprotein konnten zwei für die Interaktion mit dem Kapsid notwendige Domänen in der TM-Untereinheit sowie am N-Terminus des Leaderpeptides (LP) identifiziert werden (Pietschmann et al. 1999, Lindemann et al. 2001, Wilk et al. 2001a). Zwei konservierte Tryptophan-Reste im Leaderpeptid des PFV Env-Proteins sind dabei essentiell für die Bindung des Kapsids (vgl. Kapitel 1.2.2., Lindemann et al. 2001, Wilk et al. 2001a).

Eine weitere Besonderheit der Foamyviren ist die Gag-unabhängige Expression des Pro-Pol-Proteins von einer eigenen gespleißten mRNA (Löchelt und Flügel 1996, Enssle et al. 1996, Bodem et al. 1996, Holzschu et al. 1998, Lecellier et al. 2002). Als Konsequenz kann das Pol-Protein nicht wie bei Orthoretroviren als Fusionsprotein zusammen mit Gag in das Viruspartikel eingebaut werden. Es konnte gezeigt werden, dass für einen effektiven Einbau von Pol in das Viruspartikel die Anwesenheit einer verpackbaren, genomischen RNA notwendig ist. In diesem Fall scheint also Pol an die genomische RNA zu binden und zusammen mit dem RNA-Genom in das Viruspartikel inkorporiert zu werden (Heinkelein et al. 2002b, Peters et al. 2005). Deletionsanalysen konnten auf der genomischen RNA von PFV im U5-Bereich und im Bereich des *pol*-ORF Sequenzabschnitte identifizieren, die zum einen für die Bindung von Pol an die RNA und zum anderen für den Einbau der RNA in das virale Kapsid notwendig sind (Heinkelein et al. 2000, 2002b, Peters et al. 2005). Auf Seite des Gag-Proteins vermitteln Glyzin-Arginin-reiche Sequenzabschnitte am C-Terminus den Einbau der Nukleinsäuren in das Viruspartikel (Kapitel 1.2.2.). Insbesondere für die GRI-Box konnte eine RNA/DNA-bindende Eigenschaft nachgewiesen werden, die Deletion dieser Box führt zur Produktion nicht-infektiöser Viruspartikel (Yu et al. 1996).

Im Unterschied zu den Orthoretroviren knospen die Viruspartikel von PFV nicht an der Plasmamembran der Zelle, sondern hauptsächlich in intrazelluläre Kompartimente (Baldwin und Linial 1998). Der Einfluss des PFV Hüllproteins auf diesen ungewöhnlichen Freisetzungsweg wurde bereits in Kapitel 1.2.2. erläutert (Goepfert et al. 1999).

1.4. FRAGESTELLUNG

Foamyviren unterscheiden sich bezüglich ihrer Proteinexpression, der Partikelmorphogenese und ihres Reproduktionszyklus deutlich von den übrigen Retroviren. Gleichzeitig zeigen sie interessante Parallelen zu den Hepadnaviren und nehmen so eine Zwischenstellung zwischen diesen beiden einzigen Virusgruppen mit reverser Transkription des Genoms ein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Besonderheiten der Biologie dieser Virusgruppe näher untersucht und charakterisiert.

1.4.1. Gag/Pol-Zusammensetzung foamyviraler Viruspartikel am Beispiel von PFV

Bei allen Orthoretroviren wird das Produkt des *pol*-Gens zunächst ausschließlich als Gag/Pol-Fusionsprotein gebildet (Kapitel 1.1.2.). Diese Art der Bildung von Gag- und Gag/Pol-Produkten von einer einzigen, ungespleißten mRNA ermöglicht eine einfache und effektive Kontrolle über das Mengenverhältnis zwischen gebildetem Gag- und Pol-Protein. Das Verhältnis entspricht der statistischen Wahrscheinlichkeit, mit der ein Leserahmenwechsel bzw. eine Unterdrückung des Stop-Kodons durch den zellulären Translationskomplex erfolgt und liegt bei den bisher untersuchten Retroviren bei etwa 20:1 (Übersicht in Vogt 1997c).

Im Gegensatz zu diesem sehr ökonomischen Mechanismus der Produktion von Gag und Gag/Pol von einer gemeinsamen mRNA erfolgt bei Foamyviren die Translation des *pro/pol*-ORF von einer eigenen, gespleißten mRNA (Kapitel 1.2.2. und 1.3.4.). Das foamyvirale Strukturprotein wird dagegen wie auch bei Orthoretroviren von einer vollständigen genomischen mRNA translatiert. Diese innerhalb der Retroviren bislang einzigartige unabhängige Herstellung des Pro/Pol-Produktes wirft einige interessante Fragen auf:

Wird die Expression von Pol reguliert und auf welchem Mechanismus basiert diese Regulation?

Wie erfolgt der von Gag unabhängige Einbau des Pol-Proteins in das Viruspartikel?

Wieviel Pol-Protein ist in einem foamyviralen Partikel im Vergleich zu Gag tatsächlich vorhanden?

Während die erste Frage bis jetzt noch nicht näher untersucht wurde, konnte die zweite Frage in jüngster Zeit beantwortet werden (Kapitel 1.3.4.). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der dritten offenen Frage nach der Zusammensetzung foamyviraler Partikel bezüglich ihres Gehaltes an Gag- und Pol-Proteinen nachgegangen. Mit Hilfe von Referenzkurven bakteriell hergestellter Gag- und Pol-Proteine wurde der relative Gehalt an Gag- und Pol-Proteinen in aufgereinigten infektiösen Partikeln von PFV biochemisch bestimmt.

1.4.2. Die Rolle des Strukturproteins von PFV bei der Morphogenese und Freisetzung von Viruspartikeln

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion des foamyviralen Strukturproteins Gag bei der Morphogenese der Virionen untersucht. Im Vergleich zu den orthoretroviralen Strukturproteinen weist das Gag-Protein der Foamyviren zahlreiche Besonderheiten auf (Kapitel 1.2.2. und 1.3.2.). So wird bei Foamyviren das Strukturprotein Gag nicht in Matrix-, Nukleokapsid- und Kapsiduntereinheiten gespalten, sondern es findet hauptsächlich die Abspaltung eines kurzen C-terminalen Abschnittes durch die virale Protease statt. Trotz der unterschiedlichen Prozessierungsmuster war zu vermuten, dass den einzelnen Abschnitten des foamyviralen Gag-Proteins ähnliche Aufgaben zukommen, wie sie für das Gag-Protein bei Orthoretroviren charakterisiert wurden. In Analogie zum Matrixanteil des orthoretroviralen Strukturproteins wurden im N-Terminus des PFV Gag-Proteins funktionelle Bereiche für den intrazellulären Transport (Saib et al. 1997, Eastman und Linial 2001, Petit et al. 2003), der Interaktion mit dem Glykoprotein Env (Wilk et al. 2001a, Geiselhart et al. 2003) und, abweichend von den orthoretroviralen Gag-Proteinen, eine eventuelle Interaktionsdomäne zwischen den Gag-Proteinen vermutet (Tobaly-Tapiero et al. 2001). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden für die Morphogenese relevante Bereiche im N-Terminus des PFV Gag-Proteins eingegrenzt und charakterisiert. Da das Strukturprotein der Retroviren eine Schlüsselfunktion bei der Partikelmorphogenese übernimmt, sind viele der Besonderheiten des foamyviralen Reproduktionszyklus auf die ungewöhnliche Struktur des Gag-Proteins zurückzuführen. Eine genauere Charakterisierung des foamyviralen Gag-Proteins ist daher eine Voraussetzung für ein besseres Verständnis der vielen ungewöhnlichen Facetten im Replikationszyklus der Foamyviren.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. VERWENDETE MATERIALIEN

2.1.1. Chemikalien

Es wird darauf verzichtet, alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien im Einzelnen aufzulisten. Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden die Produkte von folgenden Firmen bezogen: *Merck, Sigma-Aldrich, Serva, Roth, Applichem*.

Vereinzelt wurde besonderer Wert darauf gelegt, das Produkt einer bestimmten Firma zu verwenden. In solchen Fällen werden im Text Hersteller und die jeweilige Katalognummer angegeben.

2.1.2. Enzyme und Reaktionspuffer

Mit wenigen Ausnahmen wurden ausschließlich Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme sowie die dazu gehörigen Puffer der Firma *MBI-Fermentas* verwendet.

Abweichend davon kamen zum Einsatz:

- Pwo-Polymerase (*Peqlab*);
- Herculase (*Promega*);
- SuperScript II Reverse Transkriptase (*Invitrogen*);
- RNase (*Roth, Roche*);
- DNase (*Promega*).

2.1.3. Größen- und Längenstandards

Nukleinsäurenlängenstandards:

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder;
- GeneRuler™ 100 Bp DNA Ladder;
- λ -DNA.

Proteinlängenstandards:

- Prestained Protein Ladder 10 – 180 kDa.

Alle Produkte wurden von *MBI-Fermentas* bezogen.

2.1.4. Antibiotika

	Stammlösung	Arbeitsverdünnung
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	20 mg/ml	20 µg/ml
Penicillin/Streptomycin (Gibco™)	10 mg/ml	10 µg/ml
Neomycin (G 418, Invitrogen)	100 mg/ml	100 µg/ml

2.1.5. Bakterienstämme

E. coli DH5α: F' Φ80d/lacZΔM15 supE44 Δ(lacZYA-argF') U169 recA1 endA1 λgyrA96 thi-1 relA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺); Referenz: *Invitrogen*.

→ Transformation von Ligationsreaktionen

E. coli JM109: e14⁻ (McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁻) supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^q Z ΔM15] relA1; Referenz: *Stratagene*.

→ Midipräparationen von Plasmiden

E. coli BL21(DE3) : F' ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3); Referenz: *Novagen*.

E. coli BL21(DE3)pLysS : F' ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (cam^R); Referenz: *Novagen*.

→ Expression rekombinanter viraler Proteine

2.1.6. Plasmide

PFV - Konstrukte im infektiösen Provirus:

Plasmidname	Beschreibung
pcHSRV2	Expressionsplasmid für ein CMV-Promotor getriebenes PFV Provirus (Moebes et al. 1997)
pcHSRV2-M65	basierend auf pcHSRV2, mit Deletion der As 545 – 560 im gag-ORF (ΔGRII, Schliephake und Rethwilm 1994)
pcHSRV2-M84	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den gag-ORF an der Position V7A/E8S (diese Arbeit)
pcHSRV2-M85	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den gag-ORF an der Position A16/L17S (diese Arbeit)
pcHSRV2-M86	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den gag-ORF an der Position S124A/S125 (diese Arbeit)

Plasmidname	Beschreibung
pcHSRV2-M87 Δ7-47	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position V7A/Q47S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 46 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M88 Δ7-78	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position V7A/V78S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 77 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M89 Δ7-199	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position V7A/S199, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 198 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M90 Δ16-47	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position A16/Q47S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 46 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M91 Δ16-78	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position A16/V78S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 77 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M92 Δ16-199	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position A16/S199, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 198 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M93 Δ123-199	basierend auf pcHSRV2, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position S124A/S199, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 125 – 198 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M94 L17A	basierend auf pcHSRV2, Substitution der As L17 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M95 I36A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As I36 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M96 W45A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As W45 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M96 Myr W45A	basierend auf pcHSRV2-M96, mit dem src-Myristilierungssignal am N-Terminus des <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M96 ΔGR11 W45A	basierend auf pcHSRV2-M96, Deletion der As 545 – 560 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M97 R50A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As R50 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M97 Myr W45A	basierend auf pcHSRV2-M97 mit dem src-Myristilierungssignal am N-Terminus des <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)

Plasmidname	Beschreibung
pcHSRV2-M97 ΔGR11 W45A	basierend auf pcHSRV2-M97, Deletion der As 545 – 560 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M98 L66A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As L66 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M99 L12A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As L12 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M100 L20A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As L20 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M101 L56&58A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As L56 und L58 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M101 ΔGR11 L56&58A	basierend auf pcHSRV2-M101, Deletion der As 545 – 560 (diese Arbeit)
pcHSRV2-M102 D60A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As D60 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M103 W44A	basierend auf pcHSRV2, Substitution der As W44 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M104 P65A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As P65 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M105 P69A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As P69 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M106 P89A	basierend auf pcHSRV2-M86, Substitution der As P89 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)
pcHSRV2-M107	basierend auf pcHSRV2, Substitution der As DELED140-144 durch GALAG im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)

PFV Gag Expressionsplasmide:

Plasmidname	Beschreibung
pCZlgag4	CMV Promotor getriebenes Expressionskonstrukt für PFV Gag, in dem die foamyviralen Sequenzen 5' des <i>gag</i> -ORF durch ein CMV Intron A ersetzt wurden (Heinkelein und Rethwilm)
pMC1 Δ7-78	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As V7A/V78S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 77 (diese Arbeit)

Plasmidname	Beschreibung
pMC3 Δ 7-125	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As V7A/S125, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 124 (diese Arbeit)
pMC4 Δ 7-179	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As V7A/S179, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 178 (diese Arbeit)
pMC6 Δ 16-78	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As 16/V78S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 77 (diese Arbeit)
pMC8 Δ 16-125	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As 16/S125, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 124 (diese Arbeit)
pMC9 Δ 16-179	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As 16/S179, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 178 (diese Arbeit)
pMC11 Δ 7-92	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As V7A/E92S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 91 (diese Arbeit)
pMC12 Δ 7-199	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As 16/E92S, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 8 – 198 (diese Arbeit)
pMC13 Δ 16-92	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As V7A/S199, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 91 (diese Arbeit)
pMC14 Δ 16-199	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As 16/S199, Deletion des <i>gag</i> -ORF zwischen As 17 – 198 (diese Arbeit)
pMC48	basierend auf pCZlgag4, Einfügung einer NheI-Schnittstelle in den <i>gag</i> -ORF an der Position As S124A/S125 (diese Arbeit)
pMC50 Δ C310	basierend auf pMC48, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 310, diese Arbeit
pMC51 Δ C482	basierend auf pMC48, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 482 (Δ GRI-III), diese Arbeit
pMC52 Δ C544	basierend auf pMC48, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 544 (Δ GRII&III), diese Arbeit

Material und Methoden

Plasmidname	Beschreibung
pMC53 Δ C594	basierend auf pMC48, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 594 (Δ GRIII), diese Arbeit
pMC60 Δ C297	basierend auf pMC48, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 297, diese Arbeit
pMC61 Δ C276	basierend auf pMC48, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 276, diese Arbeit
pMC62 Δ C212	basierend auf pCZlgag4, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 212, diese Arbeit
pMC63 Δ C180	basierend auf pCZlgag4, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 180, diese Arbeit
pMC64 Δ C166	basierend auf pCZlgag4, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 166, diese Arbeit
pMC65 Δ C133	basierend auf pCZlgag4, Deletion des <i>gag</i> -ORF vom C-Terminus bis zur As 133, diese Arbeit

FFV - Konstrukte im Proviruskontext:

Plasmidname	Beschreibung
pChatul-3	Expressionsplasmid für ein CMV getriebenes FFV Provirus (Roy et al. 2003)
pChatul-3 GagW38A	basierend auf pChatul-3, Substitution der As W38 durch Alanin im <i>gag</i> -ORF (diese Arbeit)

Prokaryotische Expressionsvektoren:

Plasmidname	Beschreibung
pET22b	Vektor zur Expression von Proteinen mit C-terminalem His-Tag in Prokaryoten (Novagen)
pETgag2	basierend auf pET22b, prokaryotischer Vektor zur Expression von PFV Gag As 1 - 625 mit <i>in frame</i> angefügtem C-terminalen His-Tag (diese Arbeit)
pETpol2	basierend auf pET22b, prokaryotischer Vektor zur Expression des PR/RT-Bereiches von PFV Pol (p85 ^{RT} , As 1 - 751) mit <i>in frame</i> angefügtem C-terminalen His-Tag (diese Arbeit)
pETpol3	basierend auf pET22b, prokaryotischer Vektor zur Expression des Integraseanteiles von PFV Pol (p44 ^{IN} , As 751 - 1143) mit <i>in frame</i> angefügtem C-terminalen His-Tag (diese Arbeit)

Weitere verwendete Plasmide:

Plasmidname	Beschreibung
pCDNA3.1zeo	Expressionsvektor mit SV-40 ori und CMV-Promotor/Enhancer, Zeocin Resistenz (Invitrogen)
pCpol2	CMV-Promotor getriebenes PFV Pol Expressionsplasmid (Heinkelein et al. 1998)
pCZlpol1	Expressionskonstrukt für PFV Pol mit CMV-Promotor, in dem die foamyviralen 5' Spleißdonorsequenz durch ein CMV Intron A ersetzt wurde
pczHFVenv EM02	pCDNA3.1zeo mit PFV Env Expressionskassette ohne SD/SA (Lindemann und Rethwilm 1998)
pCenv1	PFV Env Expressionskonstrukt mit intaktem internen SD/SA (Lindemann et al. 1997)
pMD09	PFV Vektor unter Kontrolle eines CMV Promotor/Enhancer mit EGFP-Expressionskassette unter Kontrolle des SFFV U3-Promotors (Heinkelein et al. 2002a)

2.1.7. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden zur Synthese bei den Firmen *MWG-Biotech AG* (Ebersberg) oder *biomers.net* (Ulm) in Auftrag gegeben. Gegenüber der Ursprungssequenz veränderte Nukleotide sind hervorgehoben.

Oligonukleotide für PFV:

Nr.	5'-3' Sequenz	Bemerkung
909	tgacacgaagcttcccgggataggt	Senseprimer für pCZlgag4, bindet 5' des <i>gag</i> -ORF upstream der BamHI-Schnittstelle
910	tacaacgagct agc aaccctc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 77/78 ein
911	tcattagct agc ctcaattagcc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 91/92 ein
912	tccttat gctagc tcttacagacc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 124/125 ein
914	tgctgagagag gctagc acagg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 179/180 ein
916	tggcacagtcgaggctgatcagcg	Antisenseprimer für pCZlgag4 downstream des <i>gag</i> -ORF, 3' der XhoI-Schnittstelle

Nr.	5'-3' Sequenz	Bemerkung
918	tgttcatattcg ctagc attacttctctg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 7/8 ein
919	ttacaac gctagc tcaacatcaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 16/17 ein
971	taccagtag ctagc tctcaggg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 198/199 ein
1121	ttccatgacaattggcgcccaacg	Senseprimer für PFV, bindet im LTR 5' der KasI-Schnittstelle
1122	tcaggaagtaat gctagc gaaatgaac	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 7/8 ein
1123	tgaacttgatgtgaag ctagc ggtg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 16/17 ein
1124	tgaaggatggtggg ctagc attgagag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 46/47 ein
1125	tggtctgtaag gctagc ataagg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt NheI-Schnittstelle bei As 124/125 ein
1126	tacggggtcgaagattatatcc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, bindet 3' der SwaI-Schnittstelle
1217	tccacatatgaatcctcttcagctgttacagccgc	Senseprimer für den PFV <i>pol</i> -ORF, führt NdeI-Schnittstelle am Startcodon ein
1219	ggtatgt catatg tgtgtaatacctcaaaaa	Senseprimer für den PFV <i>pol</i> -ORF, führt bei As 750/751 (Start Integrase-Anteil) ein NdeI-Schnittstelle und ATG ein
1343	ttgaagct gctgt gtaattttaag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L17A Mutation ein
1344	ttacaac agcagc tcaacatc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L17A Mutation ein
1370	tcctcgagataatcaatatac	Senseprimer für pCHSRV2 upstream des <i>gag</i> -ORF, 5' der XhoI-Schnittstelle
1371	tatgaag ctgat gttgaagc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L12A Mutation ein
1372	ttcaacatc agc tcatattc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L12A Mutation ein
1373	tggtgt agc tttaagagatag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt I20A Mutation ein

Nr.	5'-3' Sequenz	Bemerkung
1374	tctctaaag g ctacaaccagagc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt I20A Mutation ein
1375	tggagaagtt g caggtcttcgcc	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt I36A Mutation ein
1376	cgaagacct g caacttctccatgtaaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt I36A Mutation ein
1377	tgaaggatgg g ctggacaaattgag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt W45A Mutation ein
1378	tcaattgtcc g cccatcctcag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt W45A Mutation ein
1379	acaaattgag g catttcagatgg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R50A Mutation ein
1380	tctgaaat g cctcaattgtc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt R50A Mutation ein
1382	tctt g ctatt g cacgtaccatctg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L56&58A Mutation ein
1383	taatgaacct g cacagagacctagatatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L65A Mutation ein
1384	taggtctct g tcaggttcattatcatc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L65A Mutation ein
1385	tacaagat g ctgataatgaacctttac	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt D60A Mutation ein
1386	ttcattatc g catcttctaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt D60A Mutation ein
1413	tgcgct ctcgag attttttccaaatg	Antisenseprimer für den PFV <i>pol</i> -ORF, fügt auf As 1143 ein Stop-Kodon und 3' eine XhoI-Schnittstelle ein
1414	tattac actcgag cacataacttcctt	Antisenseprimer für den PFV <i>pol</i> -ORF, fügt auf As 450/451 XhoI-Schnittstelle ein
1422	ccttactgaagg g cttggggacaaat	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt W44A Mutation ein
1423	ctcaattgtcccca ag ctccttcagtaag	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt W44A Mutation ein
1432	cagatggtac g tcaat g cacaagatgatg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt L56&58A Mutation ein

Nr.	5'-3' Sequenz	Bemerkung
1424	gactagag gtg cactgg cag gtgttctaatac	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt 141DELED→GALAG144 Mutation ein
1425	gagtattaagaacac ctg ccag tg cac ct ctagtc	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt 141DELED→GALAG144 Mutation ein
1453	gatgataatgaag ct ttacag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt P65A Mutation ein
1454	taggtctctgtaaag ct tcatt	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt P65A Mutation ein
1455	cctttacagagag g ctagatag	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt P69A Mutation ein
1456	tacctatatctag ct ctctg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt P69A Mutation ein
1457	gtttatgatatcaggag g ctttagctg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt P89A Mutation ein
1458	ttgaagtcagctaa ag ctcctg	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt P89A Mutation ein
1461	ccag ctcg agatt ag atagctgaatagg	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 310 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
1462	taccctcgaggttagtaagtacg	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 482 und anschließende XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
1463	tggatg ctcg aggttaaggagtc	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 544 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
1474	ttcc ctcg agaccagcagct at ctggg	Antisenseprimer für PFV <i>gag</i> , führt Stop-Codon nach As 594 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
2108	ttgggcttggacttggaggagc ccattgtctattggct tttat	Antisenseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt am N-Terminus das src-Myristilierungssignal ein
2109	ctccaagtccaagcccaaggac gcttcaggaagt aatgtg	Senseprimer für den PFV <i>gag</i> -ORF, führt am N-Terminus das src-Myristilierungssignal ein
2217	gcttatagattgaagggtgattgca	Sensprimer im R-Bereich von PFV
2218	ctcgaatcaagtcggtttattga	Antisenseprimer im U5-Bereich von PFV

Nr.	5'-3' Sequenz	Bemerkung
2263	tgcc tcgaggtggtta aggtggtactgg	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 297 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
2264	ggagctc gaggaatttat cttctcct	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 276 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
2265	ggtgctc gaggttaa atcccaggt	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 212 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
2266	ctcctc gagctta actagatctctcagc	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 180 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
2267	gagctc gagtttaa actcatac	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 166 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein
2268	gtcactc gagctgtt aggccattgtt	Antisenseprimer, führt Stop-Codon nach As 133 und 3' eine XhoI-Schnittstelle in den PFV <i>gag</i> -ORF ein

Oligonukleotide für FFV:

Nr.	5' – 3' Sequenz	Bemerkung
1418	tacatctacgtattagtcacg	Senseprimer für FFV, bindet in der R/U5 Region an SnaI-Schnittstelle
1419	ttcatgctgagctgcagcaccatgagc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, bindet an Bpu1102-Schnittstelle
1420	tgct cgctccaggtgatagatggactagag	Senseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt W38A Mutation ein
1421	tccatctatcacctgcacc agc aggtcctcc	Antisenseprimer für den FFV <i>gag</i> -ORF, führt W38A Mutation ein

2.1.8. Zelllinien

BHK-21:	Hamster-Nierenfibroblastenzelllinie (ATCC: CCL-10)
BHK/LTR(PFV)/lacZ:	BHK-21-Zelllinie mit β -Galactosidase-Expressionskassette unter Kontrolle eines PFV-U3 Promotors (Schmidt und Rethwilm 1995), Selektion mit 1 mg/ml G418.
293T:	Humane embryonale Nierenzellen (ATCC: CRL-1573), die stabil das SV40 Large T-Antigen exprimieren (DuBridge et al. 1987), Selektion mit 0,5 mg/ml G418.
HT1080:	humane Fibrosarkomzelllinie, (ATCC: CCL-121).
Hela :	humane Cervixepithelkarzinomzelllinie (ATCC: CCL-2).
CrFK/LTR (FFV)/lacZ:	Crandell-Feline-Kidney-Zellen mit einem stabil integrierten lacZ-Gen unter Kontrolle des FFV LTR, Selektion mit 0,4 mg/ml Zeocin

2.1.9. Antikörper/Antiseren

Foamyvirale Antikörper/Antiseren:

Kaninchen- α -PFV Gag 011	Polyklonales Serum (Hahn et al. 1994)
Kaninchen- α -PFV Gag 127	Polyklonales Serum (Aguzzi et al. 1993, Hahn et al. 1994)
Kaninchen- α -PFV Env SP 1-86	Polyklonales Serum (Lindemann et al. 2001)
Kaninchen- α -FFV Gag 1-514	Polyklonales Serum (W. Rudolph, pers. Mitt.)
Kaninchen- α -FFV Pol	Polyklonales Serum (W. Rudolph, pers. Mitt.)
Kaninchen- α -FFV Env 2-67	Polyklonales Serum (D. Lindemann, pers. Mitt.)
Maus- α -PFV Gag SGG1	Hybridomaüberstand (Heinkelein et al. 2002a)
Maus- α -PFV IN 3E11	Hybridomaüberstand (Imrich et al. 2000)
Maus- α -PFV RT 15E10	Hybridomaüberstand (Imrich et al. 2000)
Maus- α -PFV Env SU P3E10	Hybridomaüberstand (Duda et al. 2004)

Kommerzielle Antikörper:

Maus- α -HisTag	Hybridomaüberstand (<i>Novagen</i>)
Esel- α -Kaninchen IgG-AP	Polyklonaler Antikörper (<i>Sigma</i>)
Schwein- α -Kaninchen IgG-HRP	Polyklonaler Antikörper (<i>DakoCytomation</i>)
Ziege- α -Maus IgG-HRP	Polyklonaler Antikörper (<i>DakoCytomation</i>)
Ziege- α -Kaninchen IgG-FITC	Polyklonaler Antikörper (<i>Sigma-Aldrich</i>)

2.1.10. Kommerzielle Methodenkits

Bezeichnung:	Hersteller:
Big Dye DNA Sequencing Kit	<i>ABI-PRISM</i>
ECL ⁺ Western Blotting Detection Kit	<i>Amersham Biosciences</i>
TOPO-TA-Cloning [®] Kit	<i>Invitrogen</i>
NucleoSpin [®] Extract-Kit	<i>Macherey-Nagel</i>
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen</i>
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen</i>
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
Polyfect [®] Transfection Reagent	<i>Qiagen</i>
Mouse-IgG-ELISA	<i>Roche</i>
LightCycler FastStart DNA Master	
SYBR Green I	<i>Roche</i>

2.1.11. Weitere Materialien

Agfa Curix 100 NIF	<i>Agfa Röntgenfilm</i>
Nylonmembran (HYBOND [™])	<i>Amersham Bioscience</i>
AutoSequ [™] G-50-Säulchen	<i>Amersham Bioscience</i>
OptiPrep [™]	<i>Axis-Shield</i>
Protease Inhibitor Cocktail Set II	<i>Calbiochem, Kat.-Nr. 539134</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Gibco-BRL</i>
G418	<i>Gibco-BRL</i>
Disposable Columns 5 ml	<i>Qiagen, Kat.-Nr. 1018597</i>
Watman-Filterpapier	<i>Schleicher & Schuell</i>
His-Bind [®] Resin, 50 ml	<i>Novagen, Kat.-Nr. 69670</i>

2.2. Puffer und LÖSUNGEN

2.2.1. Bakterienkultur

5x LB-Medium

LB Broth Base Lennox L 100 g (Invitrogen, Kat.-Nr. 12780-029, enthält 50 g Pepton, 25 g Hefeextrakt und 25 g NaCl)

Ad 1000 ml H₂O_{dest.} autoklavieren.

LB Agar

Difco LB Agar 20 g (Becton & Dickinson, Kat.-Nr. 244520)

Ad 1000 ml H₂O_{dest.}, autoklavieren.

Vor dem Gießen der Agarplatten wird das jeweilige Antibiotikum bei einer Agartemperatur nicht über 60°C zugegeben.

SOC-Medium

2 % Bacto Trypton

0,5 % Bacto yeast extract

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂ x 6 H₂O

10 mM MgSO₄ x 7 H₂O

20 mM Glucose

Ad 500 ml H₂O_{dest.}, autoklavieren.

2.2.2. Lösungen und Puffer zur Analyse und Klonierung von DNA

Plasmidpräparations-Lösung I

50 mM Glucose

25 mM Tris/HCl, pH 8,0

10 mM Na₂-EDTA, pH 8,0

Vor Gebrauch erfolgt die Zugabe von 5 mg/ml Lysozym.

Plasmidpräparation-Lösung II

1% SDS

200 mM NaOH

Plasmidpräparation-Lösung III

3 M Kaliumacetat

Die Lösung wird mit konzentrierter Essigsäure auf pH 4,8 eingestellt.

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0

RNase-Lösung

2 mg/ml werden in TE-Puffer gelöst.

1x TAE-Puffer

40 mM Tris-Base

1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0

20 mM Essigsäure

Die Lösung wird als 50x Stammlösung angesetzt und bei Bedarf mit H₂O_{dest.} verdünnt.

6x Bromphenolblaupuffer

40 % Saccharose

0,125 % Bromphenolblau

0,1 % SDS

3 M Natriumacetat pH 5,2

3 M Natriumacetat

Den pH 5,2 mit konzentrierter Essigsäure einstellen, autoklavieren.

Transformationspuffer I

30 mM Kaliumacetat

100 mM RbCl₂

10 mM CaCl₂

50 mM MnCl₂

15 % Glycerin

Den pH 5,8 mit konzentrierter Essigsäure einstellen, 0,2 µm steril filtrieren.

Transformationspuffer II

10 mM MOPS

100 mM RbCl₂

75 mM CaCl₂

15 % Glycerin

Den pH 6,5 mit 1 M KOH einstellen, 0,2 µm steril filtrieren.

2.2.3. Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden

10x PBS

- 1,4 M NaCl
- 2,0 M KCl
- 65 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- 15 mM KH₂PO₄

2x Probenpuffer für Proteinproben

- 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 4 % SDS
- 20 % Glycerin
- 10 % β-Mercaptoethanol
- 0,1 % Bromphenolblau

Tricine Gel Puffer

- 3 M Tris-HCl, pH 8,45
- 0,3 % SDS

10x Anoden Puffer

- 2 M Tris-HCl, pH 8,9
- Vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt.

5x Kathoden Puffer

- 500 mM Tris-Base
- 500 mM Tricine
- 0,5 % SDS
- Vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt.

Western Blot Puffer

- 50 mM Tris
- 40 mM Glycin
- 0,037 % SDS
- Vor Gebrauch wird dem Puffer 25 % Methanol zugesetzt.

Western Blot Waschpuffer

- 1x PBS versetzt mit 0,5 % Tween-20.

Western Blot Blockierungslösung

1x PBS versetzt mit 4 % handelsüblichem Magermilchpulver.

“Stripping” Puffer

100 mM β -Mercaptoethanol

2 % SDS

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,2

Selfmade ECL

Lösung A

0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

500 mM Luminol

90 mM p-Cumarsäure

Lösung B:

0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

0,0066 % Wasserstoffperoxyd H_2O_2 (wird unmittelbar vor Gebrauch zugegeben)

Lösung A wird unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:2 mit Lösung B gemischt.

Alkalische Phosphatase Puffer

100 mM Tris

100 mM NaCl

5 mM $MgCl_2$

NBT Stock Solution

5 % NBT (Nitro Blau Tetrazolium, Sigma, Kat.-Nr. N5514) wird in 70 % Dimethylformamid gelöst und aliquotiert bei $-20^\circ C$ gelagert (Blake, M.S., 1984).

BCIP Stock Solution

5 % BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, Sigma, Kat.-Nr. B0274) wird in 100 % Dimethylformamid gelöst und aliquotiert bei $-20^\circ C$ gelagert.

IPTG

100 mM in H_2O ansetzen, bei $-20^\circ C$ lagern.

Coomassie Stain - Lösung

0,25 % Coomassie Brilliant Blue G (Sigma-Alderich, Kat.-Nr. B-0770)

45 % Methanol

10 % Essigsäure

Ad 1000 ml H₂O_{dest.}

Coomassie Destain - Lösung

15 % Methanol

5 % Essigsäure

Ad 1000 ml H₂O_{dest.}

8x Binding Buffer

40 mM Imidazol

4 M NaCl

160 mM Tris

Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 7,9 eingestellt, vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt und 6 M Harnstoff zugesetzt.

8x Charge Buffer

400 mM NiSO₄

Vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt und 6 M Harnstoff zugesetzt.

8x Wash Buffer I

480 mM Imidazol (Endkonzentration 60 mM)

4 M NaCl

160 mM Tris

Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 7,9 eingestellt, vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt und 6 M Harnstoff zugesetzt.

8x Wash Buffer II

640 mM Imidazol (Endkonzentration 80 mM)

4 M NaCl

160 mM Tris

Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 7,9 eingestellt, vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt und 6 M Harnstoff zugesetzt.

4x Elute Buffer

4 M Imidazol

2 M NaCl

160 mM Tris

Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 7,9 eingestellt, vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt und 6 M Harnstoff zugesetzt.

4x Stripping Buffer

400 mM EDTA

2 M NaCl

80 mM Tris

Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 7,9 eingestellt, vor Gebrauch wird die Stammlösung mit H₂O_{dest.} verdünnt.

Dialysepuffer

150 mM NaCl

1 mM EDTA, pH 5,0

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

2.2.4. Medien, Lösungen und Puffer für zellbiologische Methoden

D-MEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX I, Natriumpyruvat, Pyridoxin, 4500 mg/l D-Glucose von *GIBCO™* (*Invitrogen*, Kat.-Nr. 31966-021).

D-MEM (komplett)

D-MEM mit fötalem Rinderserum (*GIBCO™*, Endkonzentration = 10%, *Invitrogen*, Kat.-Nr. 10270-106) und Penicillin-Streptomycin-Lösung (*GIBCO™*, *Invitrogen*, Endkonzentration = 10µg/ml) versetzt.

1x Trypsin-EDTA

0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A ohne Ca²⁺- und Mg²⁺- Ionen, mit Phenolrot (*GIBCO™*, *Invitrogen*, Kat.-Nr. 25300-054).

1x PBS

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2; ohne CaCl₂ und MgCl₂ (*GIBCO™*, *Invitrogen*, Kat.-Nr. 10010-015).

2 M Kalziumchlorid (CaCl₂):

2 M CaCl₂

0,45 µm steril filtrieren.

2x HBS

50 mM HEPES

10 mM KCl

12 mM Dextrose x H₂O

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

Den pH (6,9 – 7,2) mit 1 M KOH einstellen, 0,45 µm steril filtrieren.

Der optimale pH wird mittels Testtransfektionen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz für jede Charge neu ermittelt.

50x Na-Butyrat

500 mM Na-Butyrat

Mit 1x PBS auffüllen und durch 0,45 µm Filter steril filtrieren.

Lysispuffer I

20 mM Tris-HCl pH 7,4

300 mM NaCl

1% Na-Desoxycholat

1% Triton X-100

0,1% SDS

Lysispuffer II

10 mM Tris-HCl pH 7,5

140 mM NaCl

1mM EDTA pH 8,0

1% Triton X-100

250 mM Saccharose

lacZ-Fixierlösung

0,5 % Glutaraldehyd in PBS

lacZ-Färbelösung

4 mM $K_3Fe(CN)_6$ (400 mM Stammlösung, bei 4 °C gelagert)
4 mM $K_4Fe(CN)_6$ (400 mM Stammlösung, bei 4 °C gelagert)
2 mM $MgCl_2$ (200 mM Stammlösung, bei 4 °C gelagert)
0,4 mg/ml X-Gal (400 mg/ml Stammlösung, bei -20 °C gelagert)
Mit 1x PBS auffüllen.

FACS-Puffer

2 % Natriumazid
0,1 % BSA
In 1x PBS verdünnt.

Cacodylat-Puffer

0,05 M Cacodylsäure
In $H_2O_{dest.}$ verdünnen, die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 7,9 eingestellt.

Fixierpuffer für EM-Proben

2,5% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer ansetzen.

2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, in kurzer Zeit große Mengen eines definierten DNA-Abschnittes herzustellen. Zunächst wird die Matrizen-DNA in einer Denaturierungsphase durch hohe Temperatur (95 °C) in Einzelstränge getrennt. In der folgenden Hybridisierungsphase bindet ein Paar von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) bei geeigneter Temperatur (z.B. 55 °C) über komplementäre Basenpaarung an die Zielsequenz. In der Elongationsphase synthetisiert eine thermostabile Polymerase die Zielsequenz zwischen den Primern. Dieser Reaktionszyklus wird mehrfach (typischerweise 25-35 Mal) wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Anreicherung der Zielsequenz im Reaktionsgemisch kommt (Griffin und Griffin 1994).

Je nach Bedarf ist es möglich, über geeignete Wahl der Primer spezifische Mutationen in die Zielsequenz einzuführen, oder über zusätzlich kodierte Schnittstellen an den Enden der Primer eine spätere Klonierung des Amplifikats zu erleichtern.

Nachfolgend ist ein typischer Reaktionsansatz beschrieben, wie er für die Amplifikation von DNA-Sequenzen für weitergehende Klonierungsarbeiten verwendet wird:

Template (cDNA)	100 pg
10 mM dNTPs	5 µl
10x Polymerasepuffer	5 µl
20 pmol Senseprimer	1 µl
20 pmol Antisenseprimer	1 µl
DNA-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl

Ad 50 µl H₂O.

Je nach verwendeter Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) müssen dem Reaktionsansatz noch 5 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung zur Stabilisierung der Polymerase hinzugefügt werden.

Das Standardprogramm für die Amplifikation beinhaltet:

- 94°C – 120 sec (Initiale Denaturierungsphase)
 - 94°C - 10 sek (Denaturierung)
 - 55°C bis 60°C - 45 sek (Hybridisierung)
 - 72°C – 1 min / kBp (Elongation)
- 35 Zyklen
- 72°C – 4 min (finale Elongationsphase)
 - 4°C – ∞ (Abkühlungsphase).

Für die Einführung von Einzelmutationen in eine DNA-Sequenz wird die Standard-PCR in einer modifizierten Form verwendet. In einem ersten Schritt werden mittels PCR zwei Einzelfragmente hergestellt, die eine Sequenzüberlappung von 20 – 30 Nukleotiden aufweisen. Im Überlappungsbereich wird über die verwendeten homologen Primer die erwünschte Mutation eingeführt. Nach Isolation und Aufreinigung der beiden PCR-Fragmente werden 50 – 100 ng als Template für eine zweite PCR verwendet. Die Reaktion wird nach dem Standardprotokoll angesetzt (siehe oben), allerdings ohne zunächst Oligonukleotide als Primer hinzu zufügen.

Das PCR-Programm wird wie folgt modifiziert:

- 94°C - 10 sec (Denaturierung)
- 55°C bis 60°C - 45 sec (Hybridisierung)
- 72°C – 1 min / kBp (Elongation)

→ 6 Zyklen

Hold : Zugabe von je 1 µl 20 pmol Sense- und Antisenseprimer

- 94°C - 10 sec (Denaturierung)
- 55°C bis 60°C - 45 sec (Hybridisierung)

72°C – 1 min / kBp (Elongation)

→ 35 Zyklen.

In den ersten 6 Zyklen der PCR kommt es in der Hybridisierungsphase nicht nur zur 100% homologen Paarung von Strang und Gegenstrang der beiden jeweiligen PCR-Fragmente, sondern auch zur Paarung von Strang und Gegenstrang an den Überlappungsabschnitten zwischen den beiden PCR-Fragmenten. Der ungepaarte Teil kann dann als Matrize für die DNA-Polymerase dienen, so dass DNA-Fragmente entstehen, die über die volle Länge beider Teilfragmente reichen. Durch Zugabe der spezifischen Primer, die jeweils an den Enden des Gesamtfragmentes binden, wird dieses dann im zweiten Teil der PCR exponentiell vermehrt und kann anschließend mittels Aufreinigung über ein Agarosegel isoliert werden (siehe Kapitel 2.3.4).

2.3.2. Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning-Kit

Die Taq-Polymerase produziert bei einer PCR keine DNA-Fragmente mit glatten Enden, sondern fügt mit Hilfe einer unspezifischen, terminalen Transferase-Aktivität einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts an (Clark 1988). Dadurch lassen sich die PCR-Fragmente sehr effizient in linearen Vektoren mit überhängenden 3'-Thymidin-Resten klonieren.

Eine Variante dieser Klonierungsstrategie bietet der TOPO-TA-Cloning-Kit (*Invitrogen*) an. Statt einer Ligase wird für die Ligation des PCR-Fragmentes ein mit der Topoisomerase I „aktivierter“ Vektor (pCR[®]II-TOPO) verwendet.

Für die Klonierung werden kurz zuvor mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Fragmente verwendet, die über ein Gel aufgereinigt wurden (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.3.4). Pro Reaktionsansatz wird 0,5 bis 1 µl Vektor eingesetzt. Dazu werden 0,4 bis 4 µl PCR-Produkt und zusätzlich 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) gegeben. Die Reaktion wird gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden chemisch kompetente Bakterien mit dem Reaktionsgemisch nach Angaben des Herstellers transformiert (siehe Kapitel 2.3.12).

2.3.3. DNA-Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente können der Größe nach in Agarosegelen aufgetrennt werden, an denen eine elektrische Spannung angelegt wird. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld Richtung Kathode. Der Auftrennungsbereich ist abhängig von der Porengröße innerhalb der Agarosematrix, welche über die Agarosekonzentration eingestellt werden kann. Je nach Größe der zu trennenden DNA-

Fragmente werden 0,6 – 1,2 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wird eingewogen, in TAE-Puffer aufgekocht und kurz vor dem Gießen (ca. 60°C Lösungstemperatur) mit 4 µl pro 100 ml Agaroselösung einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt. Die DNA-Proben werden mit 6x Bromphenolblaupuffer versetzt, in die Taschen des Gels geladen und in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Kammer unter Anlegen einer Spannung von 0,8 – 1,2 V/cm aufgetrennt. Unter UV-Licht können die DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden, da der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid fluoresziert. Dies geschieht entweder mit Hilfe einer UV-Handlampe oder eines Transilluminator (GelDoc 2000, Bio-Rad).

2.3.4. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragmente werden unter schwacher UV-Beleuchtung ausgeschnitten und können anschließend mit Hilfe des QIAEX-II-Kit (*Qiagen*) oder des NucleoSpin®Extract-Kit (*Macherey und Nagel*) aus der Agarose aufgereinigt und eluiert werden.

Bei beiden kommerziellen Kits wird die Agarose zunächst in einem Hochsalzpuffer aufgelöst und anschließend die DNA durch Bindung an eine positiv geladene Silikon-Säule aus dem Puffer herausgefangen. Nach mehreren Waschgängen erfolgt die Elution von der Säule mit einem Niedersalzpuffer oder Aqua dest.

2.3.5. Restriktionsverdau von DNA

Prokaryotische Restriktionsendonukleasen (Endodesoxyribonukleasen der Klasse II) spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch, die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym ist meist ein palindromischer Sequenzabschnitt. Die DNA wird entweder an den komplementären Strängen um mehrere Nukleotide versetzt gespalten, so dass einzelne 3'- oder 5'-Überhänge entstehen (klebrige Enden), oder beide Stränge werden zwischen den gleichen Basenpaaren getrennt, so dass Enden ohne Überhang entstehen (glatte Enden). Restriktionsspaltungen werden analytisch zur Überprüfung von Plasmiden anhand der resultierenden charakteristischen Bandenmuster durchgeführt oder präparativ für weiterführende Klonierungsschritte.

Typischer Restriktionsansatz:

	Analytisch	Präparativ
DNA	0,2 - 1 µg	2-5 µg
10x Puffer	2 µl	5 µl
Enzym	5 U	10 - 20 U
H ₂ O	ad 20 µl	ad 50 µl

Der geeignete Puffer wird dabei nach Angaben des Herstellers ausgewählt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Puffern der Firma *MBI-Fermentas* ist bereits BSA enthalten, so dass dieses nicht gesondert zum Ansatz hinzugegeben werden muss.

Eine Enzyeinheit (1U) ist definiert als die Menge eines Enzyms, die benötigt wird, um unter optimalen Bedingungen in 50 µl Reaktionsansatzvolumen 1 µg Substrat-DNA in 1 h zu verdauen (Ausubel et al. 1987). Restriktionsspaltungen werden 1,5 h bis über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.3.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation insbesondere größerer DNA-Fragmente (> 4 kb) nach einem Restriktionsverdau in einer Ligationsreaktion zu verhindern, wird ein linearisiertes DNA-Fragment an den 5'-Enden mit Hilfe des Enzyms Alkalische Kälberdarmphosphatase (CIAP: Calf intestine alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Nach Restriktionsverdau und Aufreinigung des DNA-Fragmentes (siehe vorhergehende Kapitel) werden 10 U des Enzyms zusammen mit dem enzymspezifischen Puffer in das wässrige DNA-Eluat gegeben und für 1 – 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym durch Erhitzung auf 85°C für 15 min nach Angaben des Herstellers inaktiviert.

2.3.7. Verdau von 3'- Überhängen mit der T4-Polymerase

Neben seiner 5'→3' Polymeraseaktivität besitzt die T4-DNA-Polymerase auch eine 3'→5' Exonukleaseaktivität und kann deshalb auch für die Glättung von 3'-Überhängen eingesetzt werden.

Zu diesem Zweck werden 1 U des Enzyms zusammen mit 0,1 mM dNTP-Mix, 1x Reaktionspuffer und 1 – 2 µg DNA für 20 min bei 11°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym durch Erwärmung auf 70°C für 10 min inaktiviert und die DNA durch eine nachfolgende Phenol/Chloroform-Extraktion aus dem Ansatz gereinigt und durch Ethanolfällung aufkonzentriert.

2.3.8. Präzipitation von DNA

Zur Aufkonzentrierung oder Entsalzung von DNA-Lösungen wird die DNA mit Ethanol oder Isopropanol aus der wässrigen Lösung gefällt. Dabei entzieht Ethanol oder Isopropanol in Verbindung mit einer erhöhten Salzkonzentration den DNA-Molekülen die Hydrathülle, wodurch diese aggregieren und präzipitieren.

Zu der DNA-Lösung werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen Ethanol oder 0,6 Volumen Isopropanol geben, die Lösung gut gemischt und mindestens 15

min bei RT zentrifugiert (14 000 rpm, Tischzentrifuge). Der Überstand wird verworfen, das Pellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in der gewünschten Menge H₂O resuspendiert.

2.3.9. Phenol-Chloroform Extraktion von DNA

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

Der Ablauf der Extraktion sieht dabei folgendermaßen aus:

- Zugabe von einem Volumen Phenol, vortexen.
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14 000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- Zugabe von einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), vortexen.
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14 000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- Zugabe von einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), vortexen.
- 3 min zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14 000 rpm).
- Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.

Durch eine anschließende Alkoholfällung wird die DNA präzipitiert und eventuelle Phenolreste aus der Lösung entfernt.

2.3.10. Ligation von linearen DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente werden durch den Aufbau von Phosphordiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyende des einen Fragmentes und dem 5'-Phosphatende eines weiteren Fragmentes miteinander verknüpft. Diese Reaktion wird von einer Ligase ATP-abhängig katalysiert. Dazu müssen die DNA-Enden entweder komplementäre einzelsträngige Überhänge (klebrige Enden) oder keine Überhänge (stumpfe Enden) haben. Das molare Verhältnis Vektor zu Insert sollte eins zu drei betragen.

Standardligationsansatz :

T4 DNA Ligasepuffer	2 µl
DNA	100 - 500 ng
T4 DNA Ligase	1 µl (5 WU)
H ₂ O	ad 20 µl

Eine Weiss-Unit (WU) entspricht 200 Kohäsive-Enden-Ligationseinheiten. Eine Kohäsive-Enden-Ligationseinheit ist die Menge Enzym, die zur 50% Ligation von *HindIII* verdauten λ -DNA-Fragmenten unter standardisierten Bedingungen benötigt wird (30 min bei 16°C, Konzentration der 5'-Enden von 0,12 μ M, Ansatzvolumen von 20 μ l).

Die Ligationsansätze werden über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.3.11. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien

Die für Transformationen verwendeten Bakterien werden im Labor auf folgende Weise chemisch kompetent gemacht. Aus einer bei -80°C in Glycerin gelagerten Stammkultur werden 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert (Bakterienschüttler, 180 rpm). Am nächsten Morgen werden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft. Diese Kultur wird bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,2 - 0,3 kultiviert, anschließend für 5 min auf Eis inkubiert, auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und 10 min bei 4°C abzentrifugiert (2 500 rpm, Multifuge 4 KS-R, Heraeus). Der Überstand wird verworfen, die Sedimente in jeweils 20 ml Transformationspuffer 1 aufgenommen, vereinigt und erneut für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (2500 rpm, Multifuge 4 KS-R, Heraeus). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wird die Bakteriensuspension aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.3.12. Transformation von DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien

Unter Transformation wird in der Molekularbiologie das Einbringen von DNA in Bakterien- oder Hefezellen verstanden. In diesem Fall war es das Ziel, die eingebrachte Plasmid-DNA in den Bakterien zu vermehren und in großer Menge anschließend wieder zu isolieren (Kapitel 2.3.13). Dazu werden chemisch kompetente *E.coli*-Stämme einem Hitzeschock ausgesetzt, der die Bakterien zwingt, die Plasmid-DNA aufzunehmen. Um ihre Kompetenz zu erlangen, wurden die Bakterien im Vorfeld mit eiskaltem CaCl₂/RbCl₂ behandelt und schockgefrostet bei -80°C gelagert (siehe vorhergehendes Kapitel).

Klassische Transformation

Zu 100 μ l frisch aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen wird das Volumen eines Ligationsansatzes pipettiert, für 30 min auf Eis inkubiert, über 60 sek einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend wieder für 3 min auf Eis gekühlt. Der Ansatz wird dann mit 500 μ l SOC-Medium aufgefüllt und über 45 - 60 min bei 37°C inkubiert. Abschließend werden die Bakterien bei 3000 rpm für 3 min sedimentiert, in ca. 100 μ l Überstand

resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert, die mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt wurden.

Quick Transformation

Diese Methode eignet sich zur schnellen Transformation von Plasmiden. Wegen der relativ niedrigen Transformationseffizienz sollten nur etablierte Plasmide auf diese Weise transformiert werden. 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen werden mit 0,5 - 1 µg (Maxi-Präparation gereinigter) oder 5 - 10 µl (Mini-Präparation gereinigter) Plasmid-DNA vermischt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend direkt auf eine vorgewärmte (30 min bei 37°C) LB- Agarplatte mit Antibiotikum ausplattiert.

2.3.13. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini- bzw. Midi-Präparation)

Sowohl die Aufbereitung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien (3 ml Übernachtskultur, Mini-Präparations-Ansatz) zu analytischen Zwecken als auch die präparative Reinigung größerer Mengen DNA (200 ml Übernachtskultur, Maxi-Präparations-Ansatz) werden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt (Birnboim und Doly 1979). Dabei werden die Bakterien in einer NaOH/SDS-Lösung lysiert. Die alkalischen Bedingungen führen zur Denaturierung der bakteriellen Proteine, der chromosomalen DNA und der Plasmid-DNA. Das alkalische Lysat wird anschließend mit 3 M Kaliumazetat Lösung neutralisiert. Bei der sich einstellenden hohen Salzkonzentration präzipitieren die bakteriellen Proteine und Zelltrümmer mitsamt der chromosomalen DNA, während die Plasmid-DNA in renaturierter Form in Lösung bleibt und abgetrennt werden kann. Im einzelnen werden nun die unterschiedlichen Methoden beschrieben.

Mini-Präparation nach der TENS-Methode

Mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen wird jeweils eine Kolonie von einer Transformantenplatte in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wird 1,5 ml dieser Übernachtskultur bei 14 000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl TENS-Puffer resuspendiert. Nach mehrmaligen Mischen werden dem Ansatz 150 µl Natriumazetat (pH 5,2) hinzugefügt, erneut mehrmals gemischt und anschließend für 5 min bei 14 000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein frisches Gefäß überführt, mit 900 µl eiskalten 100 % Ethanol präzipitiert und für 5 min bei 14 000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Das Pellet wird zweimal mit je 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Zum Verdau der bakteriellen

RNA wird 2 µl RNase A (2 mg/ml) zugegeben und der Ansatz 15 Min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Plasmid-DNA einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen.

Mini-Präparation mit dem Qiaprep[®] Spin Miniprep. Kit (*Qiagen*)

Zeigt ein Klon nach analytischen Restriktionsverdau ein korrektes Spaltungsmuster, erfolgt eine Mini-Präparation der Plasmid-DNA mit dem *Qiaprep[®] Spin Miniprep. Kit*. Die Verwendung des Kits ermöglichte die Isolation hochreiner Plasmid-DNA zur anschließenden Sequenzierung. Das Prinzip dieses Kits beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Die Aufreinigung erfolgte anschließend über eine Anionen-Austausch-Säule des Herstellers. Nach Elution der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde diese anschließend mit Isopropanol aus den Elutionspuffer ausgefällt. Die Präparation erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers (*Qiagen Plasmid Purification Handbook, Qiagen, Dez. 2002*).

Maxi-Präparation

150 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, wird mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Durch eine 12 minütige Zentrifugation bei 4°C und 5 000 rpm (Polypropylen Flaschen 69 x 160 mm, JA-50 Rotor Beckman Coulter) werden die Bakterien abzentrifugiert, das Pellet in 5 ml Plasmidpräparations-Lösung I resuspendiert und mit 150 µl RNase A (2 mg/ml) für 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wird 5 ml Plasmidpräparations-Lösung II zugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wird die Fällung der Zelltrümmer und der chromosomalen DNA durch die Zugabe von 10 ml Plasmidpräparations-Lösung III eingeleitet. Wiederum nach 5 min Inkubation auf Eis wird der Ansatz für 17 min bei 17 000 rpm (Polyallomer Tubes 29 x 104 mm, JA-25 Rotor, Beckman Coulter) zentrifugiert und der Überstand durch Gaze in ein neues Gefäß filtriert. Durch Zugabe von 12 ml Isopropanol wird die Plasmid-DNA ausgefällt und über eine weitere Zentrifugation bei 17 000 rpm (Polyallomer Tubes 29 x 104 mm, JA-25.50 Rotor, 17 min, RT) sedimentiert. Das Pellet wird mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 1 ml TE-Puffer aufgenommen. Anschließend wird die DNA-Lösung in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit 25 µl RNase A (2 mg/ml) einem weiterem RNase-Verdau unterzogen (45 min bei 37°C). Zur Inaktivierung der RNase A und zur Abtrennung von Proteinverunreinigungen wird der Ansatz einer Phenol-Chloroform Extraktion unterzogen und die Plasmid-DNA anschließend mit Isopropanol ausgefällt (siehe Kapitel 2.3.9).

Maxi-Präparation mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*)

Ein Teil der Maxi-Präparationen wurde mit dem *Plasmid Maxi Kit* durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen, die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt über eine Anionen-Austausch-Säule des Herstellers. Nach Elution der aufgereinigten Plasmid-DNA von der Säule wurde diese anschließend mit Isopropanol aus den Elutionspuffer ausgefällt (siehe Kapitel 2.3.8). Die Präparation erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers (*Qiagen Plasmid Purification Handbook, Qiagen, Dez. 2002*).

2.3.14. Spektrometrische Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der π -Elektronen der konjugierten Doppelbindungen ihrer Basen ultraviolettes Licht mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 257 nm. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus dem OD_{260} -Wert, der Verdünnungskonzentration und einem für dsDNA (50), ssDNA (37) und RNA (40) spezifischen Multiplikationsfaktor.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wird zusätzlich die Extinktion bei 280 nm gemessen. Da Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzen, gibt der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} Aufschluss über den Grad der Verunreinigung der DNA/RNA-Probe mit Proteinen. Eine proteinarme Nukleinsäurelösung weist eine OD -Quotienten $_{260/280}$ zwischen 1,8 – 2,0 auf.

Die Messung aufgereinigter Plasmidlösungen erfolgt in Quarzküvetten (400 μ l, Schichtdicke 10 mm) mit einem BioPhotometer der Firma Eppendorf.

2.3.15. Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung von Klonierungsprodukten werden diese mit dem ABI-PRISM™310 Genetic Cycler (*Applied Biosystems*) sequenziert. Das System beruht auf der Methode des stochastischen Kettenabbruchs nach Sanger. In einer PCR-Reaktion mit nur einem Oligonukleotid als Primer und unter Zusatz von mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs werden DNA-Fragmente variabler Länge produziert, deren Basenkette jeweils nach Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs abbricht. Die Reaktion wird von der AmpliTaq FS Polymerase katalysiert.

Reaktionsansatz:

2 μ l Big-Dye Mix (*Applied Biosystems*, enthält die Polymerase, markierte ddNTPs sowie dNTPs)

0,5 - 1 μ g DNA

10 pmol Oligonukleotid

H₂O ad 10 µl.

Thermozyklerprogramm:

96°C - 20 sec (Denaturierung)

50°C - 15 sec (Hybridisierung)

60°C - 4 min (Elongation)

→ 30 Zyklen.

Die PCR-Ansätze werden zur Entfernung nicht eingebauter, fluoreszenzmarkierter dNTPs über AutoSeqTMG50-Säulchen (*AmershamBioscience*) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Eluat wird im Vakuumtrockner eingedampft, das Pellet in 15 µl TSR-Puffer (Template Supression Reagent, *Applied Biosystems*) resuspendiert, für 2 min bei 95°C denaturiert und bis zur automatischen Analyse bei 4°C gelagert.

2.4. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.4.1. Kultivierung adhärenter Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien werden in „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und einer Antibiotikabeigabe (DMEM komplett) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in 25 cm²- oder 75 cm²-Zellkulturflaschen gehalten. Die hier beschriebenen Zelllinien bilden nach 2 bis 4 Tagen einen 80 - 100 % konfluenten Zellrasen, der eine Vereinzellung („Splitten“) nötig macht. Dazu wird der Zellrasen kurz mit PBS gespült und mit 0,5 bis 1 ml Trypsin abgelöst. Die Zellen werden dann in frischem DMEM komplett resuspendiert, vereinzelt und ein Teil der Resuspension weiter kultiviert.

2.4.2. Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen fremder Nukleinsäuren (z.B. DNA in Plasmidform) in eukaryotische Zellen. Gelangt eine eingeschleuste Nukleinsäure in den Zellkern der Zielzelle, werden dort auf der fremden Nukleinsäure kodierte Gene von dem zellulären Transkriptionsapparat abgelesen, wenn die entsprechenden cis-aktiven Sequenzen vorhanden sind. Allerdings handelt es sich hierbei nur um eine vorübergehende (transiente) Expression der Fremdgene, da die fremden Nukleinsäuren im Laufe der fortlaufenden Zellteilungen verloren gehen. Bei Verwendung der 293T-Zelllinie kann dieser Effekt zumindest teilweise umgangen werden. Diese Zelllinie bildet stabil das Simian Virus 40 (SV-40) große T-Antigen, das an den SV-40 Replikationsstartpunkt (ori) bindet und dabei

durch seine Helikase-Aktivität und die Interaktion mit zellulären DNA-Polymerasen und anderen Enzymen eine DNA-Replikation initiiert (Cole 1996). Der SV-40 ori war auf allen verwendeten Plasmiden codiert.

Die Aktivität des CMV-Promotors, der bei den meisten verwendeten Konstrukten als cis-aktives Element die Genexpression antreibt, kann durch die Zugabe von Natriumbutyrat stimuliert werden (Soneoka et al. 1995). Deshalb werden die Zielzellen 24 h nach Transfektion mit 10 mM Natrium-Butyrat für 6 – 8 h induziert, anschließend erfolgt ein Mediumwechsel.

In dieser Arbeit wurden zwei Transfektionsmethoden verwendet: Die Kalziumphosphat-Transfektion von 293T-, HT1080- und Hela-Zellen (Standardmethode für die meisten Fragestellungen) und die Polyfect-Transfektion von 293T-Zellen für die Produktion hoher Virustiter.

Kalziumphosphat-Transfektion

Die Kalziumphosphat-Transfektion ist eine effiziente Transfektionsmethode für eine Reihe von Zelllinien. Sie hat jedoch den Nachteil, dass relativ viel DNA eingesetzt werden muss und das Transfektionsmedium recht toxisch ist. Der genaue Transfektionsmechanismus ist nicht bekannt, man geht davon aus, dass die DNA an Kalziumphosphatkristalle gebunden und durch Endozytose aufgenommen wird.

Einen Tag (18 - 20 h) vor der Transfektion werden $1,5 \times 10^5$ (HT1080, Hela) – $1,6 \times 10^6$ (293T) Zellen pro 6 cm-Schale in 4 ml Medium ausgesät. Die Transfektion wird folgendermaßen durchgeführt:

- 15 – 20 µg DNA mit 330 – 335 µl H₂O und 50 µl 2 M CaCl₂ mischen;
- Transfektionsmix mit 400 µl 2x HBS mischen, sofort auf Zielzellen geben;
- Medium nach 7 - 8 h gegen 4 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium wechseln.

Die Aufarbeitung der transfizierten Zellen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, 48 h nach Transfektion.

Transfektion mit Polyfect (Qiagen)

Die Funktionsweise dieses Transfektionsreagenzes beruht auf einer Komplexbildung der Plasmid-DNA mit nicht-liposomalen Makromolekülen, die an negativ geladene Rezeptoren der eukaryotischen Zelle binden (z.B. sialysierte Glykoproteine). In die Zellen eingetreten ist die Substanz verantwortlich für die Pufferung der Lysosome, 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. Das Transfektionsreagenz ist nicht toxisch und muss nach der Transfektion nicht abgenommen

werden. Die Transfektion mit Polyfect wurde zur Produktion hoher Virustiter auf 293T-Zellen verwendet.

Die Transfektion erfolgt leicht modifiziert nach dem Protokoll des Herstellers. Einen Tag vor Transfektion werden $1,6 \times 10^6$ 293T-Zellen pro 6 cm-Schale in 3 ml Medium ausgesät. Am Tag der Transfektion werden 6 μg Gesamt-DNA mit 150 μl DMEM und 30 μl Transfektionsreagenz vermischt und für 10 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Medium von den Zielzellen abgenommen und mit 3 ml frischem, komplettem DMEM aufgefüllt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 1 ml komplettes DMEM zum Transfektionsansatz hinzugegeben und dieser zügig auf die Zielzellen transferiert. Am nächste Tag erfolgt die Induktion mit Natrium-Butyrat, die Aufarbeitung des Überstandes bzw. der Zelllysate erfolgt 48 h nach Transfektion.

2.4.3. Herstellung von Zelllysaten

Um die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen nach Transfektion zu überprüfen, werden von den Zellkulturen Zelllysate hergestellt. Dabei wird auf die Verwendung von Proteaseinhibitoren verzichtet, da die Proben direkt nach der Lyse mit 2fachem Proteinprobenpuffer versetzt und eingefroren werden.

Die Zellkulturen werden zunächst mit 1 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Lysispuffer II für mindestens 10 min auf Eis unter mehrmaligen Schütteln lysiert. Anschließend werden 200 - 400 μl des Lysats in ein Eppendorfgefäß überführt, mit dem entsprechendem Volumen 2x PPP versetzt, 6 min bei 95 °C aufgekocht und bei -80 °C bis zur Analyse eingefroren.

2.4.4. Indirekte Immunfluoreszenz

Mit der indirekten Immunfluoreszenz gelingt der optische Nachweis von Proteinen *in situ* in Zellkulturen. Die Zellen werden zunächst fixiert und die Zellmembranen permeabilisiert. Ein erster spezifischer Antikörper bindet an das nachzuweisende Protein und wird wiederum von einem zweiten Antikörper erkannt, der einen Fluoreszenzmarker trägt. Üblicherweise werden als Fluoreszenzmarker Fluoreszin (FITC) oder ein Rhodaminderivat verwendet, die beide leicht und ohne Kopplungsreagenzien mit den Immunoglobulinen verbunden werden können. Fluoreszin strahlt nach Anregung bei 495 nm Wellenlänge eine intensiv grün-gelbe Fluoreszenz mit einem Maximum bei 525 nm Wellenlänge ab (Aigner und Neumann 1997). In einer 6 cm-Schale mit einem sterilen Deckgläschen werden 1×10^4 HT1080- oder Hela-Zellen ausgesät und 24 h später nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Im Zeitraum von 12 bis 72 h nach Transfektion werden die Deckgläschen aus den 6 cm-Schalen herausgenommen, einmal mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen mit eiskalten

Methanol für mindestens 20 min bei -20°C auf das Deckgläschen fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS werden mit 10% Ziegen Serum in PBS für 1 h die unspezifischen Bindungsstellen abgeblockt. Nach einem Waschschrift mit PBS-Tween 20 (PBS versetzt mit 0,2% Tween 20) folgt eine 45minütige Inkubation mit dem ersten Antikörper, der in einer 1:100 Verdünnung in PBS mit 5 % Ziegen Serum auf das Präparat geben wird. Es folgen drei Waschschrift mit PBS-Tween 20 für jeweils 5 min, anschließend die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für weitere 45 min. Der zweite Antikörper wird in gleicher Verdünnung wie der erste Antikörper eingesetzt. Die Inkubationsschritte mit ersten und zweiten Antikörpern geschehen jeweils bei 37°C in einer feuchten Kammer. Da der an den zweiten Antikörper gekoppelte Fluoreszenzmarker FITC lichtempfindlich ist, ist es nötig, ab Zugabe des zweiten Antikörpers in abgedunkelten Räumen zu arbeiten. Nach der Inkubation des zweiten Antikörpers folgen zwei 10minütige Waschschrift mit PBS-Tween 20, dann wird das Deckgläschen mit einer 1:10 Mischung 1 M Tris-HCL (pH 8,0) und Glycerol auf einen Objektträger fixiert und mikroskopiert. Für die Bildanalyse stand ein Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S 100, Filterset 13, Zeiss, Kat.-Nr. 488013-0000, Absorption bei 470/20 nm, Emmission 505-530 nm, *Zeiss*) mit digitalem Kameraeinsatz (AxioCam MRc, *Zeiss*) zur Verfügung. Die Auswertung des digitalen Bildmaterials fand mit der Software AxioVision 3.1 (*Zeiss*) statt.

2.4.5. Histochemische β -Galactosidase-Färbung

Die histochemische β -Galactosidase-Färbung dient dem Nachweis der Expression des β -Galactosidase-Markergens in Zellkulturen. Zellen, in denen die Expression der β -Galactosidase nachgewiesen werden soll, werden zunächst 1mal mit PBS gewaschen und anschließend mit *lacZ*-Fixierlösung für 10 min fixiert. Anschließend werden sie 3mal mit PBS gewaschen, da Reste der Fixierlösung den nachfolgenden Färbeprozess inhibieren können. Zur Färbung werden die Zellen mit *lacZ*-Färbelösung 4 - 6 h bei 37°C inkubiert. Dabei wird das in der Färbelösung enthaltene Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactosid) von der β -Galactosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Anzahl blau gefärbter Zellen können am Mikroskop ausgezählt werden (siehe auch Kapitel 2.5.4).

2.4.6. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Analyse können Zellpopulationen hinsichtlich bestimmter physikalischer Eigenschaften charakterisiert werden. Dazu wird eine Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und das Emissionsspektrum gemessen.

Auf diese Weise lässt sich die Expression eines Markergens oder mehrerer Markergene in einer Zellpopulation entweder direkt mit Hilfe eines in der Zelle exprimierten Fluorochroms oder indirekt mit Hilfe eines gegen das Markergen gerichteten Antikörpers mit angebondenen Fluorochrom quantitativ bestimmen. Neben dem Anteil fluoreszierender Zellen und deren Fluoreszenzintensität kann auch die Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden, was eine Aussage über den Zustand der Zellpopulation erlaubt.

In dieser Arbeit wurde die Expression des Reportergens *egfp* (engl.: „enhanced green fluorescent protein“) in einer Zellpopulation mit Hilfe eines FACS-Calibur-Gerätes (Fluorescence Activated Cell Sorter; *Becton Dickinson*) und der CellQuest-Software (*Becton Dickinson*) quantitativ bestimmt.

Die zu untersuchenden Zellen werden 1mal mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wird in 2 ml DMEM-Medium überführt und 10 min bei 1 200 rpm abzentrifugiert (Multifuge 4 KS-R, *Heraeus*). Das Zellpellet wird in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und anschließend sofort analysiert.

2.5. VIROLOGISCHE METHODEN

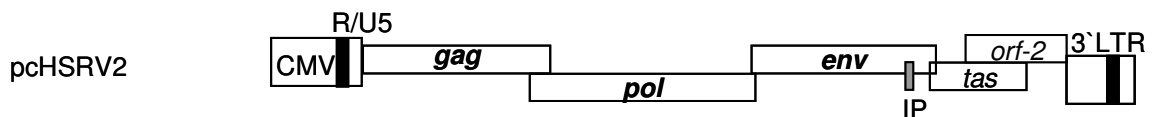
2.5.1. Vektorsysteme für die Analyse von PFV Gag

Für die experimentellen Studien am PFV Gag-Protein wurden 293T-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche für das PFV Gag-Protein unter Kontrolle eines CMV-Promotors codierten. Für die Freisetzung viraler Partikel muss bei Foamyviren weiterhin das Glykoprotein Env vorhanden sein, für die Produktion infektiöser viraler Partikel muss darüber hinaus Pol und eine verpackbare genomische RNA zur Verfügung gestellt werden. Zwei verschiedene plasmidkodierte Vektorsysteme wurden zu diesem Zweck benutzt.

Zum einen wurde das replikationskompetente PFV Provirus pCHSRV2 bzw. Mutanten dieses Konstruktes verwendet (Abb. 7). Auf diesem Plasmid sind alle für die Replikation notwendigen Gene einschließlich des foamyviralen Transaktivators Tas kodiert, die primäre Proteinexpression wird von einem CMV-Promotor getrieben (Moebes et al. 1997).

Als zweites Vektorsystem wurde ein 4-Plasmid-System verwendet, bei dem das Gag-, Pol- und Env-Gen jeweils auf ein separatem Expressionsvektor kodiert vorliegt (Abb. 7). Die zelluläre Expression wird auch bei diesen Konstrukten von einem CMV-Promotor getrieben. Für die Bildung infektiöser Partikel ist weiterhin die Kotransfektion eines viralen Vektorkonstruktes notwendig, von dem eine in das Viruspartikel verpackbare genomische mRNA gebildet wird. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Konstrukt pMD9 sind die Struktur- und Nicht-Strukturgene weitestgehend deletiert worden und durch ein *egfp*-Markergen unter

Proviruskonstrukt:



4-Plasmid-System (separate Expressionskonstrukte):

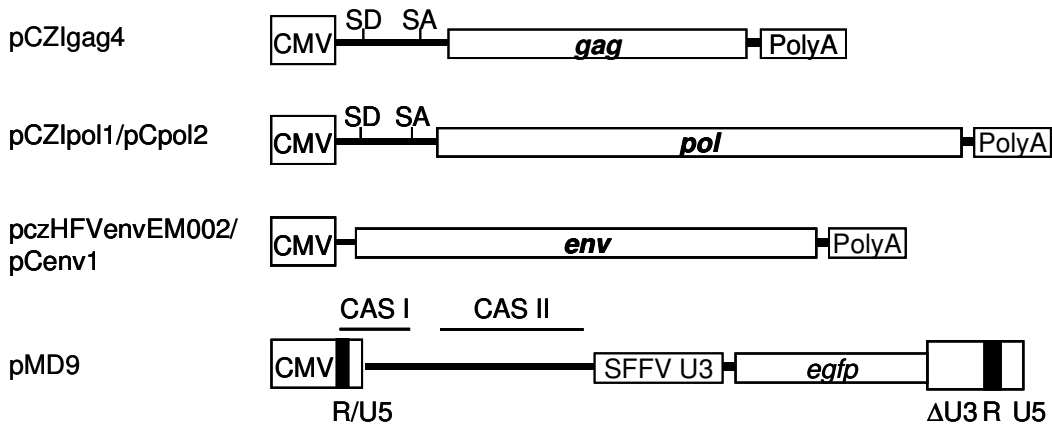


Abb. 7: Vektorsysteme für die Untersuchungen am PFV Gag-Protein.

(A) Schematische Darstellung des PFV Proviruskonstruktes pcHSRV2. Nach Transfektion von geeignete Zielzellen werden von dem Konstrukt alle notwendigen Komponenten für die Herstellung infektiöser PFV Virione expremiert. (B) Schematische Darstellung der Vektoren für das 4 Plamid-System. Geeignete Zielzellen werden mit separaten Expressionsplasmiden für das PFV Gag-, Pol-, und Env-Protein sowie einem Vektorkonstrukt zur Herstellung einer verpackbaren viralen RNA transfiziert. CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; SD/SA: Spleißdonor/-akzeptor; R: „repeat“-Region; U5: „Unique 5“-Region; LTR: „Long terminal Repeat“-Region; IP: interner Promotor; polyA: PoyA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons; CAS I: „Cis acting sequence“ I; CAS II: „Cis acting sequence“ II.

Kontrolle des Promotors des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) ersetzt worden (Abb. 7). Eine Expression viraler Proteine vom Vektorkonstrukt ist damit unterbunden. Erhalten geblieben sind die für die Verpackung des Genoms in das Viruspartikel notwendigen Sequenzen CasI und CasII sowie die für Reverse Transkription und Integration des viralen Genoms notwendigen Sequenzabschnitte. Die mit diesem System generierten Virionen sind zu einem einzigem weiteren Infektionsschritt fähig, in den Zielzellen wird nach Integration des verpackten Genoms das EGF-Markerprotein gebildet.

Gegenüber der Verwendung von Proviruskonstrukten weißt das 4-Plamid-System einige Vorteile auf. Durch die Kodierung der einzelnen Viruskomponenten auf separaten Plasmidkonstrukten ist eine gezielte Manipulation des Replikationszyklus durch das Weglassen einzelner viraler Komponenten je nach Fragestellung möglich. Durch die Verwendung replikationsdefizienter Vektorkonstrukte ist die Arbeit mit diesem System erheblich sicherer. Außerdem ist die Klonierungsarbeit in den Expressionskonstrukten einfacher, da die kodierenden Sequenzen kürzer sind und „Multiple Cloning Sites“ am 5'- und

3'-Ende benutzt werden können. Ein Nachteil ist die unnatürlich hohe Expressionsrate aller viralen Komponenten.

Deshalb sollten Befunde, die im 4-Plasmid-System erlangt wurden, stets auch im Kontext eines proviralen Konstruktes wiederholt werden.

2.5.2. Produktion zellfreier virushaltiger Überstände

Nach Transfektion von Zellkulturen mit geeigneten viralen Expressionsplasmiden bzw. Infektion von Zellen mit Virus können zellfreie Virusüberstände geerntet werden. Bei transfizierten Zellkulturen geschieht dies 48 h nach Transfektion, bei infizierten Zellkulturen wird gewartet, bis diese deutliche Anzeichen einer produktiven Infektion (Bildung von Synzytien, Ablösen der Zellen) zeigen. Zunächst wird der Überstand der Zellkulturen abgenommen und einem kurzen Zentrifugationsschritt (2500 rpm, 6 min, Multifuge 4 KS-R, *Heraeus*) unterworfen. Der damit bereits vorgeklärte Überstand wird vor der weiteren Verwendung noch filtriert (0,45 µm-Filter: FP 30/0,45 CA-S; *Schleicher & Schuell*). Für eine spätere Verwendung können die zellfreie Virusüberstände aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt werden.

2.5.3. Präparation von intrazellulären Viruspartikeln nach der „Freeze-Thaw“-Methode

Aus transfizierten Zellkulturen können intrazelluläre Viruspartikel mit Hilfe der „Freeze-Thaw“-Methode isoliert werden. Da die Menge an intrazellulär verbliebenen infektiösen Viruspartikeln in der Regel mit der Menge an in den Überstand entlassenen infektiösen Viruspartikeln verglichen werden soll, erfolgt die Präparation aus der Zellkultur wie die Gewinnung virushaltiger Überstände 48 h nach Transfektion (siehe vorhergehendes Kapitel). Auch entspricht das Endvolumen an Medium, in das die intrazellulären Viruspartikel freigesetzt werden (siehe unten), dem Volumen an Überstand auf der Zellkultur, so dass ein direkter Vergleich möglich ist.

Das Medium wird von der Zellkultur abgenommen und diese einmal mit PBS gewaschen, anschließend die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in komplettem DMEM-Medium aufgenommen und in eine Schraubdeckelflasche überführt. Das Gesamtvolumen von Trypsin und DMEM-Medium entspricht dabei dem Volumen des Überstandes mit den extrazellulären Virionen. Die Zellen werden durch Einfrieren bei -80°C und anschließendem Auftauen in einem Wasserbad bei 37°C („Freeze-Thaw“) zum Platzen gebracht, so dass die Viruspartikel aus dem Zellinneren in das Medium entlassen werden. Dieser Vorgang wird 3mal wiederholt. Anschließend werden die Zelltrümmer abzentrifugiert

(2500 rpm, 6 min, Multifuge 4 KS-R, *Heræus*) und das vorgeklärte Medium vor der weiteren Verwendung filtriert (0,45 µm Filter: FP 30/0,45 CA-S; *Schleicher & Schuell*).

2.5.4. Quantitative Bestimmung des Virustiters

Für die Bestimmung des intra- und extrazellulären Virustiters werden je nach verwendeten Vektorsystem zwei unterschiedliche Methoden angewendet.

Titration replikationskompetenter Viruspartikel auf Indikatorzellen („Blue cell assay“)

Zur Bestimmung des Virustiters nach Transfektion mit proviralen PFV-Konstrukten werden BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Zellen (Schmidt und Rethwilm 1995) als Indikatorzellen verwendet. Diese Zellen enthalten ein in das Zellgenom stabil integriertes *lacZ*-Reportergen unter Kontrolle des PFV LTR-Promotors. Da der PFV LTR-Promotor nur in der Gegenwart des viralen Transaktivators Tas aktiv ist (vgl. Rethwilm 1995), liegt das Reportergen stumm in der Zelle vor. Nach einer erfolgreichen Infektion der Indikatorzellen durch PFV wird allerdings Tas von dem internen Promotor des integrierten Provirus gebildet und führt zur Stimulation der PFV LTR-Promotoren und damit auch zur Expression des *lacZ*-Reportergens. Diese Expression lässt sich wiederum über die histochemische β-Galactosidase Färbung nachweisen (siehe Kapitel 2.4.5). Nach der Färbung können die infizierte Zellen ausgezählt werden und über eine Verdünnungsreihe der Virustiter bestimmt werden.

Am Vortag der Infektion werden $1,5 \times 10^4$ BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Indikatorzellen pro Loch in 12 Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag werden zellfrei virushaltige Überstände (vgl. Kapitel 2.5.2) gewonnen bzw. intrazelluläre Viruspartikel mit der „Freeze-Thaw“-Methode präpariert (vgl. Kapitel 2.5.3). Die Ansätze werden in DMEM komplett verdünnt und in einer 3- bis 4stufigen logarithmischen Verdünnungsreihe auf die Zielzellen gegeben. Die Verdünnungsreihe ist als Endpunkttitration angelegt. Die Zielzellen werden 48 h nach Infektion angefärbt und die blauen Infektionssspots ausgezählt. Anschließend kann die Anzahl infektiöser Einheiten pro ml Infektionsmedium (ffu = focus forming units) über die Verdünnungsreihe rechnerisch bestimmt werden.

Bestimmung der Infektionseffizienz nach Transfektion mit dem 4-Plasmid-System

Der im 4-Plasmid-System eingesetzte PFV-Vektor pMD9 verfügt über eine *egfp*-Markergenkassette (Kapitel 2.5.1). Nach der Infektion von Zielzellen und der Integration der Vektor-DNA in das Genom der Wirtszelle kommt es durch die Aktivität des SFFV-U3 Promotors zur Expression des EGFP-Proteins. Die Anzahl an EGFP-positiven Zellen lässt sich dann im FACS-Gerät („fluorescence activated cell sorting“) detektieren und quantifizieren (vgl. Kapitel 2.4.6).

Am Vortag der Transduktion werden als Zielzellen $1,5 \times 10^4$ HT1080-Zellen pro Loch in 12 Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag erfolgt die Gewinnung zellfreier virushaltiger Überstände (vgl. Kapitel 2.5.2) bzw. die Präparation intrazellulärer Viruspartikel mit der „Freeze-Thaw“-Methode (vgl. Kapitel 2.5.3). Die Ansätze werden unverdünnt und in einer Verdünnungsreihe von 1:2, 1:10 und 1:100 auf die Zielzellen gegeben. Achtundvierzig Stunden nach der Transduktion der Zielzellen erfolgt die Bestimmung der Infektionseffizienz im FACS wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben. Nach Bestimmung des prozentualen Anteils EGFP-positiver Zellen in der untersuchten Zellpopulation werden die Daten rechnerisch weiter ausgewertet. Unter Berücksichtigung der Anzahl ausgesäter Zellen kann der absolute infektiöse Titer berechnet werden (Auswertungsmatrix erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Lindemann). Berücksichtigt werden nur Werte, die größer als 3mal Mockkontrolle sind, da unterhalb dieser Grenze das Hintergrundrauschen überwiegt. Ansätze, die mehr als 80 % EGFP-positive Zellen in der ausgewerteten Zellpopulation beinhalten, werden ebenso wenig berücksichtigt. Oberhalb dieser Grenze geht der lineare Zusammenhang zwischen der Menge an Virionen und der Anzahl an transduzierten Zellen verloren, der Assay stößt an seine Sensitivitätsgrenze. Basierend auf diesem Auswertungsschema werden die relativen Infektionseffizienzen der analysierten Mutanten bezogen auf den Wildtyp berechnet.

2.5.5. Viruspartikelpräparation aus Zellkulturüberständen

Zum biochemischen Nachweis von partikelassoziierten Virusproteinen im Überstand transfizierter Zellkulturen erfolgt eine Aufkonzentration des partikulären Materials aus dem Überstand.

Zunächst erfolgt die Reinigung des Überstandes von abgelösten Zellen und groben Zelltrümmer wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Der geklärte Überstand wird dann vorsichtig auf ein 20%iges Saccharosekissen (2 ml) in einem Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Zentrifugenröhrchen, 14 x 95 mm; *Beckman Coulter*) geschichtet. Die Sedimentation des partikulären Materials durch das Saccharosekissen erfolgt im SW40-Rotor bei 25 000 rpm und 4°C für 3 h (Optima™LE-80K Ultrazentrifuge, *Beckman Coulter*). Nach dem Zentrifugengang wird der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, das Saccharosekissen abgegossen und das Pellet in 80 µl PBS/2fach PPP auf Eis für 5 min resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 95°C für 5 min aufgekocht. Bis zur Analyse werden die Proben bei -80°C gelagert.

2.5.6. Aufkonzentration von Viruspartikeln in einem kontinuierlichen Dichtegradienten

Makromoleküle und Proteinaggregate können durch Zentrifugation in einem Gradienten entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt werden. Auf diese Weise werden intakte Virionen von unvollständigen viralen Partikeln sowie anderen Makromolekülen separiert und aufkonzentriert. Üblicherweise erfolgt die Konzentration viraler Partikel im Cäsiumchlorid- oder Saccharosedichtegradienten. Beide Medien haben allerdings den Nachteil, dass sie durch ihre starke Osmolarität die Infektiosität der Virionen erheblich herabsetzen. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf das Medium Optiprep (*Axis-Shield*) zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um ein Iodixanol-Wasser-Gemisch mit einem Anteil von 60% Iodixanol, einem langkettigen, verzweigten Alkohol.

Vierundzwanzig Stunden vor der Zentrifugation werden die Gradienten mit Hilfe eines Gradientenmischers (SG 30, *Hofer*) in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Zentrifugenröhrchen, 34 x 11 mm, 2,2 ml Gesamtvolumen; *Beckman Coulter*) gegossen und bei 4°C gelagert. Der Gradient wurde aus je 1 ml 10% und 60% Optiprep verdünnt in DMEM hergestellt.

Der Überstand transfizierter oder infizierter Zellkulturen wird von Zelltrümmern befreit (siehe Kapitel 2.5.2). Anschließend wird der geklärte Überstand auf 5 ml eines 20%igen Saccharosekissen in einem Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Zentrifugenröhrchen, 25 x 89 mm; *Beckman Coulter*) überschichtet und für 1 h bei 25 000 rpm und 4°C in einem SW28-Rotor (Optima™LE-80K Ultrazentrifuge, *Beckman Coulter*) sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes und Abgießen des Saccharosekissens wird das Pellet in 500 µl DMEM 10 min auf Eis bei kontinuierlichem Schütteln (Bakterienschüttler, 180 rpm) gelöst. Die resuspendierte Lösung wird dann mit einer Pipette vorsichtig auf den Gradienten aufgeschichtet. Die Dichtezentrifugation erfolgt anschließend bei 4°C für 4 h mit 48 000 rpm ($\sim 150\,000\text{ g}^{-1}$, TLS-55 Rotor, Optima™Max Ultrazentrifuge, *Beckman Coulter*). Nach der Zentrifugation werden mit einer Pipette von oben beginnend Fraktionen in 200 µl Schritten abgenommen, das Pellet in 80 µl PBS / 2x PPP resuspendiert und die Proben der weiteren Verwendung zugeführt.

2.5.7. Fixierung transfizierter Zellkulturen für die elektronenmikroskopische Analyse

Die Anfertigung elektronenmikroskopischer Bilder transfizierter Zellkulturen für den Nachweis viraler Kapside oder viraler Proteinstrukturen im Zellinneren wurde nur in den ersten Schritten vom Autor selbst vorgenommen. Die weitere Aufarbeitung der Proben sowie die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde freundlicherweise von Herrn

Prof. Dr. Zentgraf und seiner Arbeitsgruppe am DKFZ in Heidelberg übernommen. Es folgt ein Kurzprotokoll der Arbeitsschritte, die von dem Autor selbst ausgeführt wurden.

In 6 cm Schalen werden 293T-Zellen nach dem Standardprotokoll der Kalziumphosphat-Methode transfiziert, die Expression der transfizierten Konstrukte durch die Zugabe von Natriumbutyrat 24 h n. T. stimuliert, die initiale Fixierung der Zellkulturen wird 48 h n. T. begonnen. Von den Zellkulturen wird das Medium abgenommen, 1 mal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend für 20 min mit einer 2,5% Glutaraldehyd-Verdünnung in Cacodylat-Puffer fixiert. Die ersten Minuten der Fixierung verbleibt die Zellkultur noch bei Raumtemperatur, dann wird sie auf Eis transferiert. Nach der Fixierung wird mit einem Zellschaber die Zellverbände vom Untergrund gelöst und in ein 15 ml Röhrchen gefüllt. Die Zellen werden durch Zentrifugation in einer Standzentrifuge (Multifuge 4 KS-R, *Heraeus*) für 5 min bei 1000 g pelletiert, die Glutaraldehyd-Lösung abgezogen und das Zellpellet 3 – 4mal mit einem Überschuß an Cacodylat-Puffer gewaschen. Sind keine Spuren des Glutaraldehyd mehr vorhanden, wird das Röhrchen mit Cacodylat-Puffer aufgefüllt und versandfertig gemacht.

2.6. PROTEINCHEMISCHE METHODEN

2.6.1. Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wird die diskontinuierliche denaturierende Elektrophorese in vertikalen Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen eingesetzt (modifiziert nach Schägger und von Jagow 1987). Der Trennbereich liegt dabei je nach Acrylamidanteil und Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid und Bis - Acrylamid bei 10 - 220 kDa. Das Acrylamid polymerisiert durch freie Radikale, die von APS (Ammoniumperoxysulfat) abgegeben und von TEMED (N-N-N'-N'-Tetramethyldiamin) stabilisiert werden, die Acrylamidfasern werden durch polymerisiertes Bis-Acrylamid quervernetzt. Bei der Auftrennung im Gel liegen die Proteine durch die Zugabe von SDS (Natriumlaurylsulfat) und β -Mercaptoethanol denaturiert vor und erhalten durch das SDS eine gleichförmige negative Ladung.

Für die in dieser Arbeit aufzutrennenden Proteine wurde ein 8 % Trenngel verwendet, das mit einem 4 % Sammelgel überschichtet wurde:

	8 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamidlösung (Gel A, <i>Roth</i>)	7,95 ml	1,3 ml
2 % Bisacrylamidlösung (Gel B, <i>Roth</i>)	3,6 ml	0,6 ml
Gelpuffer	9,9 ml	2,5 ml
Glyzerol	3,3 ml	

Fortsetzung von S. 71	8 % Trenngel	4 % Sammelgel
A. bidest	5,4 ml	5,6 ml A. bidest
10 % APS	0,150 ml	0,075 ml
TEMED (Roth)	0,020 ml	0,005 ml

Die Lösungen werden mit kaltem Wasser angesetzt. Das Trenngel wird zuerst gegossen und mit 1 ml Butanol überschichtet. Nach Polymerisierung wird das Butanol abgegossen, gründlich gespült, das Sammelgel gegossen und die entsprechenden Kämme eingesetzt. In die obere (-)-Kammer der Elektrophoreseapparatur (SE 600, *Hoefler*) wird Kathodenpuffer und in die untere (+)-Kammer Anodenpuffer gegeben. Vor der Auftragung der Proben werden die Taschen des Sammelgels mit 1x Kathodenpuffer gründlich gespült, um abgesetzte Gel- und Wasserreste zu entfernen. Die Proteinproben werden für 5 min gekocht, anschließend werden 50 – 150 µl Proteinprobe pro Tasche sowie ein Größenmarker aufgetragen. Freie Taschen werden mit einem gleichen Volumen PBS / 2fach PPP beladen. Der Lauf erfolgt bei 15 - 20 mA/Gel über Nacht.

2.6.2. Western Blot

Beim sogenannten Western Blot werden Proteine, die zuvor in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf einen geeigneten Trägerfilter, z.B. eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran, durch elektrischen Strom übertragen und auf dieser immobilisiert.

In derart fixierte Proteingemischen lassen sich einzelne Proteine spezifisch durch Immunfärbung nachweisen. Dabei wird die Membran zunächst mit einem spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichteten (primären) Antikörper inkubiert, der eine nonkovalente Bindung mit dem gesuchten Protein eingeht. Nach mehreren Waschschritten wird die Membran mit einem zweiten (sekundären) Antikörper inkubiert, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und nun wiederum an diesen bindet. Die Nachweisreaktion erfolgt schließlich über ein an den Sekundärantikörper gekoppeltes Enzym. Üblicherweise werden als Enzyme für die Nachweisreaktion Alkalische Phosphatasen oder die Meeretichperoxidase verwendet (Dunbar 1994).

In dieser Arbeit wurde das „Semidry“-Blottingverfahren verwendet. Vor dem eigentlichen Blotten wird die Nitrozellulosemembran (HYBOND™ ECL™; *Amersham Biosciences*), 5 Lagen Whatman-Filterpapier und das Polyacrylamidgel für 10 min im Western Blot-Puffer inkubiert. Anschließend wird auf die Kathodenplatte der Apparatur 3 Lagen Whatman-Filterpapier, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und wieder 2 Lagen Whatman-Filterpapier luftblasenfrei gestapelt. Dann wird die Anodenplatte aufgesetzt und eine Stromstärke von

185 mA für 105 min ($\sim 1\text{mA}/\text{cm}^2$) angelegt. Nach dem Blotten wird die Apparatur abgebaut, die Membran kurz mit Aqua dest. abgespült und in 1fach PBS kalibriert, dann für mindestens 2 h in Blockierungslösung geschwenkt. Dieser Schritt dient der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Nach diesem „Blockierungsschritt“ wird die Membran mindestens 1 h bis maximal über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert. Dazu wird dieser in Blockierungslösung verdünnt. Um nicht gebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wird die Membran vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper zweimal für jeweils 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Der ebenfalls in Blockierungslösung in einem Verhältnis von 1:1000 – 10 000 verdünnte sekundäre Antikörper wird 1 - 2 h mit der Membran inkubiert, gefolgt von drei Waschrufen mit Waschpuffer für jeweils 10 min.

Ist an dem sekundären Antikörper das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, wird die Membran anschließend kurz mit Aqua dest. abgewaschen, luftblasenfrei auf eine Glasplatte gelegt und mit Alkalischer Phosphatase-Puffer, dem zuvor NBT (Endkonzentration 0,33 mg/ml) und BCIP (Endkonzentration 0,17 mg/ml) beigemischt worden ist, bedeckt. Bei der Reaktion des Enzyms mit dem Substrat bildet sich irreversibel ein rötlicher Niederschlag. Nach 2 - 10 min wird die Reaktion mit Aqua dest. abgestoppt und der Blot zwischen zwei Whatmanfilter getrocknet.

Die Nachweisreaktion mittels der an einen sekundären Antikörper gekoppelten Meeretichperoxidase erfolgt über die Oxidation von Luminol, wobei Photonen emittiert werden, die mittels Röntgenfilm oder CCD-Kamera nachgewiesen werden können. Für diese Arbeit wurde die Nachweisreaktion entweder mit dem ECL+-Kit (*Amersham Bioscience*, Kat.-Nr. RPN2133) oder mit einer selbstgemachten ECL-Lösung durchgeführt. Das kommerzielle ECL+-Kit zeigt eine größere Intensität und Dauer der enzymatischen Reaktion, da hier als Zwischenschritt ein Acrylester gebildet wird. Die Nachweisschritte wurde in diesem Fall nach Angaben des Herstellers ausgeführt (RPN2132PL Rev-B, 2002, *Amersham Bioscience*). Bei der Arbeit mit dem Selfmade-ECL werden die Lösungen A und B im Verhältnis 1:2 gemischt und sofort gleichmäßig auf die Blotmembran aufgebracht. Nach 1 min Inkubationszeit wird die Flüssigkeit verworfen und der Blot in handelsübliche Haushaltsfolie eingepackt. Die Detektion der Lichtemission erfolgt in beiden Fällen entweder durch Exposition von Röntgenfilmen (Curix 100 NIF, *Agfa*) oder digital mittels einer CCD-Kamera (LAS-3000 Imager, *Fujifilm*).

2.6.3. Quantifizierung eines Western Blots

Die Nachweisreaktion eines Immunoblots mittels der Meeretichperoxidase liefert über die Anzahl emittierter Photonen, dem „Schwärzungsgrad“ einer Proteinbande, eine semiquantitative Aussage über die Menge des nachgewiesenen Proteins in der

aufgetragenen Probe. Verschiedenen Proben eines Immunoblots können so bezüglich ihres relativen Gehaltes an einem bestimmten Protein verglichen werden.

In dieser Arbeit wurden die mit der CCD-Kamera des LAS-3000 Imager gewonnenen Detektionsbilder mit Hilfe einer speziellen Software (Image Gauge 3.01, *Fujifilm*) ausgewertet. Die exakte Bestimmung des Schwärzungsgrades einzelner Proteinbanden war damit möglich.

2.6.4. „Stripping“ eines Western Blots

Die Bindung zwischen Proteinen, die auf eine Nylonmembran geblottet wurden, und einem Antikörperkomplex lassen sich durch Inkubation mit SDS und β -Mercaptoethanol bei Wärmeeinwirkung wieder lösen. Anschließend kann der Blot für eine weitere Immunfärbung verwendet werden. Da sich bei dem „Stripping“-Vorgang auch Proteine von der Membran lösen, verringert sich die Detektionssensitivität mit jedem weiterem „Stripping“-Schritt.

Western Blots, die ein weiteres Mal für eine Immunfärbung verwendet werden sollen, werden für 30 min bei 55°C in einem Wasserbad in „Stripping“-Puffer unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert und anschließend mindestens 3mal für 10 min in Waschpuffer geschwenkt. Vor der Inkubation des nächsten Antikörpers müssen die Blots erneut mit Blockierungslösung für mindestens 2 h behandelt werden.

2.6.5. Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine mit C-terminalem His-Tag

Basierend auf dem pET-System (pET22b, *Novagen*) wurden für die Expression viraler Proteine in Prokaryoten rekombinante Proteine mit C-terminalen His-Tag konstruiert. Die *Novagen*-Expressionskonstrukte tragen 15 bis 20 Nukleotide vor dem Klonierungs-ORF eine ribosomale Bindungsstelle, welche die Translation der im ORF kodierten Proteine in prokaryotischen Zellen gewährleistet. Der ORF steht unter Kontrolle eines T7-Promotors, der nur von der T7-Polymerase transkribiert wird. In den verwendeten *E. coli* λ *DE3*-Stämmen liegt die T7-Polymerase plasmidkodiert unter Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors vor, so dass eine Transkriptionsaktivierung der T7-Polymerase von der Anwesenheit von Galaktosidase bzw. eines Analogons abhängig ist, und z.B. durch die Zugabe von IPTG induziert werden kann. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Vektor pET22b steht der T7-Promotor zusätzlich unter Kontrolle einer 25 Bp langen *lac*-Operatorsequenz unmittelbar abwärts der 17 Bp langen T7-Promotorsequenz. Die Bindung des *lac*-Repressors verhindert eine Aktivierung des T7-Promotors in Abwesenheit eines Induktors und bietet somit eine zweite auf *lacI* basierende Expressionskontrolle. Zusätzlich zu diesen Kontrollmechanismen wurden in

dieser Arbeit teilweise *E. coli BL21(DE3)pLysS*-Stämme verwendet, die eine zusätzliche Expressionskontrolle durch das plasmidkodierte T7-Lysozym bieten, einem Repressor der T7-Polymerase.

Für die Aufreinigung wurde das Prinzip der „Immobilized metal affinity chromatography“ (IMAC) angewandt. Die viralen Proteine waren an ihrem C-Terminus mit einem aus 6 Histidinen bestehendem His-Tag fusioniert. Das Ringsystem der aromatischen Aminosäure Histidin hat eine hohe Bindungsaffinität zu zweiwertigen Kationen wie Zn^{2+} oder Ni^{2+} . Werden diese Kationen wiederum an eine immobile Matrix gebunden, kann dieses System für die Aufreinigung entsprechender Fusionsproteine verwendet werden. Die Bindung ist reversibel und kann durch pH-Änderung oder Erhöhung der Imidazolkonzentration rückgängig gemacht werden.

Für die Expression werden zunächst 5 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsantibiotika, beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Für die Animpfung werden nur frisch, d.h. innerhalb der letzten 3 Tage, auf Agarplatten transformierte Einzelkolonien der *E. coli*-Stämme *BL21(DE3)* bzw. *BL21(DE3)pLysS* verwendet. Die Übernachtskultur wird am folgenden Tag für das Animpfen von 300 ml LB-Medium benutzt, welches mit dem entsprechenden Selektionsantibiotika versetzt wird. Die Kultur wird bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer $OD_{600} \sim 0,4 - 0,5$ inkubiert, mit 1mM IPTG induziert und weitere 4 – 6 h bei 30°C und 180 rpm gehalten. Anschließend werden durch eine 12 minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm (Polypropylen Flaschen 69 x 160 mm, JA-50 Rotor, *Beckman Coulter*) die Bakterien geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

Für die Lyse der Bakterienpellets werden diese in PBS versetzt mit 1% Triton X-100 (2 ml pro 100 ml Bakterienkultur) sorgfältig resuspendiert. Dazu wird 1/100 Vol. Proteasehemmer (Proteasehemmer-Cocktail II, *Calbiochem*) und 100 µg/ml Lysozym gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Anschließend werden 10 Units/ml DNase hinzugegeben und bei Raumtemperatur weitere 15 – 30 min inkubiert. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der DNase wird das Lysat zwischendurch eingefroren und wieder aufgetaut. Ist das Lysat nach dem Auftauen weiterhin flüssig, wird mit dem nächsten Arbeitsschritt fortgefahren, andernfalls wird die Inkubation weiter fortgeführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1,5 h bei 4 400 rpm ($\sim 5000 g^{-1}$, Multifuge 4 KS-R, *Heraeus*), bei dem eine Trennung in lösliche und unlösliche Fraktion erfolgt. Der Überstand wird als lösliche Fraktion bis zur weiteren Aufarbeitung bei –80°C weggefroren, das Pellet in 10 ml 1fach Binding Buffer pro 100 ml Bakterienkultur gelöst und einem weiteren Zentrifugationsschritt unterworfen (1,5 h, 4 400 rpm, Multifuge 4 KS-R, *Heraeus*). Der resultierende Überstand wird als unlösliche Fraktion bis zur weiteren Aufarbeitung bei –80°C weggefroren.

Ist nicht bekannt, ob sich der Hauptteil des rekombinanten Proteins in der löslichen oder unlöslichen Fraktion befindet, wird ein Aliquot jeder Fraktion über ein SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Anschließend wird die weitere Aufreinigung nur mit der Fraktion fortgesetzt, in welcher sich der größere Anteil des rekombinanten Proteins befindet. Die weitere Aufarbeitung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, deshalb wurde allen verwendeten Puffern 6 M Harnstoff zugesetzt. Zunächst werden 5 ml Polystyren-Säulen (*Qiagen*) mit 3 ml His-Bind[®] Resin (*Novagen*) beladen. Es wird darauf geachtet, dass vor dem Beladen das Resin gut gemischt worden ist. Es bildet sich eine ~ 2 ml hohe Matrix aus, die zunächst mit dem 3fachen Säulenvolumen H₂O_{dest.} gewaschen wird und dann mit dem 5fachen Säulenvolumen 1mal Charge Buffer beladen wird. Durch Waschen mit dem 5 – 10fachen Säulenvolumen 1mal Binding Buffer/6 M Harnstoff wird ungebundenes Nickelsulfat entfernt und die Säule equilibriert. Anschließend wird der aufgetaute Überstand der löslichen oder unlöslichen Fraktion auf die Säule gegeben. Nach dem Bindungsschritt wird die Säulen mit dem 10fachen Säulenvolumen 1mal Binding Buffer/6 M Harnstoff und dann mit dem 6fachen Säulenvolumen Wash Buffer I/6 M Harnstoff gewaschen. Anschließend erfolgt ein Waschschritt mit 4 ml Wash Buffer II/6 M Harnstoff, der aufgefangen und für die spätere Analyse bei –80°C weggefroren wird. Es folgen zwei Elutionsschritte mit je 4 ml Elution Buffer/6 M Harnstoff, die ebenfalls aufgefangen und für die spätere Analyse bei –80°C weggefroren werden.

Erscheint die Säulenmatrix brauchbar für weitere Aufreinigungen, wird diese mit dem 6fachen Säulenvolumen 1mal Strip Buffer entladen, mit dem 4fachen Säulenvolumen 1mal Binding Buffer erneut equilibriert und bei 4°C in 70 % unvergälltem Ethanol gelagert. Säulen werden nur für die Aufreinigung gleicher Proteine mehrmals benutzt, so dass eine Kontamination mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden kann.

2.6.6. Dialyse rekombinanter Proteine

Die rekombinanten Proteine liegen nach der Aufreinigung zunächst im Elutionspuffer gelöst vor. Die hohe Konzentration an Imidazol und Harnstoff im Elutionspuffer macht eine folgende Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen unmöglich, weshalb die Proteineluate gegen einen Natriumchlorid-Puffer dialysiert werden. Bei der Dialyse von Proteinen wird sich die Eigenschaft semipermeabler Membranen zu Nutze gemacht, die niedermolekulare Stoffe passieren lassen, hochmolekulare Aggregate (z.B. größere Proteine) aber zurückhalten. Aufgrund des osmotischen Drucks stellt sich ein Gleichgewicht der niedermolekularen Stoffe zwischen Innen- und Außenmedium ein.

Die Dialyseschläuche („Dialysis tubing“, Kat.-Nr. D-0655, *Sigma-Aldrich*) mit einer Ausschlussgröße > 12 kDa werden vor der Verwendung einige Minuten im Dialysepuffer

gekocht und anschließend ausgiebig gespült. Ein Seite wird mit einer Klammer („Dialysis Tubing Closures“, Kat.-Nr. Z37.115-7, *Sigma-Aldrich*) verschlossen, die Proteinprobe eingefüllt und die offene Seite ebenfalls verschlossen. Die Dialyse wird für 48 h im 1000fachen Volumen Dialysepuffer zum Probenvolumen unter kontinuierlichem Rühren bei 4°C durchgeführt, der Dialysepuffer wird einmal nach 24 h gewechselt. Anschließend wird die Proteinprobe bis zur weiteren Verwendung bei –80°C weggefroren.

2.6.7. Photometrische Proteinbestimmung mit der BCA-Methode

Zur Bestimmung der Konzentration an Gesamtprotein in einer Probe wurde die BCA-Methode verwendet. Bei diesem kolorimetrischen Verfahren wird die Eigenschaften von Proteinen ausgenutzt, Cu^{2+} zu Cu^{1+} im basischen Milieu zu reduzieren (Biuret-Reaktion). Jedes reduzierte Cu^{1+} -Ion lagert sich wiederum mit zwei Molekülen Bicinchonininsäure (BCA) zusammen und bilden einen farbigen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Farbintensität ist somit direkt linear abhängig von der Menge an Protein in einer Lösung. Für die Konzentrationsbestimmung unbekannter Lösungen ist als Referenz eine Eichreihe mit Lösungen bekannter Proteinkonzentrationen nötig. Die Stärke der Reaktion ist abhängig von der makromolekularen Struktur, der Anzahl an Peptidbindungen und insbesondere der Anzahl an den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein in den interagierenden Proteinen.

Im vorliegenden Fall wurde ein kommerzielles Kit der Firma *Pierce* („BCA Protein Assay Reagent Kit“, Kat.-Nr. 23227, *Pierce*) verwendet, welches die benötigten Lösungen und BSA als Proteinstandard bereit stellt. Eine Eichreihe aus 5 – 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA (Ausgangskonzentration 2 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wird in Dialysepuffer verdünnt, anschließend jeweils 25 μg der Eichreihe sowie der zu bestimmenden Probe in 3facher Wiederholung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit jeweils 200 μl „Working Reagent“ (1 : 50 BCA Reagenz B zu BCA Reagenz A, *Pierce*-Protokoll 23227) versetzt und gut gemischt. Die Mikrotiterplatte wird bei 37°C für 30 – 60 min inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm in einem Spektrometer (*Power Wave 200*, *Bio-Tek Instruments*) vermessen. Anhand der Referenzwerte der Proteinstandards wird mit Hilfe einer Eichgeraden im Statistikprogramm SPSS (SPSS 7.5 Student Version) die Konzentration der unbekanntenen Proteinlösungen bestimmt. Jede Messung wird mindestens dreimal unabhängig durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

2.6.8. Photometrische Quantifizierung von Comassie-Blau gefärbten SDS-Gelen

Zur Färbung von Proteinbanden in SDS-Gelen wird vielfach der organische Farbstoff Comassie-Blau verwendet. Die Bindung des Farbstoffes erfolgt dabei vor allem an die

basische Aminosäuren Lysin und Arginin, so dass die Intensität der Färbung von der Anzahl dieser Aminosäuren in einem Polypeptid abhängig ist. Die Sensivität der Färbung liegt bei maximal ~ 200 - 400 ng / Proteinbande und ist unter geeigneten Bedingungen vollständig reversibel (Merril 1990).

SDS-Gele werden nach der Elektrophorese kurz in PBS equilibriert und dann für 4 – 5 h in der Comassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgt die Eliminierung der Hintergrundfärbung unter regelmäßigem Wechsel der Entfärbelösung für 8 – 12 h. Die gefärbten Gele wurden digital fotografiert, anhand der digitalen Bilder konnte anschließend eine relative Quantifizierung der einzelner Proteinspots pro Gelbande mit Hilfe einer Computersoftware (Phoretix 1D Advanced Version 4.01) vorgenommen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. GAG/POL-ZUSAMMENSETZUNG FOAMYVIRALER VIRUSPARTIKEL AM BEISPIEL VON PFV

Zur Bestimmung der Anteile an Gag- und Pol-Proteinprodukten in foamyviralen Partikeln wurden zum einen möglichst reine Präparationen größerer Mengen foamyviraler Partikel benötigt. Zweitens musste ein Detektionsassay entwickelt werden, der spezifisch zwischen den Gag- und Pol-Proteinkomponenten unterschied und eine Quantifizierung erlaubte. Das prototypische Foamyvirus (PFV) lässt sich in Zellkultur gut vermehren, so dass für dieses Virus größere Mengen an infektiösen Viruspartikeln problemlos produziert werden können. Die Aufreinigung der Viruspartikel erfolgte durch Zentrifugation in einem Iodixanol-Dichtegradienten (vgl. Kapitel 2.5.6.). Als Nachweissystem wurde der Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern (AK) gewählt. Monoklonale AKs sind spezifisch gegen ein bestimmtes Proteinepitop gerichtet. Bei Zugabe eines Überschusses an monoklonalen AKs sollte an jedes vorhandene spezifische Epitop ein AK binden und ein linearer Zusammenhang sollte sich zwischen der Menge an gebundenen AK und der Menge an Protein in einer Probe ergeben. In Präparationen von PFV Virionen lassen sich sowohl das Gag-Vorläuferprotein p71 als auch das Prozessierungsprodukt p68 nachweisen (Giron et al. 1997, Morozov et al. 1997, vgl. Kapitel 1.2.2.). Die beiden Gag-Produkte p71 und p68 werden durch den monoklonalen AK SGG1 gleichermaßen gut erkannt (Heinkelein et al. 2002a). Das Pol-Protein wird in PFV Partikeln als p85^{PR/RT}-Spaltprodukt, das den PR- und RT/RNaseH-Anteil enthält, und als p40^{IN}-Spaltprodukt, welches den Integraseanteil umfasst, vorgefunden (Pfrepper et al. 1998, vgl. Kapitel 1.2.2.). Spezifische monoklonale AK gegen den p85^{PR/RT}-Anteil (15E10) und den p40^{IN}-Anteil (3E10) des Pol-Proteins standen ebenfalls zur Verfügung (Imrich et al. 2000). Der Nachweis der Proteine sollte mit Hilfe eines sekundären, an Meerrettichperoxidase gekoppelten AK, Inkubation mit ECL-Reagenz sowie anschließender Aufzeichnung des Chemolumineszenzsignals mittels einer CCD-Kamera erfolgen. Für die Quantifizierung der Proteinmengen in den Partikelpräparationen war die Herstellung eines Referenzstandards notwendig, auf den die Detektionsintensität der einzelnen Proteinbanden bezogen werden konnte. Dieser Referenzstandard wurde mit bakteriell exprimierten Gag- und Pol-Proteinen erstellt.

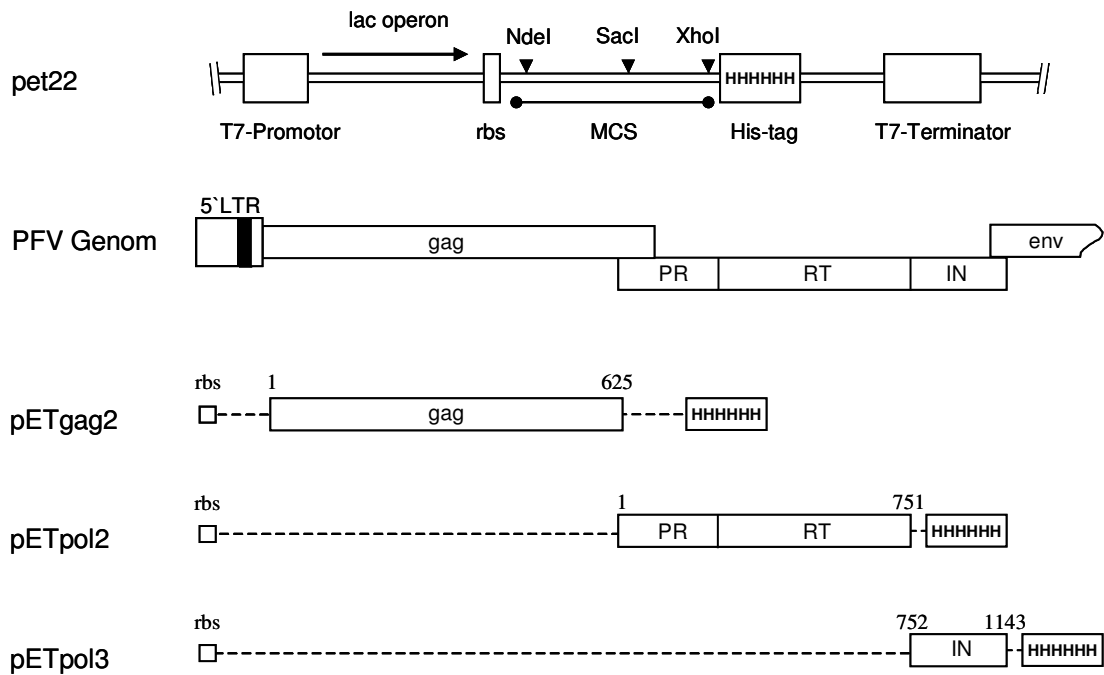


Abb. 8: Schematische Darstellung der prokaryotischen Expressionsvektoren und der 5' Hälfte des PFV Provirus.

MCS: Multiple Cloning Site mit Darstellung der für die Klonierung von pETgag2, pETpol2 und pETpol3 verwendeten Restriktionsschnittstellen (siehe Text); rbs: Ribosomale Bindungsstelle; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase/RnaseH; IN: Integrase.

3.1.1. Herstellung von Proteinstandards für eine Eichgerade

Als bakterieller Expressionsvektor wurde das pET22b Konstrukt (*Novagen*) gewählt (Abb. 8). Dieses Vektorkonstrukt trägt am 3'-Ende der MCS einen 6 Histidine umfassenden Tag, der eine Aufreinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. In dieses Ausgangskonstrukt wurden „in frame“ zu dem C-terminalen His-Tag Teile des PFV *gag*-ORFs und des PFV *pol*-ORFs kloniert.

Für die Klonierung des bakteriellen PFV Gag Expressionsvektors pETgag2 wurde der vorhandenen Expressionsklon pETgag1 (Imrich et al. 2000) mittels *AdeI*-Verdau linearisiert, anschließend mit der T4 DNA-Polymerase die überhängenden DNA-Enden entfernt und mit einem folgenden *NdeI*-Verdau ein 1,9 kb großes DNA-Fragment ausgeschnitten. Der Vektor pET22b wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *SacI* linearisiert, die überhängenden DNA-Enden mit der T4 DNA-Polymerase entfernt und der Vektor anschließend noch mit *NdeI* geschnitten. Anschließend wurde das 1,9 kb-Fragment aus pETgag1, das den PFV *gag*-ORF von AS 1 – 625 umfasste, „in frame“ zu dem C-terminalen His-Tag in den Expressionsvektor pET22b gesetzt (Abb. 8).

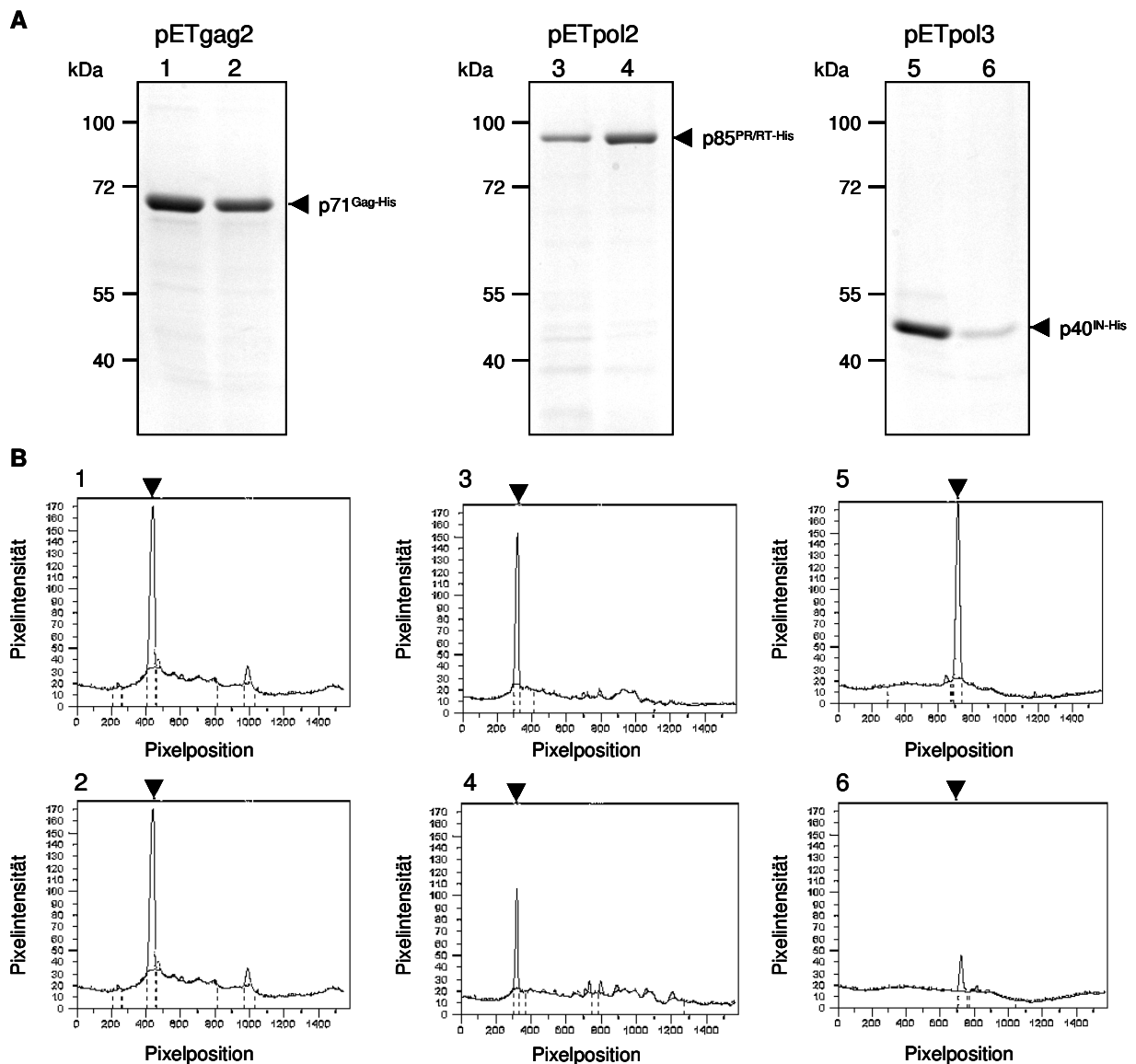


Abb. 9: Kontrolle der in *E. coli* exprimierten und mittels IMAC aufgereinigten rekombinanten Proteine auf Verunreinigungen.

(A) Coomassie-Blau gefärbte SDS-Gele, Spur 1: pETgag2 Präp. 1; Spur 2: pETgag2 Präp. 2; Spur 3: pETpol3 Präp. 1; Spur 4: pETpol3 Präp. 2; Spur 5: pETpol3 Präp. 1; Spur 6: pETpol3 Präp. 2. Auftrag Spur 1-5: jeweils ~3000 ng; Spur 6: ~1500 ng. (B) Intensitätsprofil der einzelnen Spuren der in (A) gezeigten Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gele. Nummerierung entsprechend den Gelspuren in (A). Die Höhe und Breite der Ausschläge entsprechen der Intensität der Färbung. Der in jedem Profil dominierende Peak (Pfeilspitze) zeigt das jeweilige rekombinante Protein an. Über das Integral der Fläche des dominanten Peaks wurde der relative Anteil an rekombinanten Protein in der Lösungen berechnet. Die Intensitätsprofile wurden mit der Software *Phoretix 1D Advanced Version 4.01* erstellt.

Der exakte p85^{PR/RT}-Anteil des Pol-Proteins, der As 1 – 751 des Vorläuferproteins umfasst (Pfepper et al. 1998), wurde mit Hilfe der Primer #1217 und #1414 amplifiziert und mittels Primermutagenese die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* eingebaut. Das entstandene PCR-Fragment und der Expressionsvektor pET22b wurden jeweils *NdeI/XhoI* verdaut und zusammen ligiert. Auf diese Weise entstand der bakterielle Expressionsklon pETpol2, der

den Protease/Reverse Transkriptase umfassenden Anteil des Pol-Proteins als Fusionsprotein mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert (Abb. 8). Die gleiche Klonierungsstrategie wurde zur Herstellung von pETpol3 angewandt, bei dem der komplette Integraseanteil des Pol-Proteins von As 752 – 1143 mit Hilfe der Primer #1219 und #1413 amplifiziert wurde (Abb. 8, Pfrepper et al. 1998). Als Matrize für die PCR diente jeweils das Proviruskonstrukt pCHSRV2 (Moebes et al. 1998).

Die foamyviralen Anteile der Expressionsklone wurden anschließend komplett sequenziert, der korrekte Einbau überprüft sowie unerwünschte Mutation ausgeschlossen.

Für die bakterielle Expression der PFV Proteine wurden die Expressionsvektoren pETgag2, pETpol2 und pETpol3 in die *E. coli*-Stämme BL21DE3 bzw. BL21DE3pLys transformiert. Zunächst erfolgte eine Kontrollexpression im kleinen Maßstab, wobei pro Expressionskonstrukt 3 bis 5 Klone auf die Stärke der Expression der jeweiligen PFV Proteine untersucht wurden. Die Menge an exprimierten rekombinanten Protein 4 - 6 h nach Induktion mit IPTG wurde über Analyse in Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen und durch Immunoblot abgeschätzt. Anschließend wurde ein geeigneter Klon für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine im großen Maßstab ausgewählt (vgl. 2.6.5.).

Da die bei der Aufreinigung mittels IMAC verwendeten denaturierenden Puffer bei der anschließenden Bestimmung der Proteinkonzentration stören würden, wurden die gewonnenen Proteinfractionen gegen einen neutralen Puffer dialysiert (Kapitel 2.6.6.). Die Gesamtproteinkonzentration wurde danach mit der BCA-Methode photometrisch bestimmt (Kapitel 2.6.7.). Die Konzentrationsbestimmung wurde für jede Proteinfraction dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, pro Durchgang erfolgte eine Dreifachbestimmung jeder Probe. Die Mittelwerte der Konzentrationsbestimmungen sind in Tab. 3 aufgelistet.

Bei der Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine über einen C-terminalen His-Tag mit der IMAC-Methode sind Reinheiten von >90% erreichbar (Janknecht et al. 1991). Die aufgereinigten Proteinfractionen, die als Standard eingesetzt werden sollten, wurden in einem Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel auf Verunreinigungen hin überprüft (Abb. 9A). Neben den Hauptbanden, die das jeweilige rekombinante PFV Protein repräsentieren, waren schwache Nebenbanden nachweisbar. Der relative Anteil dieser Verunreinigungen wurde durch ein bildanalytisches Verfahren abgeschätzt (Abb. 9B, Tab. 3, Spalte 4, vgl. Kapitel 2.6.8.) und die gemessene Gesamtproteinkonzentration um diesen Wert korrigiert (Tab. 3, Spalte 5). Die Bestimmung des relativen Anteils an Verunreinigungen in den Proteinfractionen wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt, in Tab. 3 ist der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben.

Tab. 3: Konzentration bakteriell exprimierter PFV Gag- und Pol-Proteinlösungen nach IMAC-Aufreinigung.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

Probe	Protein	Gesamtproteinkonzentration nach BCA-Messung (ng/μl, n = 3)	Relativer Anteil (%) nach Auswertung der Coomassie-Färbung (n = 3)	korrigierte Proteinkonzentration (ng/μl)
pETgag2 Präp. 1	p71 ^{Gag-His}	21,5 +/- 2,0	69 +/- 3	14,8
pETgag2 Präp. 2	p71 ^{Gag-His}	30,7 +/- 2,6	70 +/- 5	21,5
pETpol2 Präp. 1	p85 ^{PR/RT-His}	39,6 +/- 6,1	45 +/- 12	17,8
pETpol2 Präp. 2	p85 ^{PR/RT-His}	84,7 +/- 4,7	77 +/- 10	65,2
pETpol3 Präp. 1	p40 ^{IN-His}	103 +/- 9,3	92 +/- 2	94,8
pETpol3 Präp. 2	p40 ^{IN-His}	32,7 +/- 7,6	85 +/- 4	27,8

3.1.2. Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen des Immunoassays

Nachdem die Konzentration an rekombinanten p71^{Gag-His}, p85^{PR/RTR-His} und p40^{IN-His} in den aufgereinigten Proteinlösungen so exakt wie möglich bestimmt war, konnten diese als Ausgangspunkt für die Erstellung von Standardkurven dienen. Zunächst wurden sowohl die Sensitivitäts- als auch die Detektionsgrenzen des Immunoassays ermittelt.

Eine Verdünnungsreihe der rekombinanten p71^{Gag-His}-, p85^{PR/RT-His}- und p40^{IN-His}-Proteine wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen, nach der Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit einer standardisierten Verdünnung bestehend aus den drei monoklonalen AK SGG1 (α -PFV Gag p71/68), 15E10 (α -PFV Pol p85^{PR/RT}) und 3E11 (α -PFV Pol p40^{IN}) inkubiert. Als sekundärer AK wurde ein α -Maus-AK mit gekoppelter Meerrettichperoxidase (Dako) in einer Verdünnung von 1 : 1000 verwendet, als Detektionsreagenz kam das kommerzielle ECL+-System (*AmershamBioscience*) zur Anwendung (vgl. Kapitel 2.6.2.). Die Aufzeichnung des Chemolumineszenzsignals erfolgte mittels einer CCD-Kamera (Kapitel 2.6.2.). Die Nachweisgrenze lag für das rekombinante PFV Pol p40^{IN-His}-Protein bei 10 ng aufgetragener Proteinmasse/Spur, für PFV Pol p85^{PR/RT-His} bei 20 ng und für PFV Gag p71^{Gag-His} bei 40 ng (Abb. 10A).

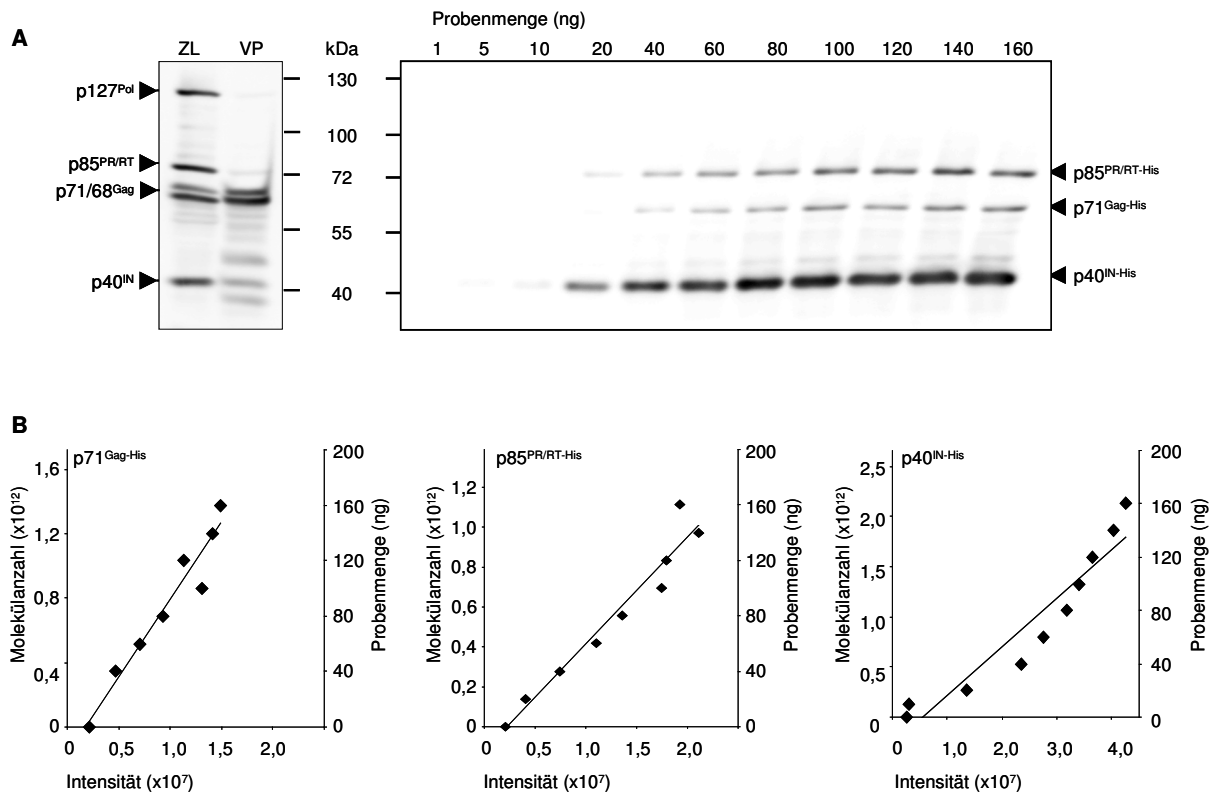


Abb. 10: Bestimmung der Sensitivitätsgrenze und des Linearitätsbereiches des Immunoassays.

(A) Immunoblot einer Verdünnungsreihe der rekombinanten Proteine Gag p71^{Gag-His}, Pol p85^{PR/RT-His} und Pol p40^{IN-His}, sowie eines Zellysates (ZL) und einer Viruspartikelpräparation (VP). Der Immunoblot wurde mit einem Gemisch der Hybridomaüberstände SGG1 (α -PFV Gag), 15E10 (α -PFV Pol p85^{PR/RT}) und 3E11 (α -PFV Pol p40^{IN}) inkubiert. Das Zellysate wurde aus PFV infizierten BHK-21 Zellen gewonnen, die Viruspartikel durch Aufkonzentration des Überstandes von PFV infizierten BHK-21 Zellen durch ein 20% Saccharosekissen präpariert. (B) Beziehung zwischen dem Auftrag an rekombinantem Gag- und Pol-Protein der Verdünnungsreihe in (A) und der Intensität des Detektionssignales der jeweiligen Proteinbande im Immunoblot (A). Die rechte Y-Achse gibt die aufgetragene Proteinmenge in ng an (vgl. A), die linke Y-Achse die entsprechende Umrechnung in Anzahl Moleküle pro Proteinbande. Angegeben ist die abgeleitete lineare Regressionsgleichung und der quadratische Korrelationskoeffizient r^2 .

Die IgG-Konzentration der monoklonalen Antikörperüberstände aus diesem Experiment wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISA-Tests bestimmt. Die niedrigste Konzentration wurde für den α -PFV Pol p40^{IN} AK 3E11 mit 3,2 μ g/ml ermittelt, der α -PFV Pol p85^{PR/RT} AK 15E10 und der α -PFV Gag AK SGG1 wiesen mit 10,5 μ g/ml (15E10) beziehungsweise 10,1 μ g/ml (SGG1) etwa gleiche Konzentrationen an IgG auf. Der ELISA-Test kann als zuverlässig eingestuft werden, da er alle Subtypen an Maus-IgG erkennt, gleichzeitig aber nicht mit anderen Ig-Klassen oder IgG-Antikörpern von Fremdorganismen kreuzreagiert. Aus der IgG-Konzentration und der Sensitivitätsbestimmung ergibt sich, dass der monoklonale AK 3E11 etwa 12mal sensitiver ist als der monoklonale AK SGG1 und immer noch 6,5mal sensitiver ist als der 15E10 Hybridomaüberstand.

Die Chemolumineszenz, die bei der Umsetzung des ECL-Reagenz durch die an den zweiten AK gekoppelte Meerrettichperoxidase freigesetzt wird, wurde durch die CCD-Kamera des LAS-3000 Imager registriert und aufgezeichnet. Die Analysesoftware des LAS-3000 Imager (vgl. Kapitel 2.6.3.) kennzeichnet automatisch Proteinbanden, deren Signalstärke über dem Detektionslimit der CCD-Kamera liegen. Ein Überschreiten der oberen Sensitivitätsgrenze der CCD-Kamera ist somit nachvollziehbar. Die Proteinmengen der Standardkurve wurden so abgestimmt, dass sie stets innerhalb des Limits der CCD-Kamera lagen. Anhand der in Abb. 10A gezeigten Standardreihe wurden Eichgeraden für jedes rekombinante Protein mit Hilfe der Auswertungssoftware *Image Gauge 3.01 (Fujifilm)* erstellt (Abb. 10B). Die Analyse der Eichgeraden zeigte in etwa einen linearen Verlauf des Schwärzungsgrads der Proteinbanden von der unteren Detektionsgrenze des jeweiligen rekombinanten Proteins bis zu einem Maximalauftrag von 160 ng des jeweiligen rekombinanten Proteins (Abb. 10A). Ein lineares Regressionsmodell kann folglich für die Berechnung unbekannter Proteinmengen angewendet werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung zeigte sich, dass für PFV Gag der zu analysierende Bereich bis zu einer Obergrenze von 800 ng erweitert werden musste, aber auch in diesem Bereich erwies sich die Regression als linear (vgl. Abb. 13).

3.1.3. Aufreinigung der PFV Virionen

Vor dem Beginn der eigentlichen Experimente wurde eine größere Menge an Virusüberstand hergestellt, der anschließend zur Infektion der Zellkulturen verwendet wurde. Zu diesem Zweck wurden 293T Zellen mit dem proviralen Konstrukt pcHSRV2 (Moebes et al. 1997) nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Die Ernte des Überstandes erfolgte 48 h nach Transfektion (vgl. Kapitel 2.5.2.). Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die folgenden Experimente wurde jeweils ein Aliquot des infektiösen Überstandes aufgetaut und frische BHK-21 Zellkulturen infiziert. Die Ernte der Überstände erfolgte, wenn die Zellkulturen Anzeichen einer produktiven Virusvermehrung zeigten.

Der experimentelle Ablauf zur Gewinnung aufkonzentrierter PFV Virionen ist in Abb. 11 dargestellt. Nach Ernte des infektiösen Überstandes wurden die Partikel in einem ersten Zentrifugationsschritt durch ein 20% Saccharosekissen aufkonzentriert. Das resultierende Pellet wurde in DMEM gelöst und damit anschließend ein vorbereiteter Optiprep-Dichtegradienten überschichtet (vgl. Kapitel 2.5.6.). Nach der Zentrifugation des Dichtegradienten erfolgte von der Spitze des Gradienten her die Abnahme von 10 Fraktionen a 200 μl sowie die Aufnahme des Pellets in PBS/PPP. Von den gewonnenen Fraktionen wurden 20 μl sofort für die Bestimmung des infektiösen Titers verwendet. Dies geschah

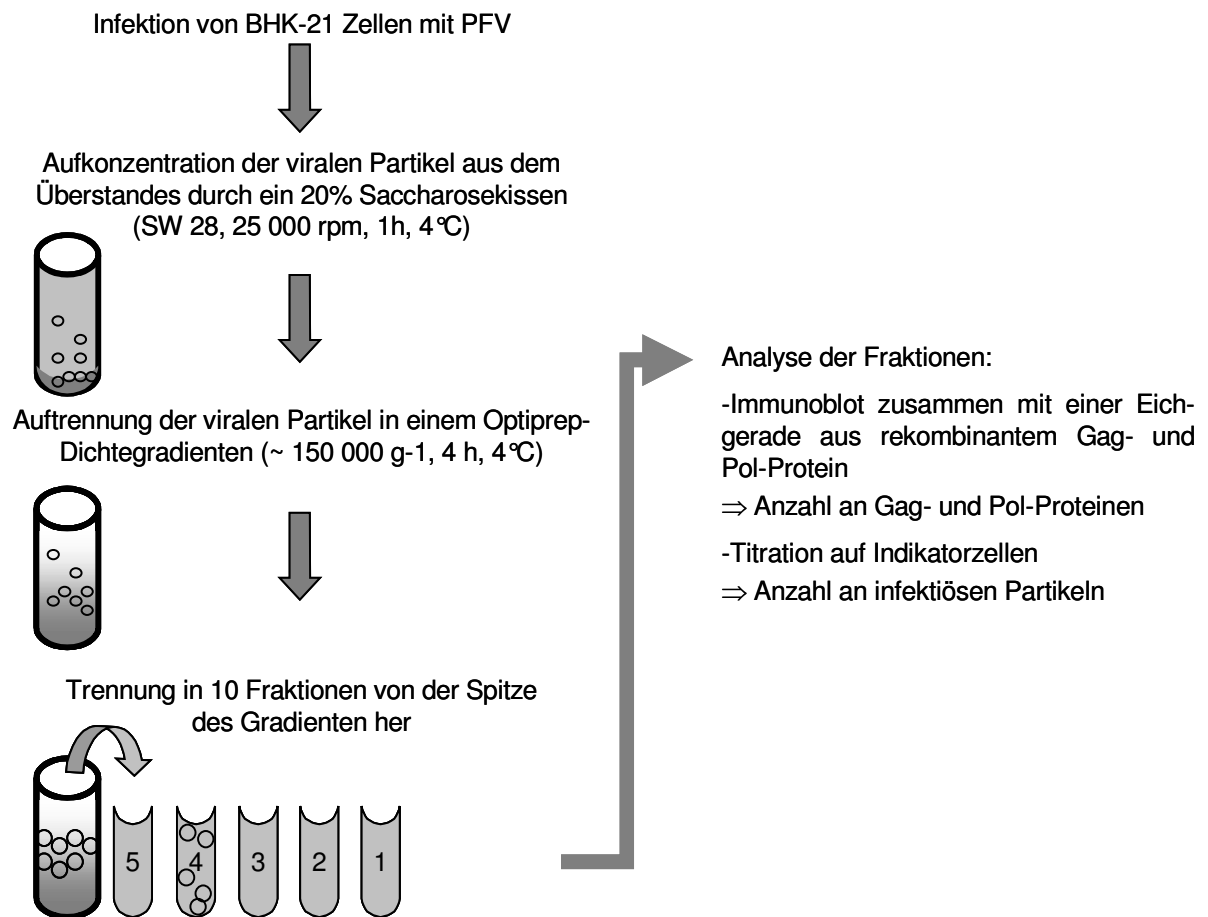


Abb. 11: Vorgehensweise bei der Aufkonzentration und Isolation von PFV Virionen.

durch Titration einer Verdünnungsreihe auf die Indikatorzelllinie BHK/LTR(PFV)/acZ (Schmidt und Rethwilm 1995, vgl. Kapitel 2.5.4.). Für die Bestimmung des Brechungsindex der einzelnen Fraktionen mittels eines geeichten Refraktometers wurden weitere 30 µl pro Fraktion verwendet. Von jeder Fraktion wurden 100 µl mit dem gleichem Volumen zweifachen Proteinprobenpuffers vermischt, aufgekocht und bis zur Analyse im Immunoblot bei -80°C aufbewahrt. Ebenfalls bei -80°C wurde der restliche Teil der Fraktionen (ca. 50 µl) gelagert.

Im Rahmen der Vorexperimente wurden die zu erwartenden Verhältnisse an viralen Proteinen in den Virusaufreinigungen abgeschätzt. Dazu wurden aus einem Teil des für die weiteren Infektionsschritte hergestellten Überstandes die Viruspartikel durch Zentrifugation durch ein 20% Saccharosekissen präpariert. Aus den infizierten BHK-21 Zellkulturen wurde ein Zelllysate hergestellt und beide im Immunoblot analysiert (Abb. 10A). Es zeigte sich, dass die zelluläre Expression von Gag und Pol ein etwa gleich starkes Signal im Immunoblot lieferte, wogegen in der Präparation der Viruspartikel das Gag-Signal deutlich dominierte.

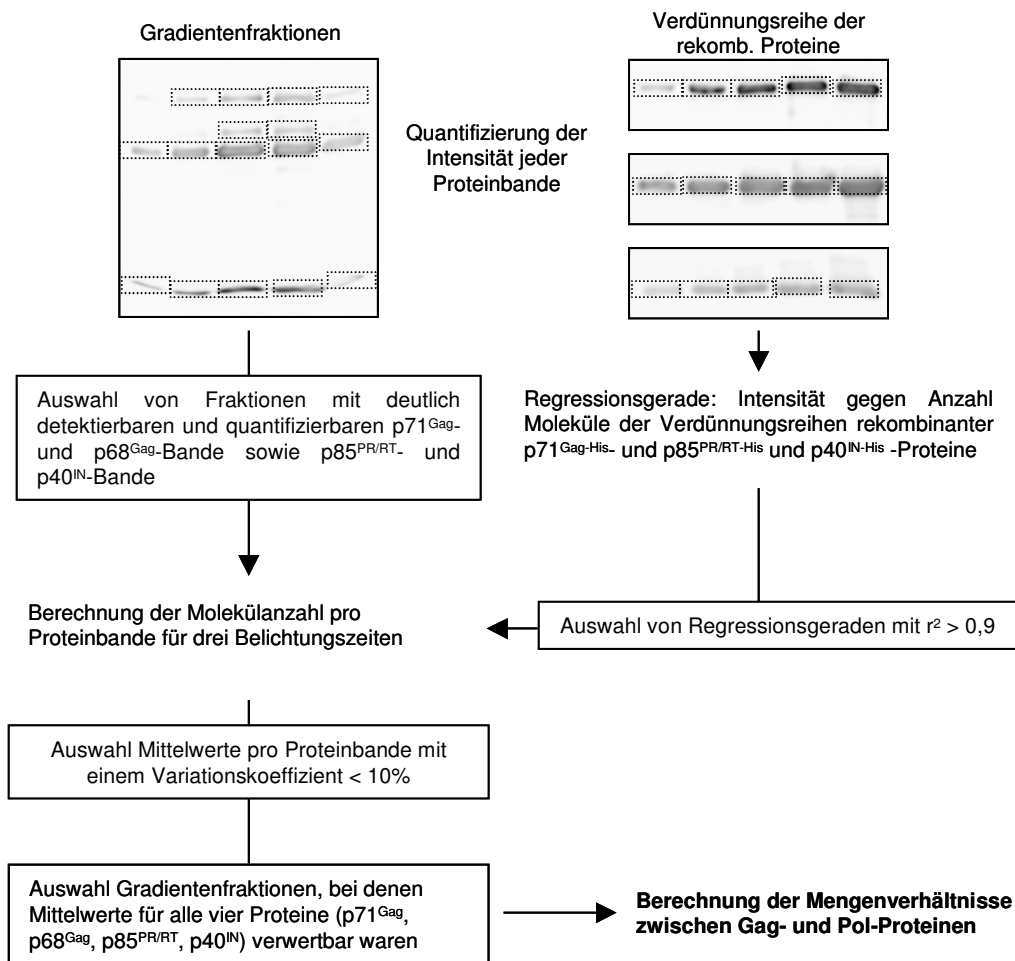


Abb. 12: Vorgehensweise bei der Auswertung der Immunoblots zur Bestimmung der Gag/Pol-Ratio in PFV Virionen.

Die Ausschlusskriterien auf den verschiedenen Ebenen sind umrandet.

Auf diesen zu erwartenden Konzentrationsunterschied hin wurden in den folgenden Experimenten die Standardkurven der Proteinverdünnungen ausgelegt.

3.1.4. Bestimmung des Gag/Pol-Verhältnisses im Gradientenmaterial

Für die Bestimmung des Gag/Pol-Verhältnis in PFV Partikeln wurden die Fraktionen eines Gradienten zusammen mit Verdünnungsreihen der rekombinanten PFV Proteine p71^{Gag-His}, p85^{PR/RT-His} und p40^{IN-His} im Immunoblot analysiert (vgl. Kapitel 3.1.2.). Mit Hilfe der Software *Image Gauge 3.1 (Fujifilm)* wurde die Intensität des Detektionssignales (“Schwärzung”) jeder Proteinbande auf Basis einer einheitlichen Fläche gemessen. Ebenso wurde die Hintergrundintensität berechnet.

Für die weitere Auswertung wurde anstatt der Menge an aufgetragenen Protein (ng Protein) als Basiseinheit die entsprechende Molekülanzahl an Protein verwendet. Die molekulare

Größe aller drei rekombinanten Proteine wurde anhand der Aminosäuresequenz ermittelt (Clone Manager 5, *Scientific & Educational Software*) und daraus das Molekulargewicht nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Molekulargewicht} = \text{Molekularmasse in Da} \times 1,66 \text{ e}^{-24} \text{g};$$

mit $1,66 \text{ e}^{-24} \text{g}$ = Masse 1 Wasserstoffatom (= atomare Masseneinheit u) = 1 Da.

Daraus folgte für das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine:

$$p71^{\text{Gag-His}}: \text{ molekulare Größe: } 70124 \text{ Da} \rightarrow \text{ Molekulargewicht: } 1,16 \text{ e}^{-10} \text{ ng};$$

$$p85^{\text{PR/RT-His}}: \text{ molekulare Größe: } 86425 \text{ Da} \rightarrow \text{ Molekulargewicht: } 1,43 \text{ e}^{-10} \text{ ng};$$

$$p40^{\text{IN-His}}: \text{ molekulare Größe: } 45252 \text{ Da} \rightarrow \text{ Molekulargewicht: } 7,51 \text{ e}^{-11} \text{ ng}.$$

Anhand des spezifischen Molekulargewichts der rekombinanten Proteine wurden die Auftragsmassen (ng Protein) der Verdünnungsreihen in die Anzahl an Proteinmolekülen pro Proteinbande umgerechnet.

Für die Verdünnungsreihen der rekombinanten Proteine wurden die Intensitätswerte der Proteinbanden gegen die jeweilige Anzahl an Molekülen pro Proteinbande aufgetragen und eine lineare Regression mit der Regressionsgleichung

$$y = ax + b,$$

mit y : Anzahl Moleküle, x : Intensität, a und b : Regressionskoeffizienten;

erstellt. Der Schnittpunkt mit dem 0-Punkt der y -Achse wurde durch den Wert der Hintergrundintensität definiert. Mit Hilfe der Regressionsgeraden wurden die Anzahl an Molekülen pro Gag- bzw. Pol-Bande in den Gradientenfractionen berechnet. Dabei wurden nur Regressionsgeraden mit einem quadratischen Korrelationskoeffizienten $r^2 > 0,9$ für die Berechnung herangezogen. Für jeden Immunoblot wurden diese Werte bei drei verschiedenen Belichtungszeiten mit jeweils neu berechneten Regressionsgeraden ermittelt. Damit konnten die Intensitätswerte der Proteinbanden auf ein nichtlineares Verhalten bei variierender Expositionszeit des Immunoblots überprüft werden. Nachdem für jede Proteinbande in den Gradientenfractionen die Anzahl an Molekülen bei drei verschiedenen Belichtungszeiten ermittelt worden war, wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Lag der Variationskoeffizient aus Mittelwert und Standardabweichung über 10%, wurde die Proteinbande aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für die Berechnung der Mengenverhältnisse wurden nur Fraktionen eines Gradienten berücksichtigt, in denen eindeutig die beiden Gag-Proteine $p71$ und $p68$ sowie die Pol-Prozessierungsprodukte $p85^{\text{PR/RT}}$ und $p40^{\text{IN}}$ detektiert und quantifiziert werden konnten. Der komplexe Berechnungsweg ist noch einmal in Abb. 12 dargestellt und die auf jeder Stufe erhobenen Ausschlußkriterien hervorgehoben.

Tab. 4: Stöchiometrische Verhältnisse der Gag/Pol-Proteinkomponenten, wie sie experimentell für aufgereinigte PFV Partikel ermittelt wurden (n = 37).

	Mittelwert	Stabw.	Maximum	Minimum
$p71^{\text{Gag}} + p68^{\text{Gag}} : p85^{\text{PR/RT}}$	15,8 : 1	5,6	26,3 : 1	6,8 : 1
$p71^{\text{Gag}} + p68^{\text{Gag}} : p40^{\text{IN}}$	9,8 : 1	7,8	41,3 : 1	3,0 : 1
$p68^{\text{Gag}} : p71^{\text{Gag}}$	4,2	2,0	8,0	1,3
$p40^{\text{IN}} : p85^{\text{PR/RT}}$	2,0	0,6	3,6	0,5

Zu Beginn wurde jeder Gradient mit einer eigenen Verdünnungsreihe an rekombinanten Proteinen analysiert. Als sich zeigte, dass die viralen Proteine stets in einer der mittleren Fraktionen nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 13), wurden im weiteren Verlauf auch die mittleren Fraktionen von zwei Gradienten zusammen mit einer gemeinsamen Verdünnungsreihe untersucht. Insgesamt konnte für 37 Fraktionen aus 12 Gradienten die Menge an Gag- und Pol-Protein sowie der infektiöse Titer bestimmt werden.

3.1.5. Ergebnisse der Gag/Pol-Bestimmung in PFV Virionen

Die Auswertung ergab ein stöchiometrisches Verhältnis von 16 Gag-Molekülen ($p71^{\text{Gag}} + p68^{\text{Gag}}$) zu einer $p85^{\text{PR/RT}}$ -Untereinheit von Pol (Tab. 4). Erstaunlicherweise lag das stöchiometrische Verhältnis zwischen den beiden Pol-Untereinheiten $p85^{\text{PR/RT}}$ und $p40^{\text{IN}}$ nicht annähernd bei 1, sondern es wurden etwa doppelt so viele Integrase-Untereinheiten $p40^{\text{IN}}$ wie $p85^{\text{PR/RT}}$ -Untereinheiten nachgewiesen (Tab. 4). Von den beiden Gag-Untereinheiten wurden etwa viermal mehr $p68^{\text{Gag}}$ -Protein als wie unprozessiertes $p71^{\text{Gag}}$ in den Partikelpräparationen gefunden.

Da in diese Auswertung alle 37 analysierbaren Fraktionen mit eingeflossen sind, könnte die stöchiometrische Proteinzusammensetzung zwischen einzelnen Fraktionen innerhalb eines Gradienten variieren. Dies wäre der Fall, wenn es zu einer Dichtentrennung etwaiger unvollständig zusammengesetzter Partikel und infektiösen PFV Virionen käme und diese sich in unterschiedlichen Fraktionen akkumulieren würden. Für eine Überprüfung dieser Vermutung wurden die Fraktionen nach ihrem relativen Gehalt an infektiösen Partikeln innerhalb eines Gradienten in zwei Hälften geteilt. Als Hauptfraktionen mit hoher Infektiosität wurden diejenigen Fraktionen definiert, die einen relativen Anteil an infektiösen Partikeln von >40 % in einem Gradient aufwiesen. Alle anderen Fraktionen mit einem relativen Anteil an infektiösen Partikeln von < 40 % in einem Gradient wurden als Nebenfraktionen klassifiziert. Die relativen infektiösen Titer jeder Fraktion eines Gradienten (RIT in %) wurden nach der folgenden Formel ermittelt:

Tab. 5: Vergleich von Haupt- und Nebenfraktionen der ausgewerteten Gradienten.

	Mittelwert +/- Stabw.		Mann-Whitney-U	p-Wert
	Hauptfraktion (n = 15)	Nebenfraktion (n = 22)		
p71 ^{Gag} + p68 ^{Gag} : p85 ^{PR/RT}	17,4 +/- 6,2	14,7 +/- 4,9	122	0,2
p71 ^{Gag} + p68 ^{Gag} : p40 ^{IN}	11,1 +/- 9,2	8,9 +/- 6,7	130,5	0,3
p68 ^{Gag} : p71 ^{Gag}	4,8 +/- 2,3	3,8 +/- 1,7	125	0,2
p40 ^{IN} : p85 ^{PR/RT}	1,9 +/- 0,6	2,0 +/- 0,7	164	0,9

relativer infektiöser Titer einer Fraktion RIT (%) = Titer Fraktion (ffu/ml) / Summe Titer aller Fraktionen eines Gradienten (ffu/ml) x 100.

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Mengenverhältnisse der einzelnen Proteinkomponenten von Haupt- und Nebenfraktionen wurden berechnet und mittels eines nichtparametrischen Tests miteinander verglichen (Tab. 5). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den relativen Proteinmengen zwischen Haupt- und Nebenfraktionen festgestellt werden (Tab. 5).

Die Anzahl an Gag- und Pol-Molekülen pro Fraktion korrelierten ebenfalls miteinander, so dass auch hier keine Verschiebung der Mengenverhältnisse in verschiedenen Fraktionen zu erwarten war (Nichtparametrische Korrelation nach Spearman, p68^{Gag} + p71^{Gag} mit p85^{PR/RT}: $\phi = 0,73$, $p < 0,001$; p68^{Gag} + p71^{Gag} mit p40^{IN}: $\phi = 0,73$, $p < 0,001$).

Die Dichte des Gradientenmediums wurde für jede Fraktionen eines Gradienten über den Brechungsindex bestimmt. Während der Zentrifugation sollten sich die viralen Partikel in dem Teil des Gradientenmediums ansammeln, dessen Dichte der Eigendichte der viralen Partikel entspricht. Fehlerhaft zusammengesetzte Partikel oder Proteinaggregate sollten sich mit dieser Methode von infektiösen Virionen abtrennen lassen. Neben dem Brechungsindex wurde auch der infektiöse Titer jeder Gradientenfraktion durch Titration auf Indikatorzellen bestimmt. Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen den im Immunoblotassay ermittelten Proteinmengen und den infektiösen Titern überprüft. Wie aus dem Beispiel in Abb. 13 deutlich wird, wurde der höchste Infektionstiter in der Fraktion gemessen, in der auch im Immunoblot die stärksten Proteinbanden detektiert wurden. Trägt man den infektiösen Titer gegen die berechnete Gesamtmenge an viralen Protein jeder Fraktion gegeneinander auf, so ergibt sich eine gute Korrelation zwischen den beiden Werten (Abb. 14, n = 37, nichtparametrische Korrelation nach Spearman, $\phi = 0,69$, $p < 0,001$). Das isolierte virale Proteinmaterial stammte folglich von aufgereinigten infektiösen Partikeln. Hinweise auf weitere Fraktionen, in denen sich unvollständige, nicht-infektiöse Viruspartikel anreicherten, ergaben sich auch aus diesen Daten nicht.

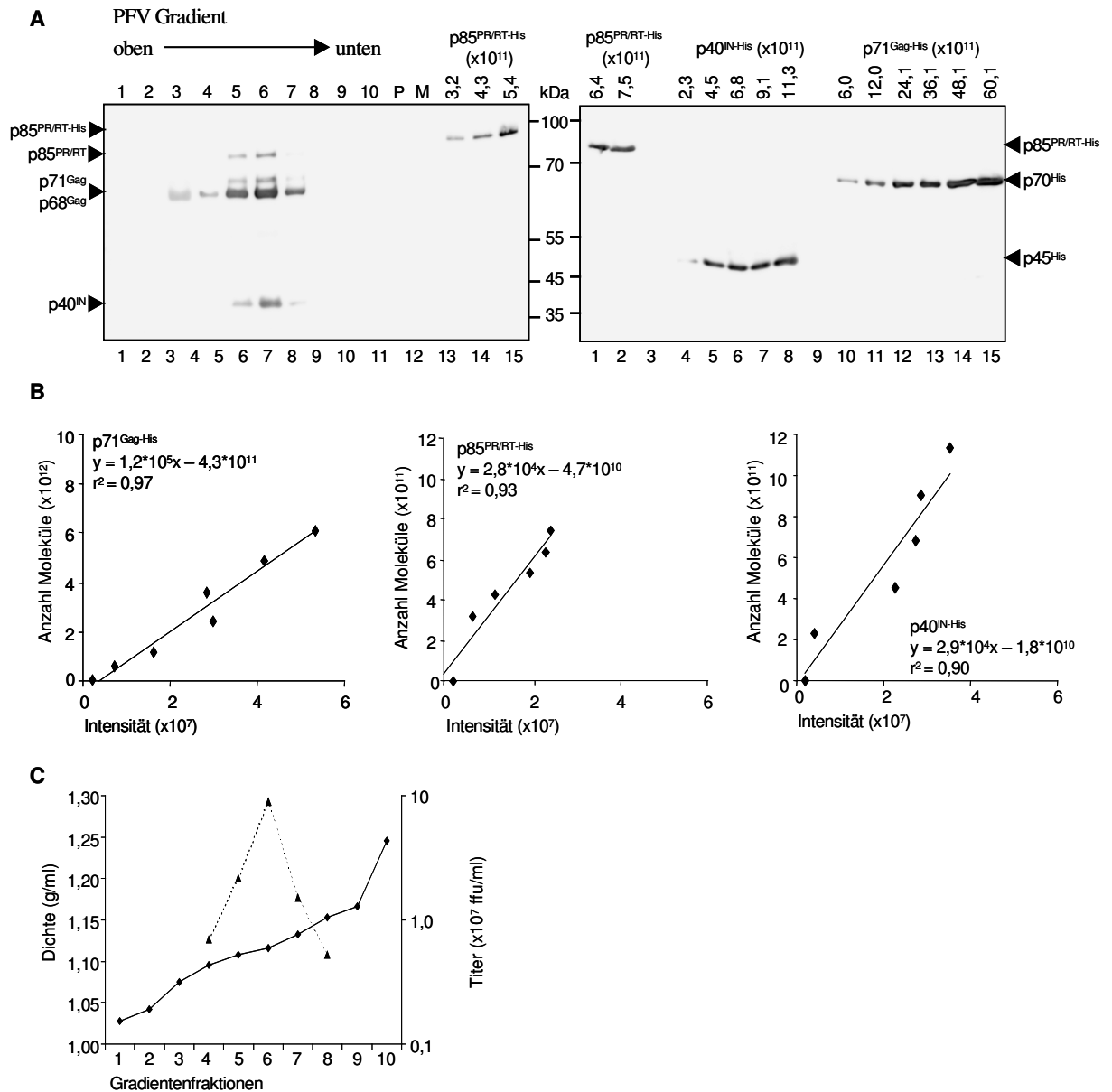


Abb. 13: Analyse eines Dichtegradienten von PFV Partikeln.

(A) Immunoblot eines Dichtegradienten und einer Verdünnungsreihe rekombinanter Proteine. Die Präparation des Dichtegradienten erfolgte wie in Abb. 4 und im Text beschrieben. Der Immunoblot wurde mit einem Gemisch der Hybridomaüberstände SGG1 (α -PFV Gag), 15E10 (α -PFV Pol p85^{PR/RT}) und 3E11 (α -PFV Pol p40^{IN}) inkubiert. P: Pellet des Dichtegradienten. M: Markerspur. (B) Beziehung zwischen dem Auftrag an rekombinantem Gag- und Pol-Protein der Verdünnungsreihe in (A), ausgedrückt in der Anzahl an Molekülen pro Proteinbande, und der Intensität des Detektionssignales der jeweiligen Proteinbande im Immunoblot. Anhand der linearen Regressionsgleichung der Verdünnungsreihe des rekombinanten Proteins p71^{Gag-His} wurden die Mengen an p71^{Gag} und p68^{Gag} in den Fraktionen des Dichtegradienten abgeschätzt. Ebenso wurde die Menge an p85^{PR/RT}- bzw. an p40^{IN}-Protein in den Gradientenfraktionen anhand der Regressionsgleichung der jeweiligen Verdünnungsreihen der rekombinanten Proteine p85^{PR/RT-His} und p40^{IN-His} berechnet. Der quadratische Korrelationskoeffizient r^2 ist für jede Gleichung angegeben. (C) Beziehung zwischen der Dichte und dem infektiösen Titer der Fraktionen des in (A) gezeigten Gradienten.

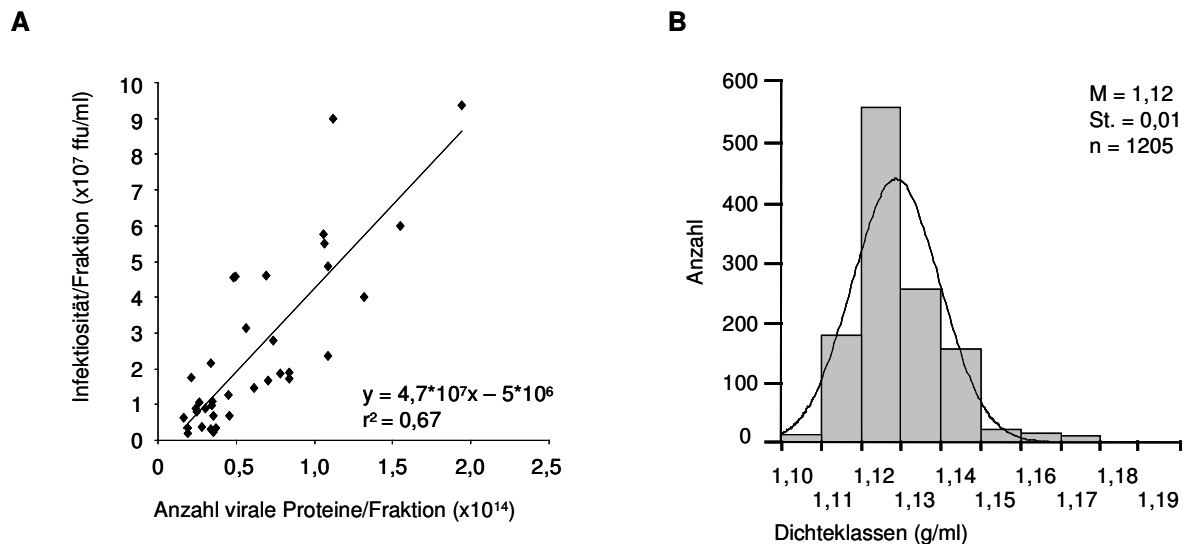


Abb. 14: Analyse der Dichte und der infektiösen Titer der Gradientenfractionen.

(A) Korrelation zwischen dem Gehalt an viralem Gesamtprotein und dem infektiösen Titer der Gradientenfractionen ($n = 37$). Die Regressionsgleichung wurde berechnet und ist zusammen mit dem quadratischen Korrelationskoeffizienten r^2 angegeben, die Regressionsgerade wurde ebenfalls eingezeichnet. (B) Verteilung der Dichte der ausgewerteten Gradientenfractionen, aufgetragen in Klassen von 0,1 g/ml. Die Gradientenfractionen wurden zuvor mit ihren relativen infektiösen Titer gewichtet. Eine Normalverteilungskurve wurde über den Datenplot gelegt. M: Mittelwert. St.: Standardabweichung. n: Probenanzahl.

Über den Zusammenhang der Dichte und dem relativen infektiösen Titer RIT (%) jeder Fraktion konnte die durchschnittliche Dichte infektiöser PFV Partikel bestimmt werden (zur Berechnung des RIT siehe vorhergehenden Abschnitt). Die gemessenen Dichten der Fraktionen wurden mit ihren relativen infektiösen Titer RIT gewichtet und auf Normalverteilung überprüft. Die Verteilung der gewichteten Dichten aller Fraktionen erwies sich als Normalverteilt mit einem Mittelwert von 1,119 g/ml (Abb. 14B: Klassen in 0,1 g/ml Schritten, $n = 1205$, Kolmogorof-Smirnof $Z = 7,267$, $p < 0,001$).

3.2. FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG DES PFV GAG-PROTEINS

In Analogie zu den Funktionen des Matrixanteils orthoretroviraler Gag-Proteine werden am N-Terminus des PFV Gag-Proteins funktionelle Abschnitte für den intrazellulären Transport, die Interaktion mit dem Hüllprotein und für eine eventuell Gag-Gag-Interaktion vermutet. Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente war es, die für Morphogenese und Freisetzung von Viruspartikeln relevanten Bereiche im N-Terminus des foamyviralen Gag-Proteins zu lokalisieren und zu charakterisieren. Um zunächst eine Abgrenzung wichtiger funktioneller Bereiche vornehmen zu können, wurden zu Beginn der Untersuchung einzelne größere Gag-Deletionsmutanten hergestellt und ihr Phänotyp charakterisiert.

3.2.1. Herstellung und Untersuchung C-terminaler Gag-Deletionsmutanten

In einer Deletionsanalyse wurde als erster Schritt untersucht, inwieweit sich das PFV Gag-Protein vom C-Terminus her verkürzen lässt, ohne die Freisetzung von Viruspartikeln zu unterbinden. Dazu wurden eine Reihe von Mutanten mit zunehmenden C-terminalen Deletionen konstruiert und analysiert.

Klonierungsarbeiten am 5'-Ende des PFV *gag*-ORF sind schwierig vorzunehmen, da die DNA-Sequenz keine geeigneten Restriktionsschnittstellen aufweist. Um dieses Problem für die weiteren Klonierungsschritte zu beheben, wurde eine *NheI*-Schnittstelle mittels rekombinanter PCR eingeführt. Die neue Schnittstelle führte zu einer Änderung der Aminosäureabfolge in PFV Gag von As 123/124 Serin/Serin→Alanin/Serin (pMC48, Abb. 15). Wie in den folgenden Experimenten gezeigt werden konnte, führte diese Mutation zu keinen phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu dem wildtypischen Gag.

Das PFV Gag-Protein besitzt anstelle der Cys/His-Box der Gag-Proteine konventioneller Retroviren in seinem C-terminalen Drittel drei Glyzin/Arginin-reiche Abschnitte (GR-Boxen I - III, vgl. Kapitel 1.2.2.). Um einen möglichen Einfluss dieser drei funktionellen Abschnitte auf die Partikelmorphogenese zu untersuchen, wurde je ein vor den GR-reichen Sequenz I, II und III terminiertes Gag-Expressionskonstrukt geschaffen (pMC51 Δ C482, pMC52 Δ C544 und pMC53 Δ C594, Abb. 15).

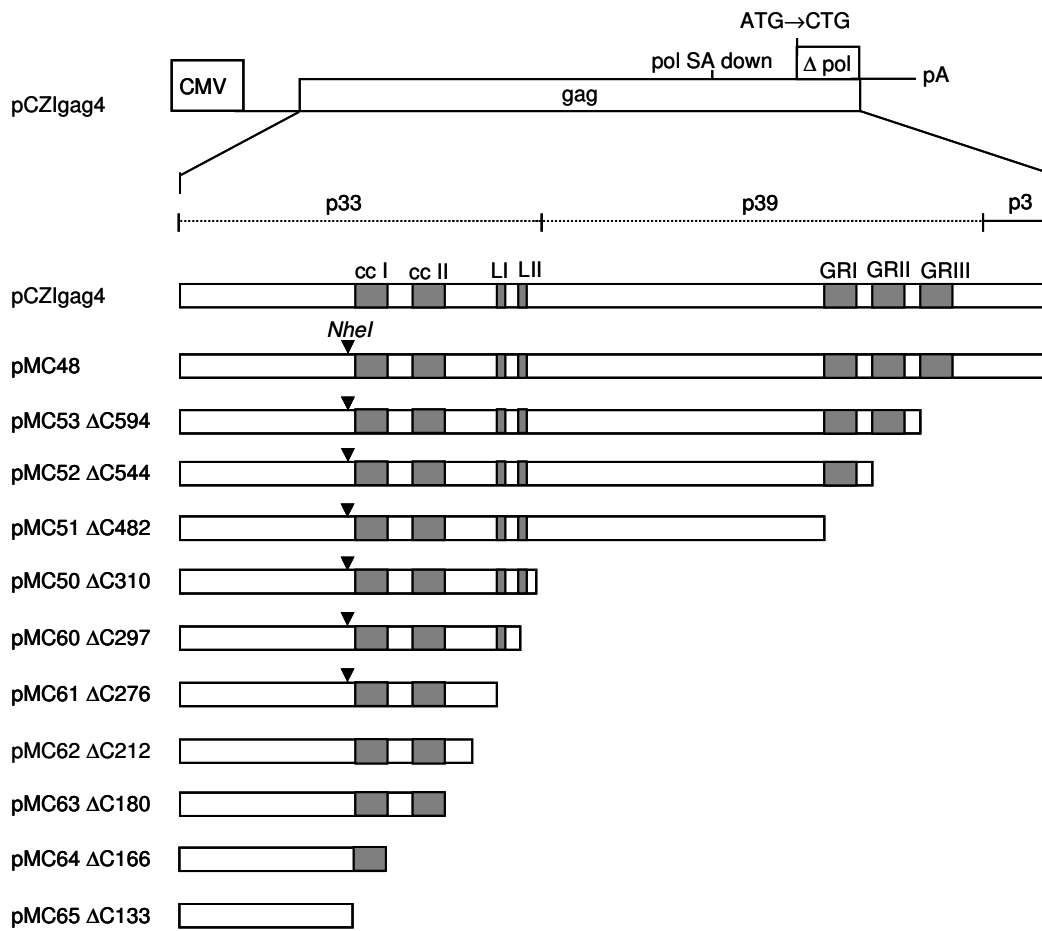


Abb. 15: Schematische Darstellung der C-terminalen PFV Gag Deletionskonstrukte.

Die primären (p3: durchgezogene Linie) und hypothetischen sekundären (p33 und p39: gepunktete Linie, Flügel und Pfrepper 2003, Lehmann-Che et al. 2005) Spaltprodukte des Gag-Proteins sind angedeutet. Funktionelle Bereiche des Gag-Proteins sind hervorgehoben.

ATG→CTG: mutiertes Startkodon des *pol*-ORF; cc I und cc II: anhand von Sequenzanalysen ermittelte „coiled-coil“-Motive (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Petit et al. 2003); CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; GRI, GRII, GRIII: Glyzin-Arginin-reiche Sequenzabschnitte (Schliephake und Rethwilm 1994); LI, LII: potentielle „Late“-Domänen (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005); *pol* SA down: TTAG→CTCG mutierter Spleißakzeptor von *pol*; Δ*pol*: Deletion des *pol*-ORF 3' des *gag*-ORF; polyA: PoyA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons.

Anhand von *in vitro*-Experimenten mit der PFV Protease und rekombinanten PFV Gag-Protein bzw. Peptiden mit den entsprechenden Prozessierungsstellen wurden für das PFV Gag-Protein neben der primär genutzten p68/p3-Spaltstelle am C-Terminus weitere potentielle sekundäre und tertiäre Spaltungstellen vorausgesagt (Pfrepper et al. 1999). Die erste potentielle Spaltungstelle würde ein N-terminales 33 kDa großes Spaltprodukt entstehen lassen. Dieses Prozessierungsprodukt lässt sich nicht in virus-produzierenden Zellen oder Virionen nachweisen (vgl. Flügel und Pfrepper 2003). Die entsprechende Spaltstelle zwischen As 311/312 im PFV Gag-Protein ist aber essentiell für die Infektiosität der PFV Virionen (Pfrepper et al. 1999). Sie wird für das Auseinanderbauen des Viruskapsids nach Eintritt in eine neue Wirtszelle benötigt (Lehman-Che et al. 2005). Das

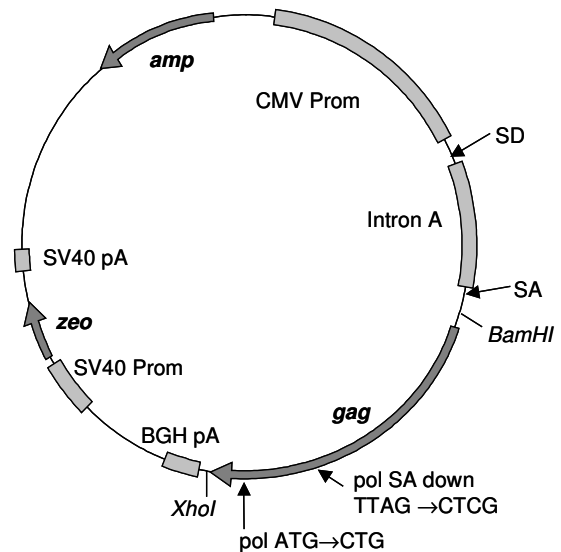
Prozessierungsprodukt wäre von seiner Lage her homolog zu dem Matrixanteil der Gag-Proteine konventioneller Retroviren, würde von seiner Größe aber auch Teile des Kapsidanteils konventioneller Retroviren umfassen. Für ASLV und SIV konnte gezeigt werden, dass der Matrixanteil von Gag alleine fähig ist, von der Zelle membranumhüllte Partikel abzuschnüren, allerdings wiesen diese Partikel in beiden Fällen eine vom Wildtypus abweichende Morphologie und Dichte auf (Weldon und Wills 1993; Gonzales et al. 1993). Um die Fähigkeit eines hypothetischen Matrixproteins von PFV auf Partikelfreisetzung zu testen, wurde ein PFV Gag p33-Expressionskonstrukt hergestellt (pMC50 Δ C310, Abb. 15). Unmittelbar am C-Terminus des p33^{Gag}-Proteins liegen zwei kurze Sequenzabschnitte, die zu den bekannten L-Domänen anderer Viren homolog sind. Das Motiv *PSAP* (Abb. 15: LI, As 284 - 288) konnte als funktionelle L-Domäne von PFV Gag charakterisiert werden, das zweite Motiv *PPPI* (Abb. 15: LII, As 298 – 301) zeigt keine L-Domänenfunktion im engeren Sinne, setzt aber bei Mutation die Infektiosität der freigesetzten Partikel herab (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005). Um die Funktion dieser beiden Domänen im Kontext eines deletierten Gag-Proteins zu untersuchen, wurden Mutanten mit Stop-Kodons jeweils vor diesen beiden Aminosäureabschnitten konstruiert (Abb. 15: pMC60 Δ C297, pMC61 Δ C276). Das Konstrukt pMC62 Δ C212 (Abb. 15) terminiert das Gag-Protein 5' vor einem 150 As langen Abschnitt, der nur in den Gag-Proteinen der Foamyviren von Primaten gefunden wird (PFV, SFV-1, SFV-3), nicht aber in den Gag-Sequenzen der Foamyviren anderer Säugetiere (FFV, EFV, BFV). Im Gegensatz dazu ist der gesamte vorhergehende N-Terminus des Gag-Proteins zwischen allen Foamyviren in einem hohen Maße konserviert. Computeranalysen des PFV Gag-Proteins ergaben für den Proteinabschnitt zwischen As 130 – 180 eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung zweier „coil-coiled“-Motive (Abb. 15, Tobaly-Tapiero et al. 2001). Das Gag-Expressionskonstrukt pMC63 Δ C180 terminiert das Protein unmittelbar 3' des zweiten potentiellen coiled-coil Motivs, der als „MTOC (MicroTubuli Organising Center) targeting domain“ beschrieben wurde und möglicherweise der Interaktion mit dem zellulären Mikrotubuligerüst dient (Abb. 15: cc II, Petit et al. 2003). Eine weitere Deletionsmutante, pMC64 Δ C166, beinhaltet noch das erste potentielle coiled-coil Motiv, das ebenfalls eine essentielle Rolle bei Morphogenese und Freisetzung der foamyviralen Partikel spielen soll (Abb. 15: cc I, Tobaly-Tapiero et al. 2001). Das kürzeste Gag-Expressionskonstrukt pMC65 Δ C133 terminiert das Gag-Protein nach 133 As unmittelbar 5' vor diesem „coil-coiled“-Motiv (Abb. 15: cc I).

Als Ausgangskonstrukt für die Deletionsmutanten wurde das PFV Gag-Expressionsplasmid pCZlgag4 gewählt. Das Konstrukt basiert auf pCZlgag2 (Heinkelein et al. 2002a) und enthält den vollständigen PFV *gag*-ORF sowie den überlappenden Teil des PFV *pol*-ORF, wobei

Abb. 16: Schematische Darstellung des PFV Gag-Expressionskonstruktes pCZlgag4.

Das Plasmid basiert auf dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+Zeo (*Invitrogen*). Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten des Vektors sowie die beiden für die Klonierungsarbeiten verwendeten Schnittstellen. Im *gag*-ORF wurden der Spleißakzeptor (pol SA down) sowie das Startkodon von Pol (pol ATG→CTG) mutiert, um eine Expression der Reste des *pol*-ORF zu unterbinden (vgl. Heinkelein et al. 2002a).

amp: Ampicillinresistenzgen; BGH polyA: PoyA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons; CMV Prom: Promotor/Enhancer des CM-Virus; SA: Spleißakzeptor; SD: Spleißdonor; SV40 pA: PolyA-Sequenz des SV40 Virus; SV40 Prom: Promotor des SV-40 Virus; zeo: Zeocinresistenzgen.



Translationsstart und Spleißakzeptor von Pol mutiert sind, um eine Expression vom verbleibenden *pol*-ORF zu verhindern (Abb. 16). Der *gag*-ORF steht unter Kontrolle des konstitutiv aktiven IE- (immediate early gene) Promotors und Enhancers des humanen Cytomegalievirus (CMV). Zwischen CMV-Promotor und *gag*-ORF wurde die foamyvirale Sequenzen 5' des *gag*-ORF durch ein CMV Intron A ersetzt (Abb. 16).

Für die Einführung der *NheI*-Schnittstelle bei As 123/124 (pMC48) wurde mit Hilfe einer rekombinanten PCR mit den äußeren Primern #909/#921 und dem inneren, mutagenen Primerpaar #912/#1125 ein 1,7 kB großes Fragment hergestellt. Dieses wurde anschließend *BamHI/XhoI* verdaut und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffneten Vektor pCZlgag4 eingesetzt.

Für die Herstellung der C-terminalen Deletionsmutanten Δ C276 bis Δ C594 wurde pMC48 mit *NheI* und *XhoI* geöffnet, wobei *XhoI* 3' des *gag*-ORF in der „Multiple Cloning Site“ (MCS) schneidet. Das resultierende 6,97 kB Fragment von pMC48 wurde mit ebenfalls *NheI/XhoI* geschnittenen Amplifikaten ligiert, die mit dem Senseprimer #912 und den Antisenseprimern #1474 (pMC53 Δ C594), #1462 (pMC52 Δ C544), #1463 (pMC51 Δ C482), #1461 (pMC50 Δ C310), #2263 (pMC60 Δ C297) und #2264 (pMC61 Δ C276) hergestellt worden waren. Über den jeweiligen Antisenseprimer war in jedes Amplifikat ein Stop-Kodon und eine 3' folgende *XhoI*-Restriktionsschnittstelle eingebaut worden.

Die weiteren C-terminalen Deletionen wurden in pCZlgag4 eingefügt. Mit Hilfe des Senseprimer #909, der an einer 5' des Gag-Startkodon liegenden *BamHI*-Schnittstelle bindet, und der Antisenseprimer #2265 - #2268 (pMC63 Δ C180 - pMC65 Δ C133) wurden PCR-Fragmente hergestellt. Dabei wurde wiederum über den jeweiligen Antisenseprimer ein Stop-Kodon und eine 3' folgende *XhoI*-Restriktionsschnittstelle in die Amplifikate eingebaut.

Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI//*Xho*I verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pCZlgag4 eingesetzt.

Die korrekten Sequenzen aller eingesetzten Fragmente sowie der Übergangsregionen wurden mittels Sequenzierung überprüft und es wurden keine unerwünschten Mutationen festgestellt.

Für die Freisetzung foamyviraler Partikel ist neben dem Strukturprotein Gag eine Koexpression des Glykoproteins nötig. Für die Bildung infektiöser Partikel bedarf es zusätzlich der Expression von Pol und einer verpackbaren infektiösen RNA. Für die Charakterisierung der C-terminalen Deletionskonstrukte wurden 293T-Zellen mit Expressionskonstrukten für Pol (pCZlpol1) und Env (pczHFVenvEM02), einem Vektorkonstrukt (pMD9) und dem wildtypischen bzw. den deletierten Gag-Expressionskonstrukten transfiziert (4-Plasmid-System). Die Herstellung von Zelllysaten und die Präparation der viralen Partikel aus dem Überstand der transfizierten Zellkulturen erfolgte 48 h n. T. (vgl. Kapitel 2.4.3. und 2.5.5.). Die zelluläre Expression der für die Freisetzung infektiöser Partikel notwendigen viralen Komponenten wurde parallel zur Analyse der Partikelpräparationen im Immunoblot überprüft. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde dieser Versuch dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Das Ergebnis einer Immunoblotanalyse ist exemplarisch für einen Versuch in Abb. 17 dargestellt.

Im Immunoblot der Zelllysate mit einem Gag-Antiserum war die Auftrennung der Gag-Proteine nach ihrem Molekulargewicht entsprechend der Größe ihrer C-terminalen Deletionen zu beobachten (Abb. 17A). Eine Prozessierung der deletierten Gag-Proteine durch die virale Protease erfolgte nicht, da alle Deletionen den p3-Anteil des PFV Gag-Proteins umfassten. Die Konstrukte pMC53 Δ C594 – pMC61 Δ C276 zeigten eine mit dem Wildtypus vergleichbare zelluläre Expression von Gag (Abb. 17A, Spur 10 – 15). Die stärker deletierten Konstrukte pMC62 Δ C212 – pMC64 Δ C166 zeigten im Immunoblot eine deutlich schwächere Reaktion ihrer Zelllysate als der Wildtypus (Abb. 17A, Spur 16 – 18). Die Gag-Mutante mit der größten C-terminalen Deletion pMC65 Δ C133 war selbst nach langer Belichtungszeit kaum nachweisbar (Abb. 17A, Spur 19). Es wurden von allen Mutanten mehrere Klone auf ihre zelluläre Expression untersucht, bei den fraglichen Konstrukten pMC62 Δ C212 – pMC65 Δ C133 wurde bei allen untersuchten Klonen stets ein ähnlich schwaches Gag-Signal im Immunoblot beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers, der speziell gegen den N-Terminus von PFV Gag gerichtet war (Kaninchen- α -PFV Gag 122), verbesserte nicht die Detektion der verkürzten Gag-Proteine im Immunoblot (Daten nicht gezeigt). Entweder erfolgte bei den

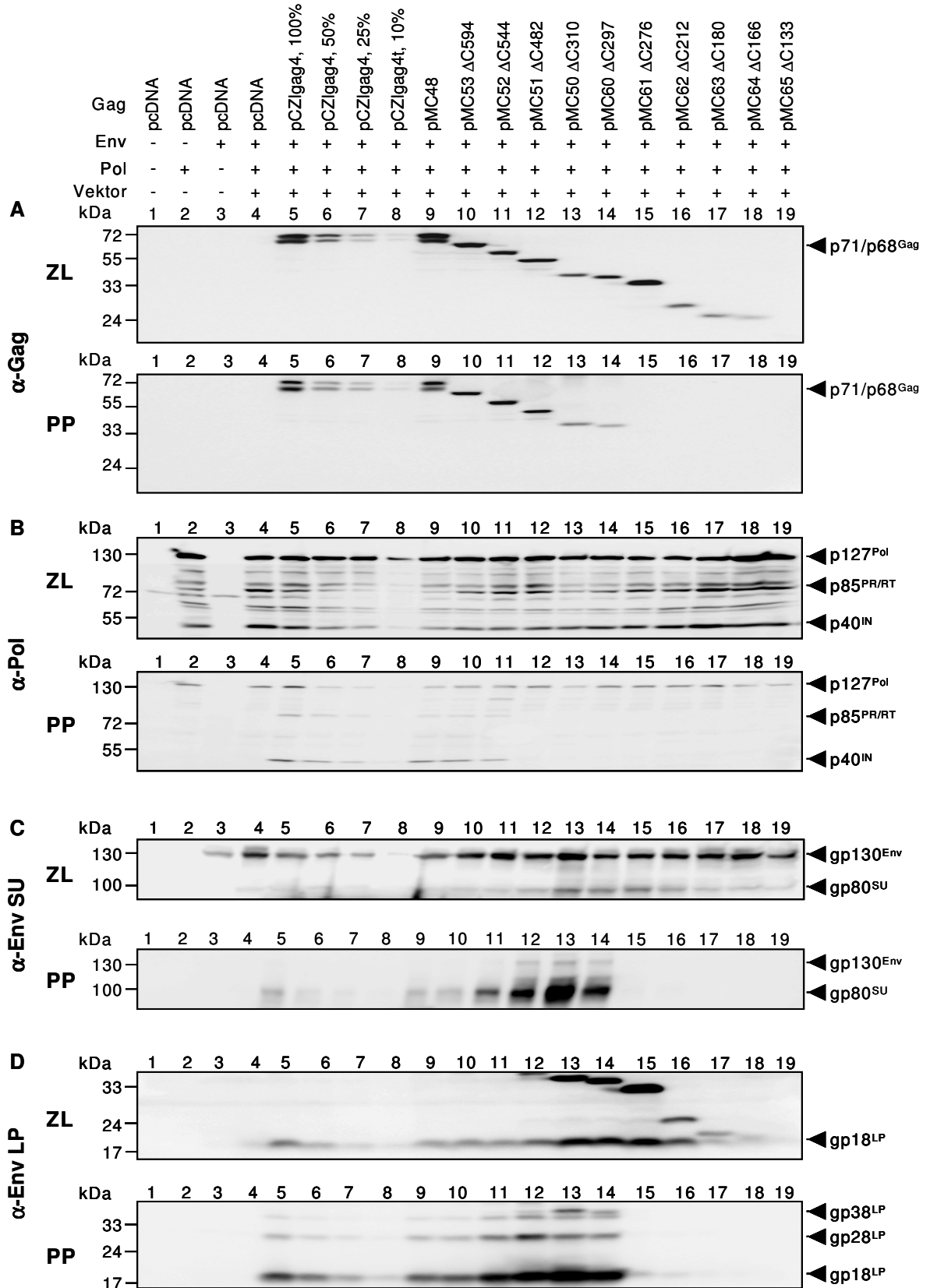


Abb. 17 (Legende siehe folgende Seite).

Abb. 17: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der C-terminalen Deletionskonstrukte.

293T-Zellen wurden mit dem 4-Plasmid-System (Gag: variabel, Pol: pCZlpol1, Env: pczHFVenvEM02, Vektor: pMD9) transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll geerntet. Die Spuren 1 – 4 umfassen Negativkontrollen. In den Spuren 5 – 8 ist das wildtypische Gag-Expressionskonstrukt pCZlgag4 in abnehmender Menge aufgetragen. Spur 9 enthält das Gag-Konstrukt pMC48 mit eingefügter *NheI*-Schnittstelle. Die Spuren 10 – 19 umfassen die C-terminalen Deletionskonstrukte. (A) Immunoblot mit dem Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Gag SGG 1. (B) Immunoblot mit dem Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Pol 3E11 & 15E10. (C) Immunoblot mit dem Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Env SU P3E10. (D) Immunoblot mit dem polyklonalen AK Kaninchen- α -PFV Env LP 1-86. ZL: Zellysate; PP: Partikelpräparation.

Konstrukten Δ C212 - Δ 133 eine schwächere zelluläre Expression der Gag-Proteine oder die verkürzten Gag-Proteine ließen sich im Immunoblot schlechter detektieren.

Wie aus Abb. 17B-D ersichtlich ist, wurden die viralen Proteine Pol und Env in allen Ansätzen in vergleichbaren Mengen gebildet. Die einzige Variable zwischen den Ansätzen stellte damit die jeweilige Gag-Proteinvariante dar.

In Abb. 17 ist auch der dazugehörige Immunoblot der Partikelpräparation dargestellt. Da in allen Ansätzen die zelluläre Expression der viralen Proteine nachgewiesen werden konnte, sollte abhängig von dem jeweiligen Gag-Konstrukt eine Freisetzung viraler Partikel erfolgen. Bei den Kontrollansätzen ohne Gag (Abb. 17, Spur 1-4) unterblieb erwartungsgemäß eine Freisetzung viraler Proteine aus der Zelle. Allerdings war bei allen Ansätzen, bei denen Pol koexprimiert worden war, im Immunoblot der Partikelpräparation das Vorläuferprotein p127^{Pol} nachweisbar (Abb. 17B, Spur 2, 4, 5-19). Bei Partikelpräparationen aus infizierten Zellkulturen findet sich selten ein schwacher Nachweis des Vorläuferproteins, der größte Anteil des Pol-Proteins liegt in seinen prozessierten Formen p85^{PR/RT} und p40^{IN} vor. Die Vorläuferbande p127^{Pol} war auch in den Partikelpräparationen zweier Kontrollansätze, die ansonsten keine Freisetzung viraler Proteine zeigten, zu detektieren (Abb. 17B, Spur 2 und 4). Es kann daher angenommen werden, dass die Freisetzung des Pol-Vorläuferproteins unabhängig von der Bildung viraler Partikel in Form von zellulären Membranvesikeln erfolgte. Dies lässt sich wahrscheinlich auf ein Überladen der Wirtszelle mit Pol-Protein zurückführen, hervorgerufen durch die sehr hohe Expressionsrate des CMV-Promotor kontrollierten Pol-Expressionskonstruktes. Bei Verwendung anderer Pol-Konstrukte mit geringerer Expressionsrate war dieses Phänomen nicht zu beobachten (Peters, Mannigel und Lindemann pers. Mitteilung). Der Nachweis der Verpackung von Pol in das Virion konnte in diesem Fall also nur über die prozessierten Formen p85^{PR/RT} und p40^{IN} im Immunoblot geführt werden.

Ein Nachweis von Gag-Protein in der Partikelpräparation ließ sich nur für die Konstrukte pMC53 Δ C594 – pMC60 Δ C297 führen (Abb. 17A, Spur 10 – 14.). Das Konstrukt ohne LI-Domäne pMC62 Δ C276 zeigte allerdings bei längerer Exposition der Immunblots schwache Banden von Gag- und Env-Protein im Überstand (Daten nicht gezeigt), für alle

weitergehenden Deletionskonstrukte ließ sich ein solcher Nachweis nicht erbringen (Abb. 17A, Spur 16 – 19). Für eine Freisetzung viraler Partikel waren folglich die As 1 – 297 des PFV Gag-Proteins ausreichend. Das Vorhandensein der LI-Domäne war dabei offensichtlich von entscheidender Bedeutung, da nach Deletion dieses Aminosäureabschnitts die Menge an freigesetzten Gag-Protein an die Nachweisgrenze sank (vgl. Abb. 17A, Spur 14 und 15). Wie die Analyse der Mutante pMC 61 Δ C276 aber zeigte, war ohne die LI-Domänen eine zumindest schwache Freisetzung viraler Proteine möglich. Eine potentielle Interaktionsdomäne mit dem Hüllprotein wäre folglich in den ersten 276 Aminosäuren des PFV Gag-Proteins zu vermuten.

Auffällig war die große Menge an Env-Protein, die im Fall der partikelfreisetzenden Mutanten aus dem Überstand isoliert werden konnte (Abb. 17C & D). Mit zunehmender Verkürzung des Gag-Proteins schien dabei der Gehalt an Env in der Partikelpräparation anzusteigen. Eine exakte Quantifizierung wurde nicht unternommen, doch der Vergleich mit dem Wildtypus zeigte, dass im Fall der Mutante pMC50 Δ C310 etwa die zwei- bis dreifache Menge an Hüllprotein freigesetzt wurde (Spur 13, Abb. 17C-D). Nur die Mutante mit der kleinsten Deletion (pMC53 Δ C594, Spur 10, Abb. 17C-D) zeigte eine dem Wildtypus vergleichbare Env-Freisetzung.

Einen Einbau von Pol in die freigesetzten Partikel ließ sich nur für die Mutanten pMC53 Δ C594 mit deletierter GRIII-Box und pMC52 Δ C544 mit einer Deletion von GRII- und GRIII-Box beobachten (Abb. 17B, Spur 10 & 11). Nach Deletion der nukleinsäurebindenden GRI-Box in dem Konstrukt pMC51 Δ C482 war keine der beiden prozessierten Formen von Pol in der Partikelpräparation nachzuweisen (Abb. 17B, Spur 12).

Mit der Verkürzung des Gag-Proteins vom C-Terminus her hätte die Freisetzung von Gag auch unabhängig von der Koexpression des Glykoproteins erfolgen können. Ein solcher Befund würde gegen die Hypothese sprechen, dass in den ersten 276 As die Interaktionsdomäne mit dem Env-Protein lokalisiert ist. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden 293T-Zellen mit den deletierten Gag-Konstrukten ohne Zugabe eines Env-Expressionsvektors transfiziert. Nach 48 h wurde der Überstand geerntet und die viralen Partikel präpariert. Der Immunoblot zeigte die zelluläre Expression aller Gag-Deletionskonstrukte, im Überstand war allerdings virales Protein nur für die Positivkontrolle nachweisbar (Abb. 18A, Spur 2). Alle Deletionskonstrukte benötigten folglich für eine Freisetzung viraler Proteine weiterhin die Anwesenheit des Glykoproteins Env. Dies war ein weiteres Indiz für das Vorhandensein einer potentielle Env-Interaktionsdomäne innerhalb der N-terminalen 276 As des PFV Gag-Proteins.

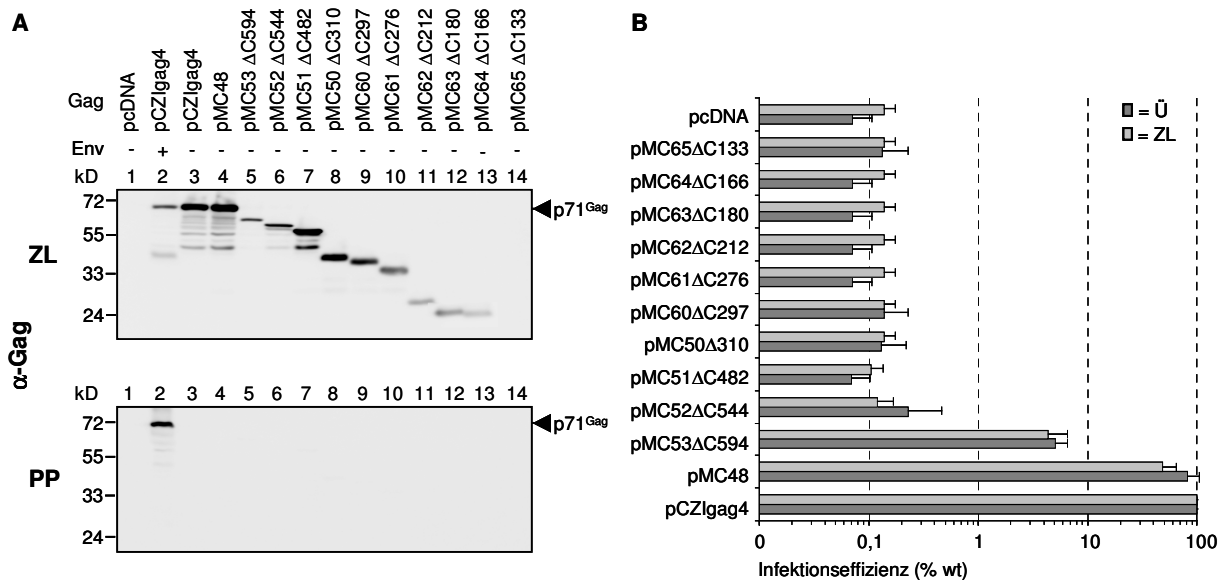


Abb. 18: Analyse der Env-unabhängigen Partikelfreisetzung und der Transduktionseffizienz der C-terminalen Deletionskonstrukte.

(A) Immunoblot von Zelllysaten und aufkonzentrierten Viruspartikeln. 293T-Zellen wurden mit den C-terminalen Deletionskonstrukten (Spur 5 – 14) transfiziert. Als Kontrollen diente ein mit pcDNA3.1+Zeo transfizierter Ansatz (Spur 1) und ein Ansatz transfiziert mit pCZlgag4 und pczHFV Env EM02 (Spur 2). Als AK wurden der Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Gag SGG 1 eingesetzt. ZL: Zelllysate; PP: Partikelpräparation. (B) Transduktionseffizienz der C-terminalen Deletionskonstrukte, wildtypischem Gag als Positivkontrolle sowie einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo) als Negativkontrolle. Nach Transfektion von 293T-Zellen im 4-Plasmid-System (Kotransfektion von pCZlpol1, pczHFVenvEM02 und pMD9) wurden 48 h n. T. die Überstände bzw. intrazelluläre Virusaufschlüsse auf HT1080-Zellen titriert. Der relative infektiöse Titer wurde im FACS mittels Quantifizierung der Expressionsrate des *egfp*-Markergens bestimmt (vgl. Kapitel 2.5.4.). Das Experiment wurde 3x wiederholt, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Ü: Überstand; ZL: intrazellulärer Virusaufschluss.

Weiterhin wurde die Transduktionseffizienzen der Deletionskonstrukte mit der des wildtypischen Gag verglichen. Dazu wurden 293T-Zellen mit den Gag-Expressionskonstrukten im 4-Plasmid-System transfiziert, Überstände und intrazelluläre Virusaufschlüsse auf HT1080-Zellen übertragen und die Transduktionsraten im FACS gemessen (vgl. Kapitel 2.5.4.). Die Transduktionseffizienz des Konstruktes pMC48 war im Vergleich zum Wildtypus um etwa 20% reduziert (Abb. 18B). Von den Deletionskonstrukten besaß nur noch pMC53 Δ C594 mit deletierter GRIII-Box die Fähigkeit, Zielzellen nachweisbar zu transduzieren. Allerdings betrug die Transduktionseffizienz nur noch etwa 5% des Wildtypwertes. Durch Deletion von GRIII- und GRII-Box (pMC52 Δ C544) sank die Transduktionseffizienz an die Nachweisgrenze. Für alle Konstrukte mit größeren Deletionen war eine Transduktion der HT1080-Zellen nicht mehr nachweisbar.

3.2.2. Herstellung und Untersuchung N-terminaler Gag-Deletionsmutanten

Die Analyse der C-terminalen Deletionskonstrukte hatte gezeigt, dass bereits die As 1 - 297 des PFV Gag-Proteins ausreichend waren, um im Zusammenspiel mit dem viralen Glykoprotein eine effektive Freisetzung von Viruspartikeln zu ermöglichen. Für eine detailliertere Eingrenzung der für die Partikelfreisetzung notwendigen Proteinabschnitte in diesem Bereich wurden nun eine Reihe kleinerer Deletionen im N-Terminus gesetzt und charakterisiert.

Als Ausgangskonstrukt wurde erneut das PFV Gag Expressionsplasmid pCZlgag4 gewählt. Um eine Veränderung im Expressionsmuster der Deletionsmutanten auszuschließen, sollte der unmittelbare N-Terminus des Gag-Proteins erhalten bleiben. Es wurden zwei Sets von Deletionsmutanten konstruiert, bei denen die ersten 6 bzw. 16 Aminosäuren erhalten blieben und sich variierende Deletionen von 63 - 193 As anschlossen (Abb. 19).

Mittels PCR wurde ein 0,16 kB großes Fragment mit dem Primerpaar #909/#918 amplifiziert, das am 5'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle 5' des Gag-Startkodons beinhalten und 6 As nach dem Transkriptionsstart von Gag eine über den Antisenseprimer eingeführte *Nhe*I-Schnittstelle enthielt. Parallel dazu wurden mittels PCR weitere Fragmente variabler Länge mit den Primerpaaren #910/#916 (pMC1 Δ 7-78), #911/#916 (pMC11 Δ 7-92), #912/#916 (pMC3 Δ 7-125), #914/#916 (pMC4 Δ 7-179) und #971/#916 (pMC12 Δ 7-199) hergestellt. Jedes dieser Amplifikate enthielt am 5'-Ende eine über den Senseprimer eingeführte *Nhe*I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle 3' des Gag-Terminationskodons. Die Fragmente wurden mit den erwähnten Restriktionsenzymen verdaut und jedes *Nhe*I/*Xho*I-Fragment mit dem 0,16 kB großen *Bam*HI/*Nhe*I-Fragment in einer 3-Fragment-Ligation in den mit *Bam*HI/*Xho*I geöffneten Vektor pCZlgag4 ligiert. Es entstanden die Deletionsmutanten pMC1 Δ 7-78, pMC11 Δ 7-92, pMC3 Δ 7-125, pMC4 Δ 7-179 und pMC12 Δ 7-199 (Abb. 19). Durch Austausch des 0,16 kB *Bam*HI/*Nhe*I-Fragments gegen ein ebenfalls *Bam*HI/*Nhe*I verdautes, mit dem Primerpaar #909/#910 amplifiziertes 0,19 kB großes Fragment, wurden die Deletionskonstrukte pMC6 Δ 16-78, pMC13 Δ 16-92, pMC8 Δ 16-125, pMC9 Δ 16-179 und pMC14 Δ 16-199 hergestellt (Abb. 19). Auf diesem Wege entstanden zwei Sets von jeweils 5 Deletionsmutanten, bei denen nach den ersten 6 bzw. 16 Aminosäuren die folgenden 63 – 193 Aminosäuren des gag-ORFs entfernt worden waren. Die korrekte Sequenz der Konstrukte wurde durch analytischen Verdau mit Restriktionsenzymen und kompletter Sequenzierung des Gag-Leserahmens überprüft.

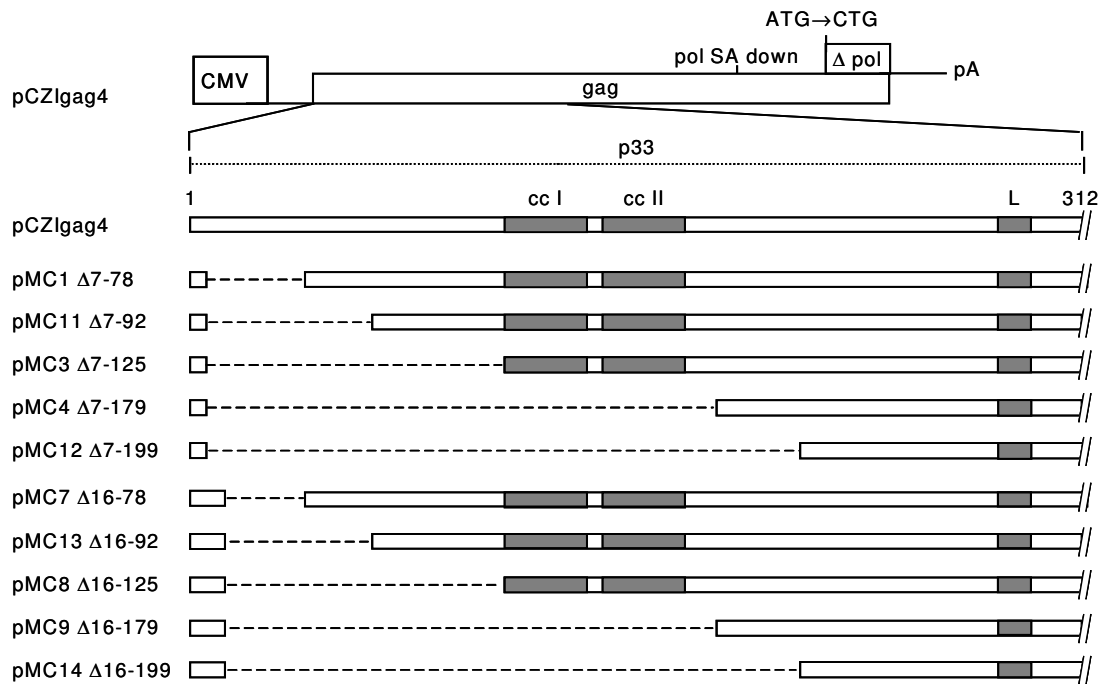


Abb. 19: Schematische Darstellung der N-terminalen PFV Gag Deletionskonstrukte im Expressionsvektor pCZlgag4.

Dargestellt ist ein Ausschnitt des *gag*-ORF, der dem hypothetischen p33-Spaltprodukt entspricht. Funktionelle Bereiche des Gag-Proteins sind grau hervorgehoben.

ATG→CTG: mutiertes Startkodon des *pol*-ORF; cc I und cc II: anhand von Sequenzanalysen ermittelte „coiled-coil“-Motive (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Petit et al. 2003); CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; GRI, GRII, GRIII: Glyzin-Arginin-reiche Sequenzabschnitte (Schliephake und Rethwilm 1994); L: Late-Domäne (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005); pol SA down: TTAG→CTCG mutierter Spleißakzeptor von *pol*; Δpol: Deletion des *pol*-ORF 3' des *gag*-ORF; polyA: PoyA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons.

Zunächst wurden die Deletionsmutanten auf zelluläre Expression und Freisetzung partikulären viralen Materials überprüft. Der Nachweis wurde über die Herstellung von Zelllysaten (vgl. Kapitel 2.4.3) und die Aufreinigung viraler Partikel (vgl. Kapitel 2.5.5) nach Transfektion von 293T-Zellen mit den mutierten Gag-Expressionskonstrukten zusammen mit einem PFV Env-Expressionskonstrukt geführt. Bei Verwendung eines gegen den C-terminalen Teil von PFV Gag gerichteten Antikörpers (Kaninchen- α -PFV Gag 127) war die Expression der verkürzten Gag-Proteine in vergleichbarer Stärke wie das wildtypische Gag-Protein in den transfizierten Zellkulturen nachweisbar (Abb. 20A). Eine Prozessierung der Gag-Proteine unterblieb in diesem Fall, da kein Expressionskonstrukt für PFV Pol dem Transfektionsansatz beigefügt worden war.

Wie der Immunoblot der Partikelpräparation zeigte (Abb. 20A), erfolgte im Gegensatz zum Kontrollansatz mit wildtypischen Gag (Abb. 20A, Spur 2) bei keiner der Deletionsmutanten eine Freisetzung viraler Partikel trotz der Kotransfektion eines Expressionskonstruktes für das wildtypische PFV Glykoprotein (Abb. 20A, Spur 3 - 12) .

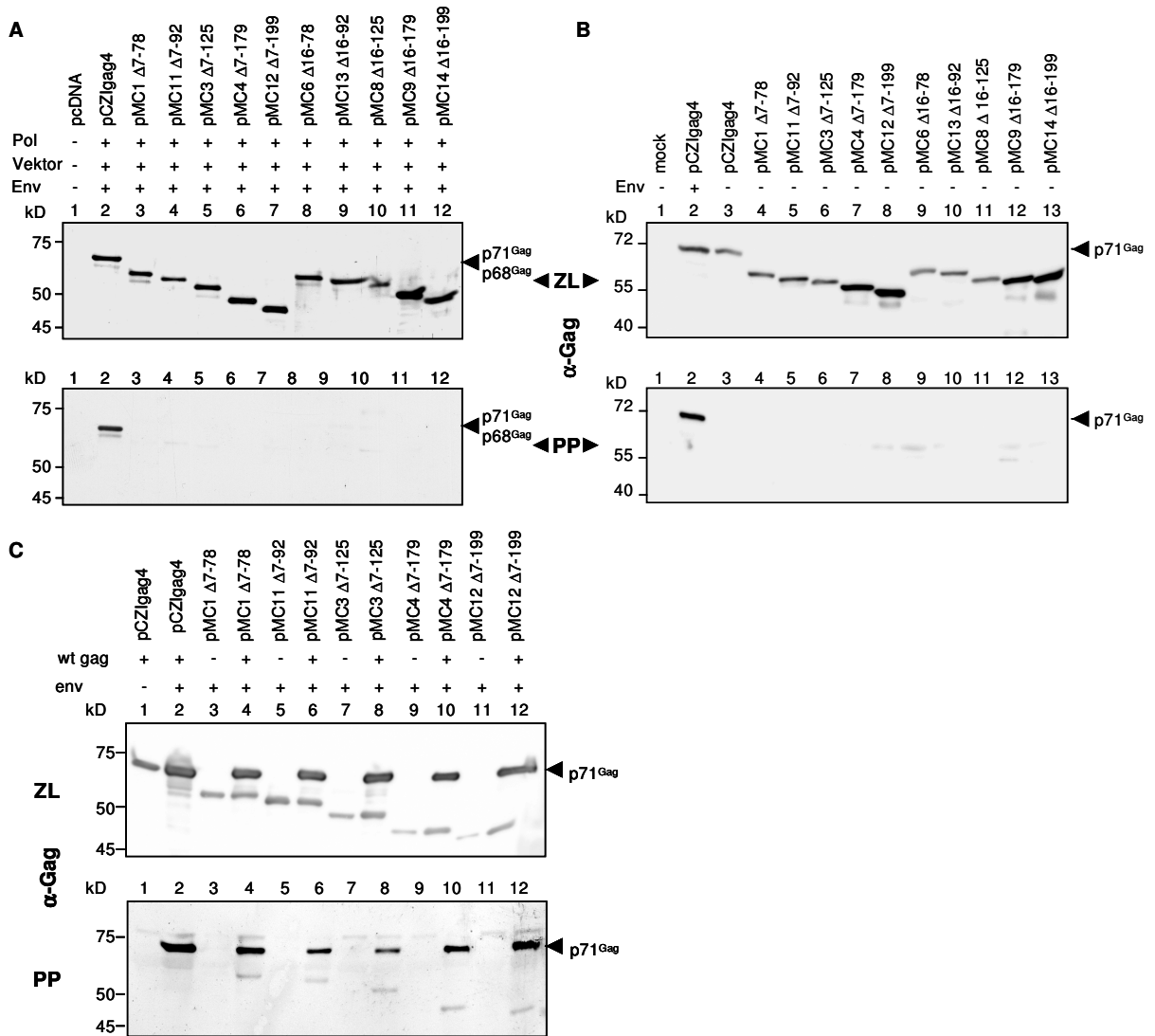


Abb. 20: Analyse der N-terminalen Gag-Deletionsmutanten im Expressionsvektor pCZlgag4.

(A) Partikelfreisetzung der N-terminalen Gag-Deletionsmutanten. 293T-Zellen wurden mit pCZlgag4 (Spur 2) oder den N-terminalen Deletionsmutanten (Spur 3 – 12) und einem PFV Env-Expressionsplasmid (pCenv-1) transfiziert. Zelllysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll geerntet. Der Nachweis von PFV Gag erfolgte mit einem gegen den C-Terminus des Proteins gerichteten polyklonalen Antikörper (Kaninchen- α -PFV Gag 127). (B) Analyse der Env-unabhängigen Partikelfreisetzung der N-terminalen Gag-Deletionsmutanten. 293T-Zellen wurden ausschließlich mit pCZlgag4 (Spur 3) oder den N-terminalen Deletionsmutanten (Spur 4 – 13) transfiziert. Zelllysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll geerntet. Als Positivkontrolle diente ein Transfektionsansatz mit pCZlgag4 und pCenv-1 (Spur 2). Der Nachweis von PFV Gag erfolgte mit dem Kaninchen- α -PFV Gag 127 Serum. (C) Koexpression der N-terminalen Gag-Deletionsmutanten und wildtypischem Gag. 293T-Zellen wurden entweder nur mit den N-terminalen Deletionskonstrukte und einem PFV Env-Expressionsplasmid (pCenv-1) transfiziert (Spur 3, 5, 7, 9 und 11) oder mit den N-terminalen Deletionskonstrukte zusammen einem PFV Env-Expressionsplasmid (pCenv-1) und einem Expressionsplasmid für wildtypisches PFV Gag (pCZlgag4, Spur 4, 6, 8, 10 und 12). Zelllysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll geerntet. Ein Transfektionsansatz nur mit pCZlgag4 diente als Negativkontrolle (Spur 1), ein weiterer Transfektionsansatz mit pCZlgag4 und pCenv-1 als Positivkontrolle (Spur 2). Der Nachweis von PFV Gag erfolgte mit dem Kaninchen- α -PFV Gag 127 Serum. ZL: Zelllysate; PP: Partikelpräparation.

Da das virale Glykoprotein eventuell auch einen hemmenden Einfluss auf die Freisetzung der verkürzten Gag-Proteine haben konnte, wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen 293T-Zellen nur mit den Gag-Expressionskonstrukten transfiziert wurden. Obwohl eine deutliche zelluläre Expression der verkürzten Gag-Proteine nachweisbar war (Abb. 20B), war auch bei diesen Versuchen keine partikuläre Freisetzung der mutierten Gag-Proteine in den Überstand der Zellkulturen zu beobachten (Abb. 20B).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob durch Koexpression des wildtypischen Gag die deletierten Gag-Proteine in Viruspartikel eingebaut werden können. Dazu wurden 293T-Zellen mit den Gag-Mutanten alleine oder zusammen mit dem wildtypischen Gag-Expressionsvektor pCZlgag4 sowie einem PFV Env-Expressionskonstrukt (pCenv-1) transfiziert. Nach 48 h wurden Zellysate hergestellt und die viralen Partikel aus den Überständen präpariert. Der Immunoblot der Zellysate belegte, dass wildtypische und verkürzte Gag-Proteine in gleichen Mengen gebildet wurden (Abb. 20C). Die Analyse der Partikelpräparationen zeigte, dass alle deletierten Gag-Proteine durch Koexpression des wildtypischen Gag wieder in Viruspartikel eingebaut wurden und sich im Überstand nachweisen ließen (Spur 4, 6, 8, 10 und 12, Abb. 20C). In den Partikelpräparationen der Kontrollansätze, in denen die Mutanten ohne wildtypisches Gag exprimiert wurden, ließen sich dagegen kein Gag-Protein nachweisen (Spur 3, 5, 7, 9 und 11, Abb. 20C). Dies belegte erneut, dass durch die deletierten Gag-Konstrukte alleine auch bei Koexpression des viralen Glykoproteins kein partikuläres Gag-Material freigesetzt wurde. Andererseits konnten sie aber bei Koexpression des wildtypischen Gag-Proteins in virale Partikel eingebaut werden.

3.2.3. N-terminale Gag-Deletionen im Provirus

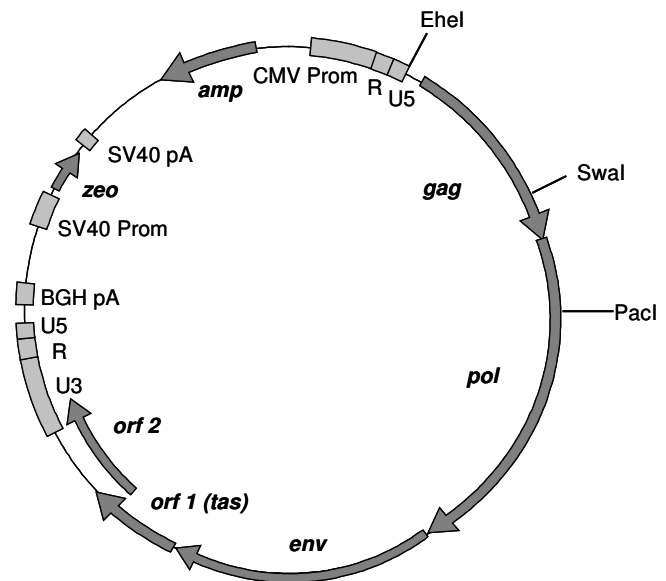
Bei dem in den vorangegangenen Experimenten verwendeten 4-Plasmid-System werden die für Partikelfreisetzung und Transduktion von Zielzellen obligaten Viruskomponenten von separaten Expressionsvektoren gebildet. Es bietet den Vorteil, gezielt die einzelnen Proteine in Art und Menge manipulieren zu können, hat aber auch den Nachteil, dass keine Regulation der Expression der einzelnen Viruskomponenten besteht und die Mengen an zellulär gebildeten Virusproteinen sehr hoch sind. Zur Absicherung der im vorangegangenen Abschnitt dargelegten Ergebnisse wurde ein Teil der konstruierten N-terminalen Gag-Deletionen auch in ein infektiöses PFV-Provirus umgesetzt.

Das Konstrukt pCHSRV2 enthält das PFV Genom unter Kontrolle eines CMV-Promotors, der anstelle der U3-Region am 5'-Ende des Genoms eingesetzt wurde (Abb. 21, Moebes et al. 1997). Der Transkriptionsstart wurde durch diesen Promotoraustausch nicht verändert. Der infektiöse Provirusklon pCHSRV2, der als Ausgangskonstrukt für die Klonierung von pCHSRV2

Abb. 21: Schematische Darstellung des PFV Provirus pCHSRV2.

Das Plasmid basiert auf dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+Zeo (Invitrogen). Dargestellt sind die wichtigsten Komponente des Vektors sowie die für die weitergehenden Klonierungsschritte verwendeten Schnittstellen.

amp: Ampicillinresistenzgen; BGH polyA: PoyA-Sequenz des bovinen Wachstumshormons; CMV Prom: Promotor/Enhancer des CM-Virus; LTR: „Long terminal Repeat“-Region; R: „repeat“-Region; SA: Spleißakzeptor; SD: Spleißdonor; SV40 pA: PolyA-Sequenz des SV40 Virus; SV40 Prom: Promotor des SV-40 Virus; U5: „Unique 5“-Region; zeo: Zeocinresistenzgen.



diente, besitzt eine verkürzte U3-Region gegenüber dem ursprünglichen PFV-Isolat, zeigt aber ein identisches Replikationsverhalten in humanen Fibroblastenzellen (Schmidt et al. 1997).

Zur Kontrolle der in die Gag-Expressionskonstrukte eingeführten *NheI*-Schnittstellen wurden neben den Deletionsmutanten auch drei Konstrukte hergestellt, die außer der eingeführten *NheI*-Schnittstelle keine weiteren Veränderungen gegenüber der wildtypischen Sequenz enthielten (Abb. 22). Die Aminosäureabfolge veränderte sich durch den Einbau der Schnittstelle in folgender Weise:

- pcHRSRV2-M84 (*NheI* 7/8): As VE7/8AS,
- pcHRSRV2-M85 (*NheI* 16/17): As L17S,
- pcHRSRV2-M86 (*NheI* 123/124): As S123A.

Die *NheI*-Schnittstelle an Aminosäureposition 123/124 in pcHRSRV2-M86 entspricht somit der *NheI*-Schnittstelle im *gag*-ORF des Expressionskonstruktes pMC48 (vgl. Abb. 22 mit Abb. 15).

Die Deletionen aus den Gag-Expressionsvektoren pMC1 Δ 7-78, pMC12 Δ 7-199, pMC6 Δ 16-78 und pMC14 Δ 16-199 wurden ebenfalls im *gag*-ORF des Provirus pCHSRV2 realisiert und die Konstrukte pcHRSRV2-M88 Δ 7-78, pcHRSRV2-M89 Δ 7-199, pcHRSRV2-M91 Δ 16-78 und pcHRSRV2-M92 Δ 16-199 hergestellt (vgl. Abb. 22 mit Abb. 19). Zusätzlich wurde eine kürzere Deletion bis zur Aminosäure 47 für die beiden Varianten mit 6 bzw. 15 Aminosäuren am N-Terminus konstruiert (Abb. 22: pcHRSRV2-M87 Δ 6-47 und pcHRSRV2-M90 Δ 16-47). Diese beiden Konstrukte enthielten in ihrem deletierten Gag-Protein jeweils noch ein Arginin an Position 50 (R50), das als essentiell für die Freisetzung viraler Partikel beschrieben worden war (Eastman und Linial 2001). Mit dem Konstrukt pcHRSRV2-M93 Δ 123-199 wurde noch der

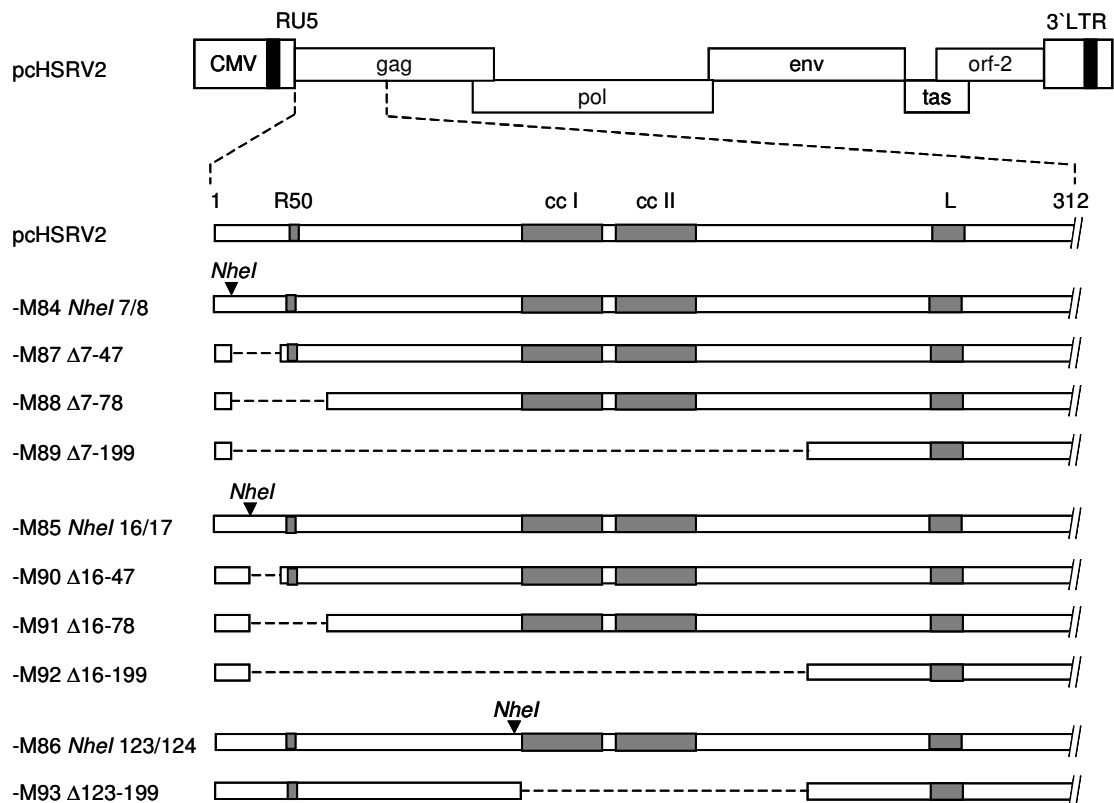


Abb. 22: Schematische Darstellung der PFV Gag Deletionsmutanten, die im Proviruskonstrukt pCHSRV2 hergestellt wurden.

Dargestellt ist ein Ausschnitt des *gag*-ORF, der dem hypothetischen p33-Spaltprodukt entspricht. Funktionelle Bereiche des Gag-Proteins sind grau hervorgehoben.

cc I und cc II: anhand von Sequenzanalysen ermittelte „coiled-coil“-Motive (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Petit et al. 2003); CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; L: Late-Domäne (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005); LTR: „Long terminal Repeat“-Region; R: „repeat“-Region; R50: konserviertes Arginin an As-Position 50; U5: „Unique 5“-Region.

Effekt einer Deletion in der Mitte des p33-Anteils von PFV Gag analysiert, die beide potentiellen coil-coiled-Motive umfasste (Abb. 22, Tobaly-Tapiero et al. 2001, Petit et al. 2003).

Der Einbau der *NheI*-Schnittstellen zur Herstellung der Konstrukte pCHSRV2-M84, -M85 und -M86 erfolgte mittels rekombinanter PCR mit dem äußerem Primerpaar #1121/#1126 und den inneren mutagenen Primerpaaren #1122/#918 (für -M84), #1123/#919 (für -M85) und #912/#1125 (für -M86). Die entstehenden 1,8 kB PCR-Fragmente wurden jeweils in einen Topo-Vektor (*Invitrogen*) subkloniert, anschließend über *EheI/SwaI*-Verdau ausgeschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffneten Vektor pCHSRV2 eingesetzt.

Die Konstruktion der Deletionsmutanten erfolgte in den neuen Proviruskonstrukten mit einer *NheI*-Schnittstelle im *gag*-ORF. Es wurden PCR-Fragmente mit den Senseprimern #1124 (-M87/-M90), #910 (-M88/-M91) und #971 (-M89/-M92) und dem Antisenseprimer #1126 hergestellt. Anschließend wurden diese PCR-Fragmente *NheI/SwaI* verdaut und in die

ebenfalls durch einen *NheI/SwaI*-Verdau geöffneten Konstrukte pcHSRV2-M84 bzw. pcHSRV2-M85 eingesetzt. Abgeleitet von pcHSRV2-M84 entstanden auf diese Weise die Konstrukte pcHSRV2-M87 Δ 7-47, pcHSRV2-M88 Δ 7-78 und pcHSRV2-M89 Δ 7-199 sowie, abgeleitet von pcHSRV2-M85, die Deletionsmutanten pcHSRV2-M90 Δ 16-47, pcHSRV2-M91 Δ 16-78 und pcHSRV2-M92 Δ 16-199 (Abb. 22).

Für die Herstellung der Deletionsmutante pcHSRV2-M93 Δ 123-199 wurde der *gag*-ORF zwischen den Primern #971 und #1126 amplifiziert, das entstandene Fragment *NheI/SwaI* verdaut und in den mit *NheI/SwaI* geöffneten Vektor pcHSRV2-M86 eingesetzt (Abb. 22).

Die korrekte Sequenz aller Konstrukte wurde durch analytischen Verdau mit Restriktionsenzymen und kompletter Sequenzierung des Abschnittes zwischen den beiden verwendeten Restriktionsschnittstellen überprüft.

Zunächst wurde untersucht, ob die Deletionen im *gag*-ORF die zelluläre Expression der übrigen viralen Proteine beeinflussen würde. Dazu wurden 293T-Zellen mit den Gag-Mutanten transfiziert, Zelllysate hergestellt (Kapitel 2.4.3.) und im Immunoblot auf die Anwesenheit der verschiedenen viralen Proteine analysiert.

Aus Abb. 23A und B geht hervor, dass die für die Partikelfreisetzung und Infektiosität essentiellen viralen Proteine Pol und Env von den Mutanten gebildet wurden und keine Unterschiede in der Stärke der Expression im Vergleich zum Wildtypus erkennbar waren.

Im Immunoblot mit dem monoklonalen Gag-Antikörper Maus- α -PFV Gag SGG 1 waren die Gag-Proteine mit Deletionen am unmittelbaren N-Terminus (pcHSRV2-M87 Δ 7-47, -M88 Δ 7-78, -M89 Δ 7-199, -M90 Δ 16-47, -M91 Δ 16-78 und -M92 Δ 16-199) allerdings nicht zu detektieren (Abb. 23A, Spur 4-6 und 10-12). Dies gilt auch für die Mutante pcHSRV2-M85, die außer der eingeführten *NheI*-Schnittstelle unverändert gegenüber dem Wildtypus war (Abb. 23A, Spur 9). Die Mutante mit der Deletion zwischen As 123 – 199 (pcHSRV2-M93) zeigte dagegen nach Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper eine deutliche Gag-Bande (Abb. 23A, Spur 8). Alle mutierten Gag-Proteine ließen sich dagegen im gleichen Immunoblot nach Reaktion mit dem polyklonalen, gegen den C-Terminus von Gag gerichteten Antikörper Kaninchen- α -PFV Gag 127 deutlich nachweisen (Abb. 23B). Vermutlich ist der monoklonale Antikörper Maus- α -PFV Gag SGG 1 gegen eine N-terminales Epitop zwischen As 17 - 47 gerichtet, so dass die Deletionsmutanten nicht von diesem AK erkannt werden konnten.

Nach Transfektion der Konstrukte auf 293T-Zellen wurde eine Präparation der viralen Partikel aus dem Überstand der Zellkultur vorgenommen und ein biochemischer Nachweis mittels Immunoblot durchgeführt (vgl. Kapitel 2.5.5.). Eine Freisetzung von partikulärem

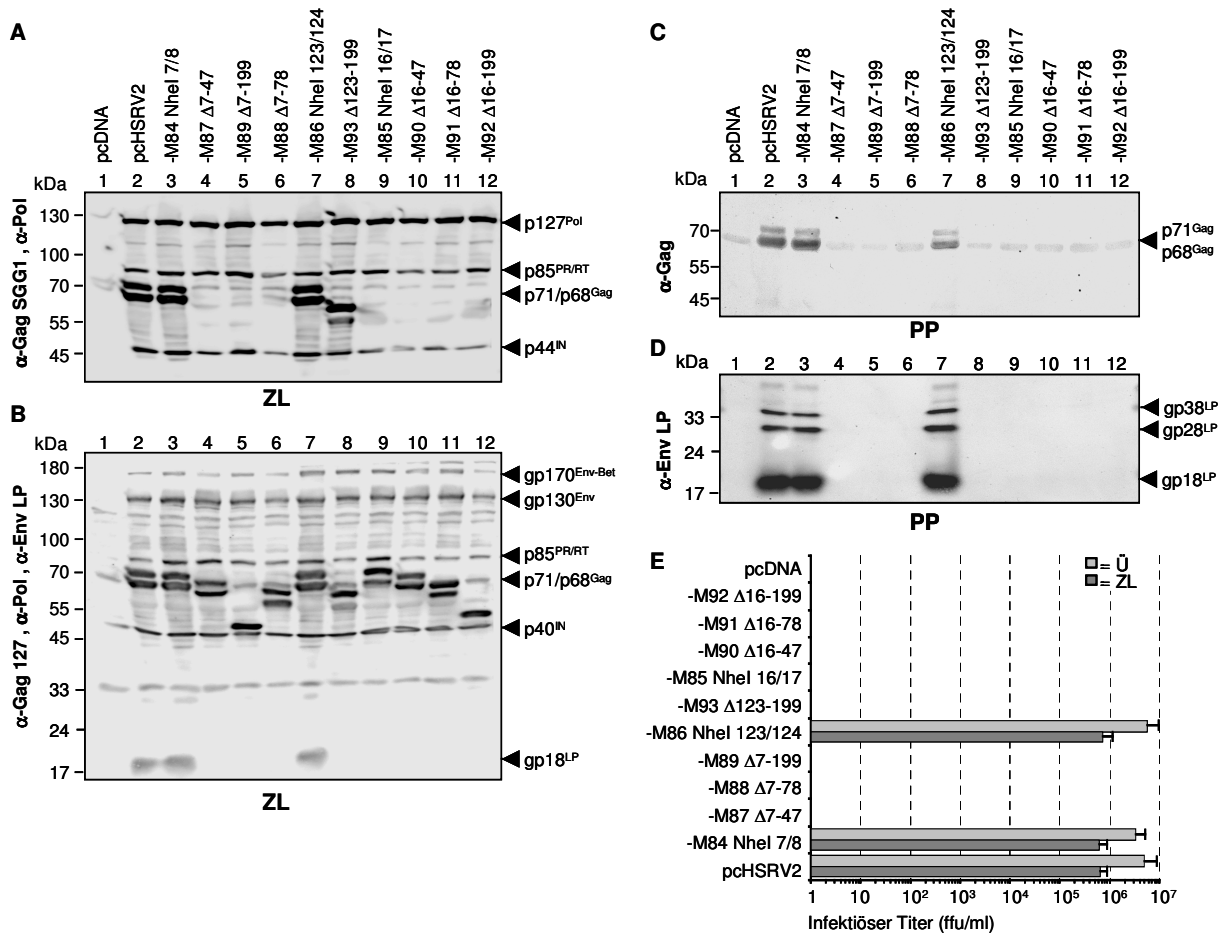


Abb. 23: Analyse der proviralen Gag-Deletionsmutanten.

(A) und (B) 293T-Zellen wurden mit den proviralen Deletionskonstrukten (Spur 3 – 12), dem wildtypischem Provirus (Spur 2) oder mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo, Spur 1) transfiziert. Zelllysate wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll geerntet. (A) Immunoblot mit den Hybridomaüberständen Maus- α -PFV Gag SGG1, Maus- α -PFV Pol 3E11 und Maus- α -PFV Pol 15E10. (B) Immunoblot mit den polyklonalen Antikörper Kaninchen- α -PFV Gag 127 und Kaninchen- α -PFV Env LP 1-86. ZL: Zelllysate. (C) und (D) Partikelpräparation des Experimentes aus A und B. (C) Immunoblot mit dem polyklonalen Antikörper Kaninchen- α -PFV Gag 127. (D) Immunoblot mit dem polyklonalen Antikörper Kaninchen- α -PFV Env LP 1-86. PP: Partikelpräparation. (E): Infektionsanalyse der proviralen Deletionskonstrukte. Nach Transfektion von 293T-Zellen mit den proviralen Deletionskonstrukten, wildtypischem Provirus oder einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo) wurden 48 h n. T. die Überstände bzw. intrazelluläre Virusaufschlüsse auf Indikatorzellen titriert. Der infektiöse Titer wurde durch einen „Blue cell assay“ ermittelt. Das Experiment wurde 3x wiederholt, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Ü: Überstand; ZL: intrazellulärer Virusaufschluss.

viralem Proteinmaterial konnte nur für die beiden Mutanten pCHSRV2-M84 und -M86 mit eingeführten *NheI*-Schnittstellen festgestellt werden (Abb. 23C und D, Spur 3 und 7).

Die Mutanten wurden ebenfalls auf die Bildung infektiöser Partikel hin untersucht. Dazu wurden BHK/LTR(PFV)/*lacZ*-Indikatorzellen mit den Überständen bzw. intrazellulären Virusaufschlüssen transfizierter 293T-Zellkulturen infiziert. Einzelheiten der experimentellen Vorgehensweise sind in Kapitel 2.5.4. beschrieben. Von den Gag-Mutanten konnten nur

noch pcHSRV2-M84 und -M85, zwei Konstrukte mit eingeführter *NheI*-Schnittstelle im *gag*-ORF, die Indikatorzelllinie infizieren (Abb. 23E). Die extra- und intrazellulären Infektionstiter dieser beiden Gag-Mutanten waren in etwa mit denen des Wildtypus vergleichbar. Für alle weiteren analysierten Gag-Mutanten konnten keine Infektionsereignisse nachgewiesen werden.

Mit diesen Versuchen wurden zum einen die Ergebnisse der Untersuchung mit den Deletionsmutanten im Gag-Expressionsvektor bestätigt. Auch die beiden bislang kleinsten Deletionskonstrukte pcHSRV2-M87 Δ 7-47 und -M90 Δ 16-47 zeigten in den Versuchen keine Freisetzung viraler Proteine aus den transfizierten Zellkulturen. Folglich mussten zwischen Aminosäure 6 und 47 des Gag-Proteins strukturelle Elemente liegen, die eine essentielle Rolle bei der Freisetzung von PFV Partikel spielten. Darüber hinaus wurden auch von dem Deletionskonstrukt pcHSRV2-M93 Δ 123-199 keine viralen Proteine in den Überstand entlassen. Neben dem Bereich am unmittelbaren N-Terminus schien es daher einen weiteren, für die Partikelmorphogenese essentiellen Proteinabschnitt im zentralen Teil von p33^{Gag} zu geben. Überraschend war der Befund, dass die Mutante pcHSRV2-M85 keine viralen Partikel mehr freisetzte. In diesem Konstrukt war nur die Aminosäure 17 von Leucin in Serin mutiert worden. Offensichtlich spielte diese Aminosäure eine essentielle Rolle für die Struktur des N-Terminus von PFV Gag bei der Morphogenese der Virionen. Die beiden weiteren Mutanten mit neu eingeführten *NheI*-Schnittstellen in den *gag*-ORF, pcHSRV2-M84 und pcHSRV2-M86, zeigten dagegen den gleichen Phänotyp wie das wildtypische Virus mit einem ähnlich infektiösen Titer. Für weitere Klonierungsarbeiten konnten folglich diese beiden Konstrukte anstelle des ursprünglichen Proviruskonstruktes pcHSRV2 verwendet werden.

3.2.4. Alanin-Substitution konservierter Aminosäuren im N-Terminus von PFV Gag

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass bereits die Substitution einer einzelnen Aminosäure in der Mutante pcHSRV2-M85, bei der ein Leucin an Position 17 in Serin umgewandelt worden war, die Partikelmorphogenese von PFV zum Erliegen brachte. Dies legte nahe, die Aminosäureabfolge am N-Terminus von PFV Gag genauer zu analysieren. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz von PFV Gag mit den Gag-Sequenzen anderer Foamyviren fiel auf, dass innerhalb der ersten N-terminalen 100 As mehrere konservierte Aminosäuren vorhanden sind (Abb. 24). Diese Aminosäuren wurden im folgenden einzeln durch Alanin substituiert (Abb. 25). Als Kontrolle diente die Mutante pcHSRV2-M97, bei der das konservierte Arginin an Position 50 ebenfalls gegen Alanin ausgetauscht wurde. Diese Mutation sollte den korrekten Zusammenbau und die Freisetzung

			10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																		
				*	*	*	*	**	*	**	*	*																		
PFV	1	MASGSNVEE	-YE	LDVEALVVI	LRDRN	I	PRNPLHGEVI	IGLRLTEG	WWGQI	ERFQMVR	ILQDD	-DNEPLQR	PRYE	-VIQRAVNPH	TMF	---	MISG	PLAELQLAFQ	DL	100										
SFV _{cpz}	1	MASGSNVEE	-YE	LDVEALVVI	LRDRN	I	GRNPLHGEI	IGLRLTEG	WWGQLER	FQMVR	ILQDE	-DNEPLQR	PRHE	-I	I	PRAVNPH	TMF	---	VLSG	PLAELQLAFQ	DL	100								
SFV _{mac}	1	MAA	---	I	EGD	LDVQALANL	FNDLGI	NRNPRHREVI	ALRMTGG	WWGPATRY	NLVSLLQDD	-QGQPLQ	QPRWR	-AEGRAANPA	VMF	---	TLEA	PWQDLRLAF	DN	I	97									
SFV _{agm}	1	MG	---	D	HN	LNVQELN	LNFQNLGI	PRQPNHREVI	IGLRMLGG	WWGPGTRY	I	LVSIFLQDD	-SGQPLQ	QPRWR	-PEGRPVNPL	VHN	---	TIEA	PWGELRQAF	ED	LD	95								
SFV _{ora}	1	MAA	---	QN	FE	LDVQELN	LNFQDNGVTR	NRPHLETI	GLRMLGG	WWGEQERY	QSARI	ILQDD	-DGEPLQ	VPRWE	-EVLRPVNPL	AHF	---	VISA	PWDQLRRAF	HD	LD	97								
BFV	1	MAL	---	ND	FDPI	ALQGYLP	-----	APRVLQHND	II	CRATSG	PWGI	GDRYNL	IRIHLQDP	-AGQPLP	I	PQWE	-PI	PNRTAN	-PRTQPY	PVVSAP	MATLEN	I	LNNFH	95						
EFV	1	MAQ	---	NETFDP	VALQGY	YP	-----	AGGI	LADND	II	NI	RFTSG	QWGI	GDRWLQVRL	RLVD	PNTGQPL	AQPE	YE	-DTGLPA	EN	RG	I	---	VVAV	SHNAARN	I	FNNVQ	93		
FFV	1	MA	---	RE	LNPL	LQLQ	---	QLY	NNGLQPN	PGHGDVI	AVRFTGG	PWGP	DRWTRVA	IRLQDN	-TGQPLQ	VPGY	GLEPG	I	INLR	-ED	I	---	L	IAG	PYNL	I	RTAFLDLE	94		
			110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210																	
								**	**	cc																				
PFV	101	LPEGPLRF	GPLANGHY	VQGD	PYSS	SYRPV	TMA	---	ETAQMTR	DELE	DLNTQSE	I	EQMINLLE	LYEVETRAL	RE	---	RQLA	---	E	RSS	TGQGG	I	SPGAPRSR	P	---	PVS	198			
SFV _{cpz}	101	LPEGPLRF	GPLANGNY	VEGD	PYSR	SYRPV	TMA	---	ETAQMTR	DELE	DLNTQSE	I	EQMINLLE	LYEVETRAL	RE	---	RQLA	---	E	RSS	TGQGG	I	SPGASHSR	P	---	PVS	198			
SFV _{mac}	98	VGEGTLRF	GPLANGNY	I	PGDEF	SLEFL	PPAMQ	---	EI	TQMQR	DELE	EELDVV	GQIT	MQMNDL	IGMQDAQ	IRGLE	---	GQLR	---	GLRGN	LPVAGT	PPPP	-PPSLDD	QPA	196					
SFV _{agm}	96	VAEGTLRF	GPLANGNW	I	PGDEYS	MEFQP	PLAQ	---	EI	AQMQR	DELE	EELDI	TGQ	I	CAQV	I	DLVDMQDAQ	IRGLE	---	RR	I	QDRLGL	RDNL	LPVAG	I	QAPP	-SSPIG	-QPI	196	
SFV _{ora}	98	VGNALRF	GPLANGNY	I	PEDPY	STSYR	PVNQ	---	BMAQMQR	DGLE	EELVQGE	I	ELQMI	DLI	EMQT	I	IRGLRQLV	NELQ	---	RERDS	GRGAS	I	PGAS	-SSP	---	PPQ	196			
BFV	96	I	PHGVS	RYG	PLEGGD	YQPG	EQSQG	FCPVTQA	---	EI	ANLMG	QHLEE	I	T	I	LR	I	THRLM	Q	-----	GV	---	R	-----	PPAV	PQGA	-PPP	---	PPA	171
EFV	94	PAGGPNRH	GPLHDGQ	FQVGD	DPSE	HFVP	I	EENLIP	QEI	VNLGA	AR	-RV	RLRE	MCVRL	LH	-----	VR	---	RQMM	---	GM	-	GMPGA	I	QPQP	-VGP	---	LPA	178	
FFV	95	PARGPERH	GPFGDGR	LQPGD	GLSE	GFPQT	DE	---	BM	-----	QAVGT	I	GAARNE	I	RL	-----	LR	---	EALQ	---	RL	---	Q	-----	VG	155				

Abb. 24: Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener FV Gag-Proteine.

Konservierte Aminosäuren, die zu Alanin substituiert wurden, sind mit einem (*) gekennzeichnet. cc: Bereich eines theoretisch vorhergesagten „coiled-coil“-Motives.

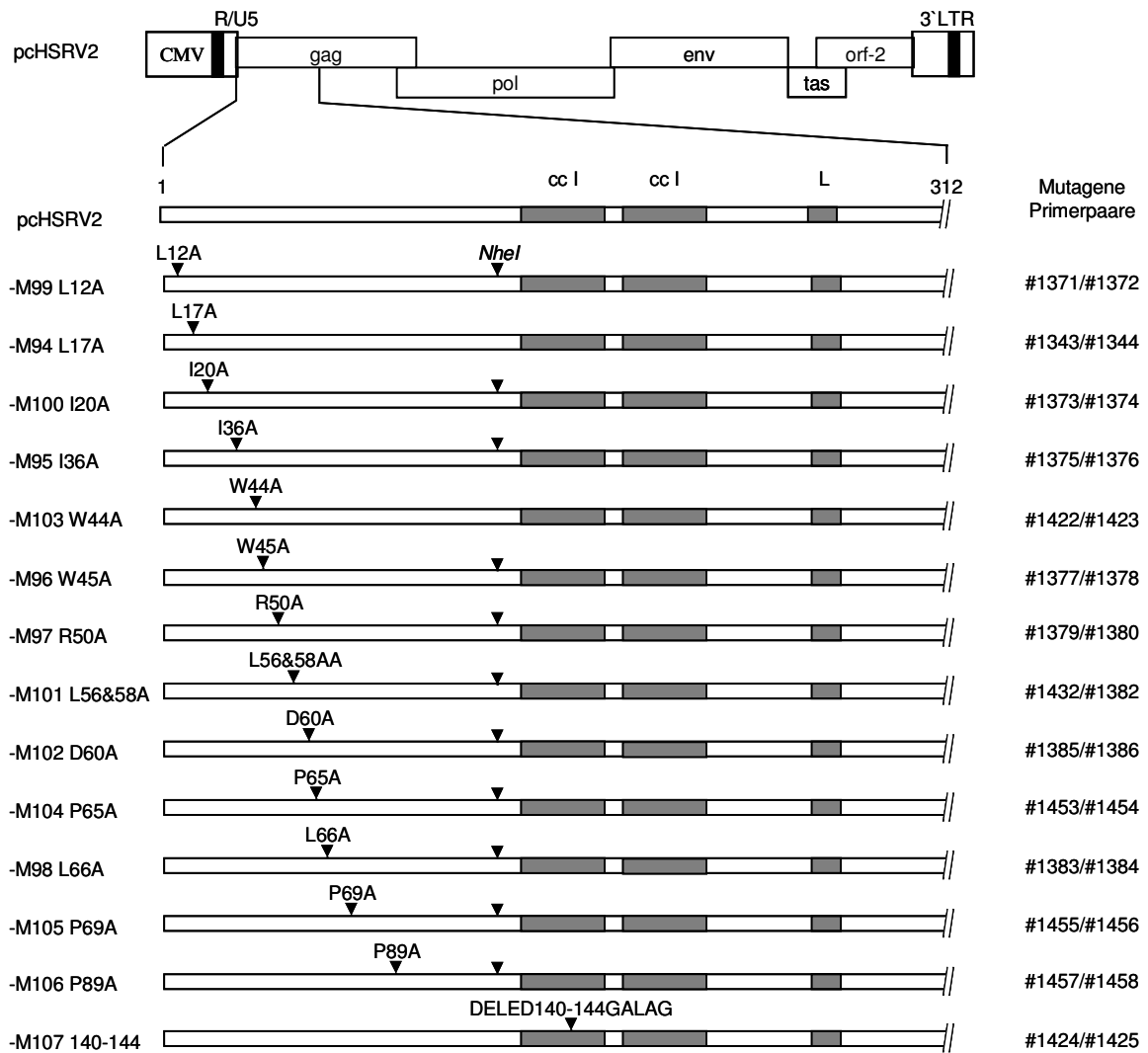


Abb. 25: Schematische Darstellung der PFV Gag Alanin-Substitutionsmutanten, die im infektiösen Proviruskonstrukt pcHSRV2 hergestellt wurden.

Dargestellt ist ein Ausschnitt des *gag*-ORF, der dem hypothetischen p33-Spaltprodukt entspricht. Das mutagene Primerpaar, das zur Herstellung der jeweiligen Alanin-Substitution verwendet wurde, ist hinter jedem Konstrukt aufgelistet. Funktionelle Bereiche des Gag-Proteins sind hervorgehoben.

cc I und cc II: anhand von Sequenzanalysen ermittelte „coiled-coil“-Motive (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Petit et al. 2003); CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; L: Late-Domäne (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005); LTR: „Long terminal Repeat“-Region; R: „repeat“-Region; U5: „Unique 5“-Region;

viraler Partikel verhindern (Eastman und Linial 2001). Die Substitutionsmutanten wurden anschließend einer detaillierten Analyse unterzogen, um auf diese Weise eindeutig die für Partikelmorphogenese und -freisetzung relevanten Sequenzabschnitte identifizieren zu können. Die Mutante mit einer Deletion zwischen As 123 - 199 (pcHSRV2-M93) war ebenfalls nicht in der Lage gewesen, virales Proteinmaterial freizusetzen (siehe vorangegangenes Kapitel). Auch dieser Proteinabschnitt wurde auf konservierte As untersucht. Auffällig war die zwischen den Gag-Proteine der in Primaten vorkommenden

Foamyviren konservierte Abfolge von vier sauren Aminosäuren, unterbrochen von einem Leucin an Position 140 – 144 relativ zur Aminosäuresequenz von PFV (As-Abfolge DELED, Abb. 24). Auch diese vier sauren Aminosäuren wurden zu Glyzin und Alanin substituiert, um ihren Einfluss auf die Bildung und Freisetzung von PFV Partikeln zu untersuchen.

Für jeden geplanten Aminosäureaustausch wurde ein überlappendes Primerpaar konstruiert, in welchem das kodierende Basentriplett zu GCT oder GCA verändert war. Diese beiden Basentriplets repräsentieren zwei der vier möglichen Alanin kodierenden Triplets und sind im PFV *gag*-ORF überwiegend in Gebrauch (prozentualer Anteil an den Alanin-Triplets im PFV *gag*-ORF: GCT = 58%, GCA = 25%).

Als Ausgangskonstrukt für die Herstellung eines Teils der Alanin-Substitutionen wurde der infektiöse Provirusklon pcHSRV2-M86 gewählt (vgl. Abb. 22, Konstrukt mit *NheI*-Schnittstelle im *gag*-ORF). Für die einzelnen Mutanten wurden mit Hilfe einer rekombinanten PCR ein 0,5 kB großes Fragment amplifiziert, dass anschließend in einen Topo-Vektor subkloniert wurde. Als Außenprimer dienten die Primer #1370, der an der *EheI*-Schnittstelle 5' des *gag*-ORF an die Zielsequenz hybridisierte, und #1125, der 3' der *NheI*-Schnittstelle im kodierenden Bereich des *gag*-ORF hybridisierte. Die jeweiligen mutagenen Innenprimer sind in Abb. 25 aufgelistet. Aus dem Topo-Vektor wurde anschließend über die beiden terminalen Schnittstellen *EheI* und *NheI* das jeweilige Fragment ausgeschnitten und in den ebenfalls mit diesen beiden Restriktionsenzymen geöffneten Vektor pcHSRV2-M86 eingesetzt.

Die Substitutionsmutanten pcHSRV2-M94 (L17A) und pcHSRV2-M103 (W44A) wurden analog der beschriebenen Vorgehensweise hergestellt. Allerdings wurden die Außenprimer #1121/#1126 verwendet und das resultierende Fragment über einen *EheI*/*SwaI*-Verdau in das mit den gleichen Restriktionsschnittstellen geöffnete Proviruskonstrukt pcHSRV2 eingesetzt (Abb. 25).

Die Mutationen in pcHSRV2-M107 (DELED140→144GALAG) wurden ebenfalls mittels rekombinanter PCR in den *gag*-ORF eingefügt. Als Außenprimer dienten das Primerpaar #1370/1461, die Mutationen wurden durch das Primerpaar #1424/#1425 kodiert. Das entstandene Fragment wurde über einen *XhoI*/*BstEII*-Verdau in einen Topo-Subklon eingeführt, der Teile der PFV 5'LTR und des *gag*-ORF enthielt. Anschließend wurde ein 1,7 kB großes Teilfragment mit *EheI*/*SwaI* ausgeschnitten und in das mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffneten Provirus pcHSRV2 eingesetzt (Abb. 25).

Die korrekte Sequenz aller Konstrukte wurde durch analytischen Verdau mit Restriktionsenzymen und kompletter Sequenzierung der Abschnitte zwischen den verwendeten Restriktionsschnittstellen überprüft.

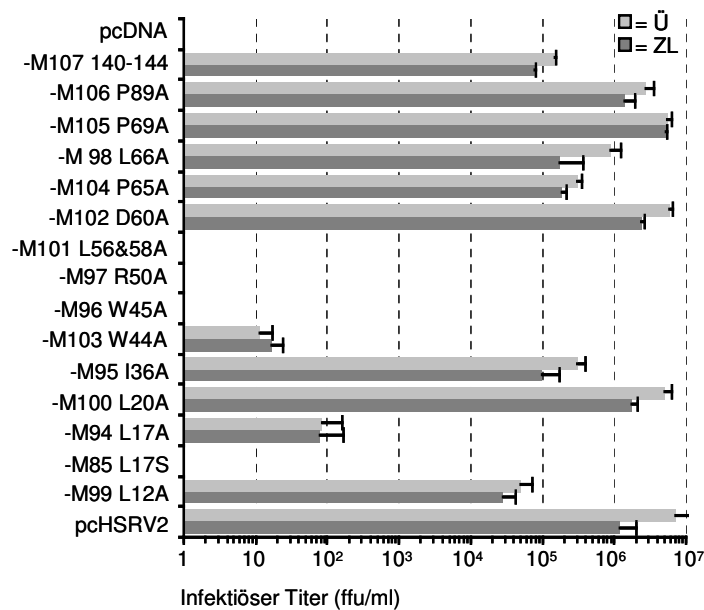


Abb. 26: Infektionsanalyse der Alanin-Substitutionsmutanten.

Nach Transfektion von 293T-Zellen mit den proviralen Alanin-Substitutionsmutanten, wildtypischem Provirus oder einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo) wurden 48 h n. T. die Überstände bzw. intrazelluläre Virusaufschlüsse auf Indikatorzellen titriert. Der infektiöse Titer wurde durch einen „Blue cell assay“ ermittelt. Das Experiment wurde 3x wiederholt, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Ü: Überstand; ZL: intrazellulärer Virusaufschluss.

Zunächst wurden getestet, ob die Mutanten mit den Alanin-Substitutionen noch zur Infektion von Wirtszellen in der Lage waren. Dazu wurden 293T-Zellkulturen mit den Substitutionskonstrukten transfiziert und 48 h später die Überstände bzw. die intrazellulären Virusaufschlüsse auf Indikatorzellen titriert (Kapitel 2.5.4.). Wie aus Abb. 26 ersichtlich wird, waren die Substitutionsmutanten pcHRSRV2-M96 (W45A), -M97 (R50A) und -M101 (L56&58A) nicht mehr in der Lage, die Indikatorzellen zu infizieren. Bei zwei weiteren Mutanten, pcHRSRV2-M94 (L17A) und -M103 (W44A) lag der Titer um mehr als vier Zehnerpotenzen unter dem des wildtypischen Provirus. In der Mutante pcHRSRV2-M94 (L17A) war das gleiche Leucin zu Alanin mutiert worden, welches bei der bereits beschriebenen Mutante pcHRSRV2-M85 (L17S) von Leucin zu Serin verändert worden war. Diese Substitutionsvariante war nicht mehr infektiös gewesen (vgl. Abb. 23 und Abb. 26). Von den übrigen Substitutionsmutanten wiesen die Konstrukte pcHRSRV2-M99 (L12A), -M95 (I36A), -M104 (P65A), -98 (L66A) und -M107 (DELED140-144GALAG) einen um zwei bis drei Logstufen erniedrigten Titer gegenüber dem Wildtypus auf (Abb. 26). Alle weiteren Mutanten zeigten vergleichbare Titer wie das wildtypische Ausgangskonstrukt (Abb. 26). Alle Substitutionsmutanten wurden auf die Freisetzung viraler Partikel hin untersucht. Dazu wurden 293T-Zellen mit den Alanin-Substitutionsmutanten und entsprechenden Kontrollen transfiziert, 48 h n. T. Zelllysate gewonnen und aus dem Überstand die viralen Partikel

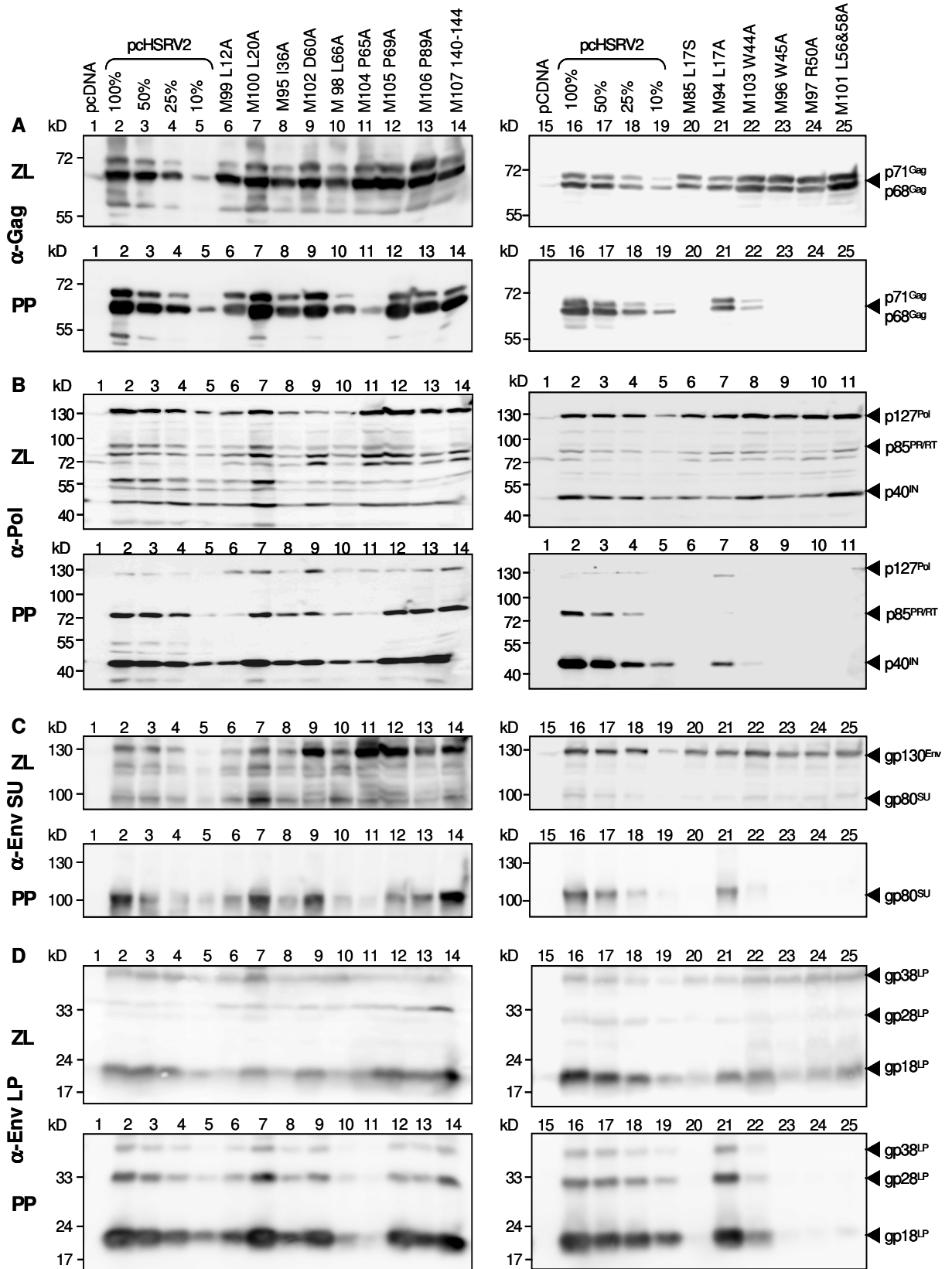


Abb. 27: Legende siehe nächste Seite

Abb. 27: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der Alanin-Substitutionsmutanten.

293T-Zellen wurden mit den Alanin-Substitutionsmutanten (Spur 6 - 14 und 20 - 25), dem wildtypischem Provirus (Spur 2 - 5 und 16 - 19) bzw. mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo, Spur 1 und 15) transfiziert. Zelllysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll geerntet. (A) Immunoblot mit Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Gag SGG 1. (B) Immunoblot mit Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Pol 3E11 und 15E10. (C) Immunoblot mit Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Env SU P3E10. (D) Immunoblot mit polyklonalen AK Kaninchen- α -PFV Env LP 1-86. ZL: Zelllysate; PP: Partikelpräparation.

präpariert. Abb. 27 zeigt die korrespondierenden Immunoblots der Zelllysate und der Partikelpräparation eines Versuches. Die zelluläre Expression von Gag war bei einigen Mutanten etwas schwächer als beim Wildtypus, aber immer noch deutlich nachweisbar (Abb. 27A). Auch eine zelluläre Expression der Vorläuferproteine von Pol (Abb. 27B) und Env (Abb. 27C-D) war bei allen Mutanten deutlich vorhanden. Die für die Bildung infektiöser Viruspartikel notwendigen Proteine konnten somit von allen proviralen Konstrukten hergestellt werden.

In der Partikelpräparation allerdings konnten für die Mutanten pcHSRV2-M96 (W45A), -M97 (R50A) und -M101 (L56&58A) keine viralen Proteinbanden mehr nachgewiesen werden (Abb. 27A-D, Spur 23-25). Offensichtlich verhinderte die Substitution von W45, R50 und L56&58 zu Alanin ebenso wie die Substitution von L17 zu Serin (Abb. 27A-D, Spur 20, vgl. auch Abb. 23) effektiv eine Freisetzung viraler Partikel. Bei diesen vier Mutanten war auch durch die intrazellulären Virusauflüsse keine Infektion der Zielzellen zu erreichen gewesen (Abb. 26). Die Alanin-Substitutionen dieser Mutanten mussten folglich einen Defekt in der Partikelmorphogenese verursachen, der bereits den intrazellulären Zusammenbau infektiöser Partikel verhinderte.

Für die beiden Substitutionsmutanten L17A und W44A, die sich noch als schwach infektiös gezeigt hatten, ließen sich auch virale Partikel im Überstand nachweisen. Im Fall von pcHSRV2-M103 (W44A) wurde etwa noch 10% der Partikelfreisetzung des Wildtypus beobachtet (Abb. 27A-D, Spur 22), für die Substitutionsmutante pcHSRV2-M94 (L17A) lag der Wert zwischen 50 - 100% (Abb. 27A-D, Spur 21). Beide Mutanten zeigten eine Inkorporation und Prozessierung von Pol (Abb. 27B, Spur 21 und 22), so dass auch ein Vorhandensein viraler genomischer RNA im Partikel angenommen werden konnte. Ebenso wurde das Glykoprotein noch effektiv in die Partikel inkorporiert (Abb. 27C und D, Spur 21 und 22).

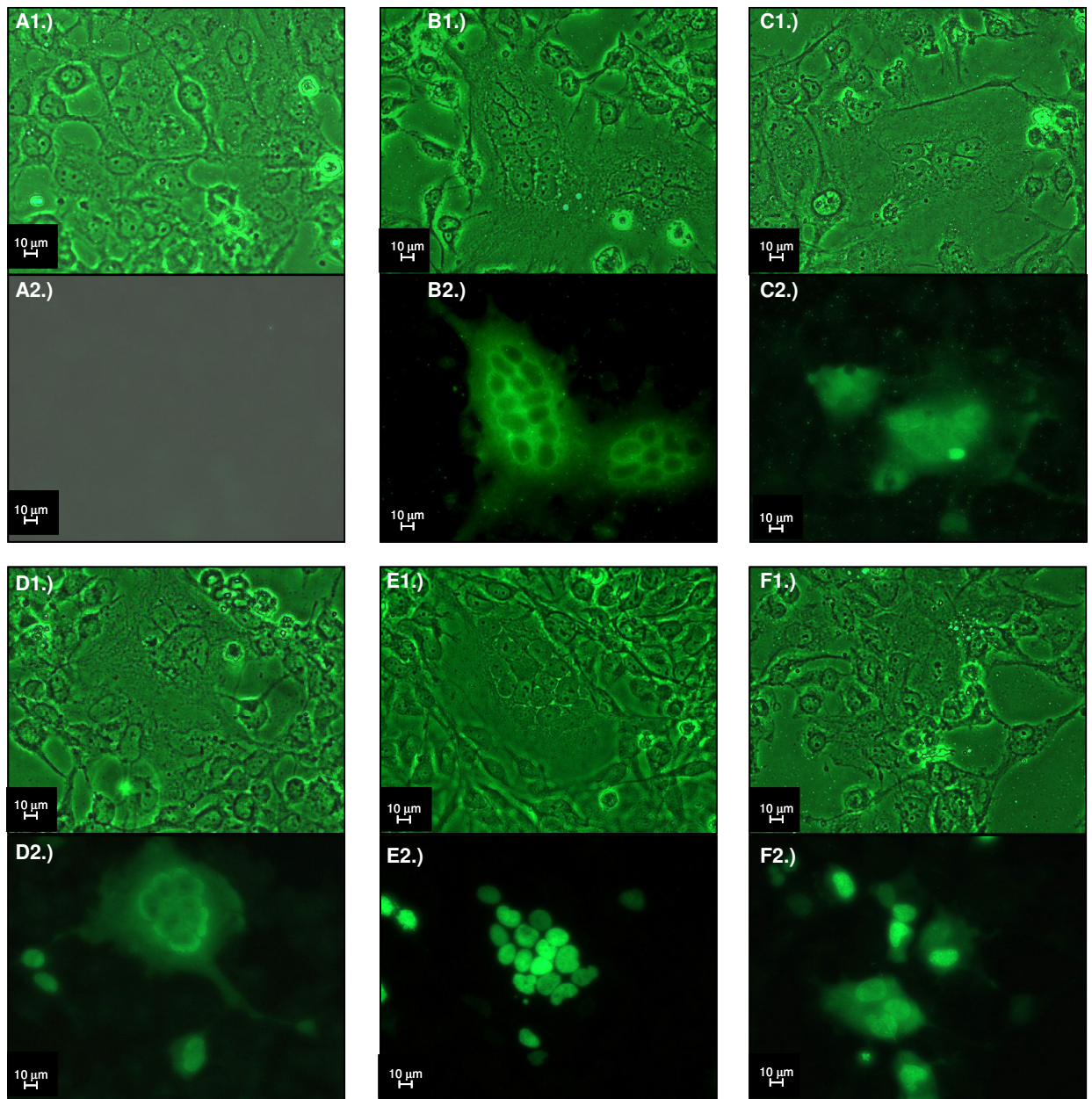


Abb. 28: Immunfluoreszenzanalyse nicht-infektiöser Alanin-Substitutionsmutanten.

HT1080-Zellen wurden mit den proviralen Konstrukten transfiziert und 48 h n. T. mit einem ersten AK gegen PFV Gag (Kaninchen- α -PFV Gag 127) und einem zweiten FITC gekoppelten α -Kaninchen-AK markiert. (A) pcDNA3.1+Zeo (Negativkontrolle). (B) pcHSRV2 (Positivkontrolle). (C) pcHSRV2-M85 L17S. (D) pcHSRV2-M96 W45A. (E) pcHSRV2-M97 R50A. (F) pcHSRV2-M101 L56&58A. Bild X1. zeigt jeweils einen Ausschnitt des Zellrasen aufgenommen mit weißen Durchlicht, Bild X2 zeigt den gleichen Ausschnitt aufgenommen bei Anregung mit UV-Licht.

3.2.5. Intrazelluläre Lokalisation der Gag-Proteine

Eine mögliche Ursache für die verhinderte Freisetzung viraler Partikel durch einige der Mutanten könnte ein Defekt im intrazellulären Transport der Gag-Proteine zum Ort der

Partikelmorphogenese sein. Die intrazelluläre Verteilung der Gag-Proteine wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung untersucht.

Mit Hilfe der Kalziumkopräzipitation wurden HT1080-Zellen mit den Substitutionsmutanten transfiziert. Aus einer Kinetik viraler Partikelpräparationen nach transienter Transfektion ist bekannt, dass etwa 24 h – 48 h n. T. ein Maximum an freigesetzten Partikeln erreicht wird, nach 72 h n. T. verringert sich bereits wieder die Anzahl an freigesetzten Partikeln (Mannigel und Lindemann, pers. Mitteilung). Deshalb wurde die Analyse der intrazellulären Proteinverteilung 48 h n. T. durchgeführt. Die Immunmarkierung der Gag-Proteine geschah mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers, der gegen den C-terminalen Teil von PFV Gag gerichtet war (Kaninchen- α -PFV Gag 127). Für die Detektion wurde ein zweiter, gegen Kaninchen gerichteter, FITC-markierter Antikörper verwendet. Im Detail ist die Vorgehensweise in Kapitel 2.4.4. beschrieben. Zur Kontrolle wurden HT1080-Zellen mit dem wildtypischen Provirus bzw. mit einem leeren Expressionsvektor transfiziert.

Die Aufnahmen in Abb. 28 zeigen, dass 48 h n. T. das wildtypische Gag-Protein überwiegend diffus im Zytoplasma verteilt vorlag (Abb. 28, B2). Eine Konzentration entlang der Kernmembran ist zu beobachten. Bei den beiden Mutanten mit den Substitutionen L17S und W45A in Gag glich die Verteilung der Gag-Proteine dem Befund beim Wildtypus (Abb. 28, C2 und D2). Im Gegensatz zum Wildtypus konnten allerdings bei der Substitutionsmutante W45A auch Zellen gefunden werden, bei denen das Gag-Protein zu diese Zeitpunkt nahezu ausschließlich auf den Kern konzentriert war. Diese Konzentration auf den Zellkern war bei den Gag-Proteinen der Konstrukte pcHSRV2-M97 R50A und -M101 L56&58A noch wesentlich deutlicher ausgeprägt (Abb. 28, E2 und F2). Zumindest im Fall der R50A-Mutante schien ein eindeutiger Transportdefekt vorzuliegen, der eine Ausschleusung des mutierten Gag-Proteins aus dem Zellkern verhinderte. In einem nächsten Schritt wurde versucht, diesen Transportdefekt durch eine zweite Mutation im Gag-Protein zu kompensieren und damit eventuell eine Freisetzung viraler Partikel wiederherzustellen.

3.2.6. Untersuchung von Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box

Ein besonderes Merkmal foamyviraler Infektionen ist nach Immunreaktion mit einem Antiserum die starke Kernfluoreszenz der infizierten Zellen (Hooks und Gibbs 1975). Verursacht wird diese Kernfluoreszenz vor allem durch den nukleären Import des Gag-Proteins, für das ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) in der GRII-Box nachgewiesen werden konnte (Schliephake und Rethwilm 1994). Eine Mutante, bei der die GRII-Box durch ein HA-Tag substituiert war, zeigte keinen Kernimport mehr und setzte keine extrazellulären infektiösen Partikel frei (Yu et al. 1996). Nach mehrfacher Passagierung von mit dieser Mutante transfizierten Zellen konnte allerdings eine Revertante isoliert werden, die nahezu

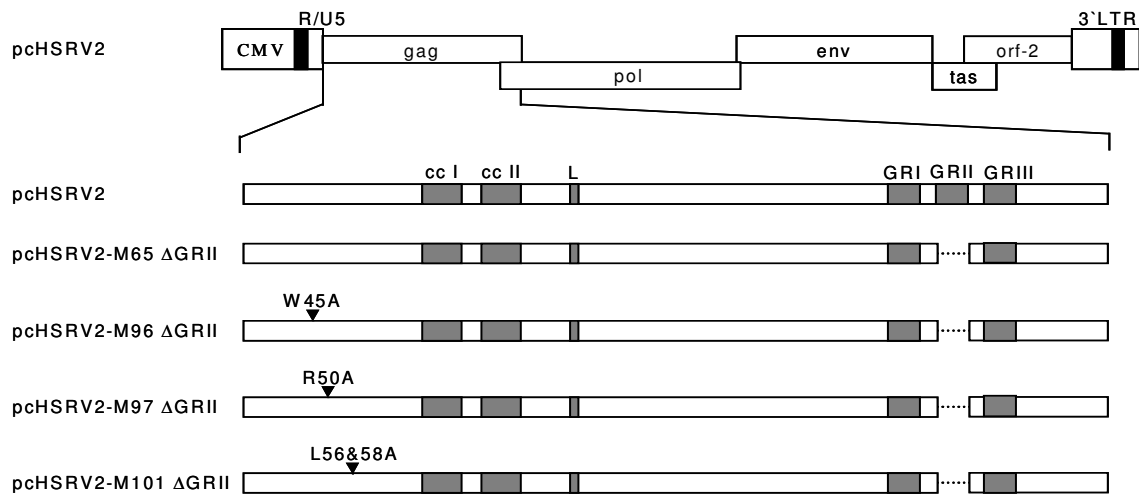


Abb. 29: Schematische Darstellung der Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box.

Funktionelle Bereiche des Gag-Proteins sind hervorgehoben. cc I und cc II: anhand von Sequenzanalysen ermittelte „coiled-coil“-Motive (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Petit et al. 2003); CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; GRI, GRII, GRIII: Glyzin-Arginin reiche Sequenzabschnitte (Schliephake und Rethwilm 1994); L: Late-Domäne (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005); LTR: „Long terminal Repeat“-Region; R: „repeat“-Region; U5: „Unique 5“-Region.

einen wildtypischen infektiösen Titer zeigte (Yu et al. 1996). Bei dieser Revertante war der an Stelle der GRII-Box eingefügte HA-Tag und einige flankierende Aminosäuren aus dem *gag*-ORF deletiert worden. In der Immunfluoreszenz zeigte aber auch diese Mutante keine deutliche Lokalisation bzw. eine zeitlich verzögerte Lokalisation des Gag-Proteins in den Zellkern transfizierter Zellen (Yu et al. 1996, Rethwilm, pers. Mitt.).

Im Fall der Alaninmutanten pcHSRV2-M96 (W45A), -M97 (R50A) und -M101 (L56&58A) waren die mutierten Gag-Proteine vor allem im Zellkern nachgewiesen worden. Deshalb wurde versucht, durch zusätzliche Deletion des nukleären Lokalisationssignals in den mutierten Gag-Proteinen die Freisetzung viraler Partikel wiederherzustellen.

Als Ausgangskonstrukt wurde die provirale GRII-Box Deletionsmutante pcHSRV2-M65 (Δ GRII) verwendet, bei der die As 545 – 560 deletiert worden sind (Moebes und Rethwilm pers. Mitteilung). Dieser Bereich entspricht der Deletion, die in der oben beschriebenen infektiösen Revertante gefunden wurde (Yu et al. 1996). Ansonsten ist das Provirusgenom unverändert gegenüber dem wildtypischen Ausgangsklon pcHSRV2 geblieben. Ein Teil des *gag*- und *pol*-ORF mit der Deletion wurde aus dem Konstrukt unter Benutzung der singulären Schnittstellen *Swal/Pacl* ausgeschnitten (vgl. Abb. 21) und in die Mutanten pcHSRV2-M96 (W45A), -M97 (R50A) und -M101 (L56&58A) mit Hilfe der gleichen Schnittstellen umgesetzt (Abb. 29). Die korrekte Sequenz aller drei Konstrukte pcHSRV2-M96 Δ GRII (W45A), -M97

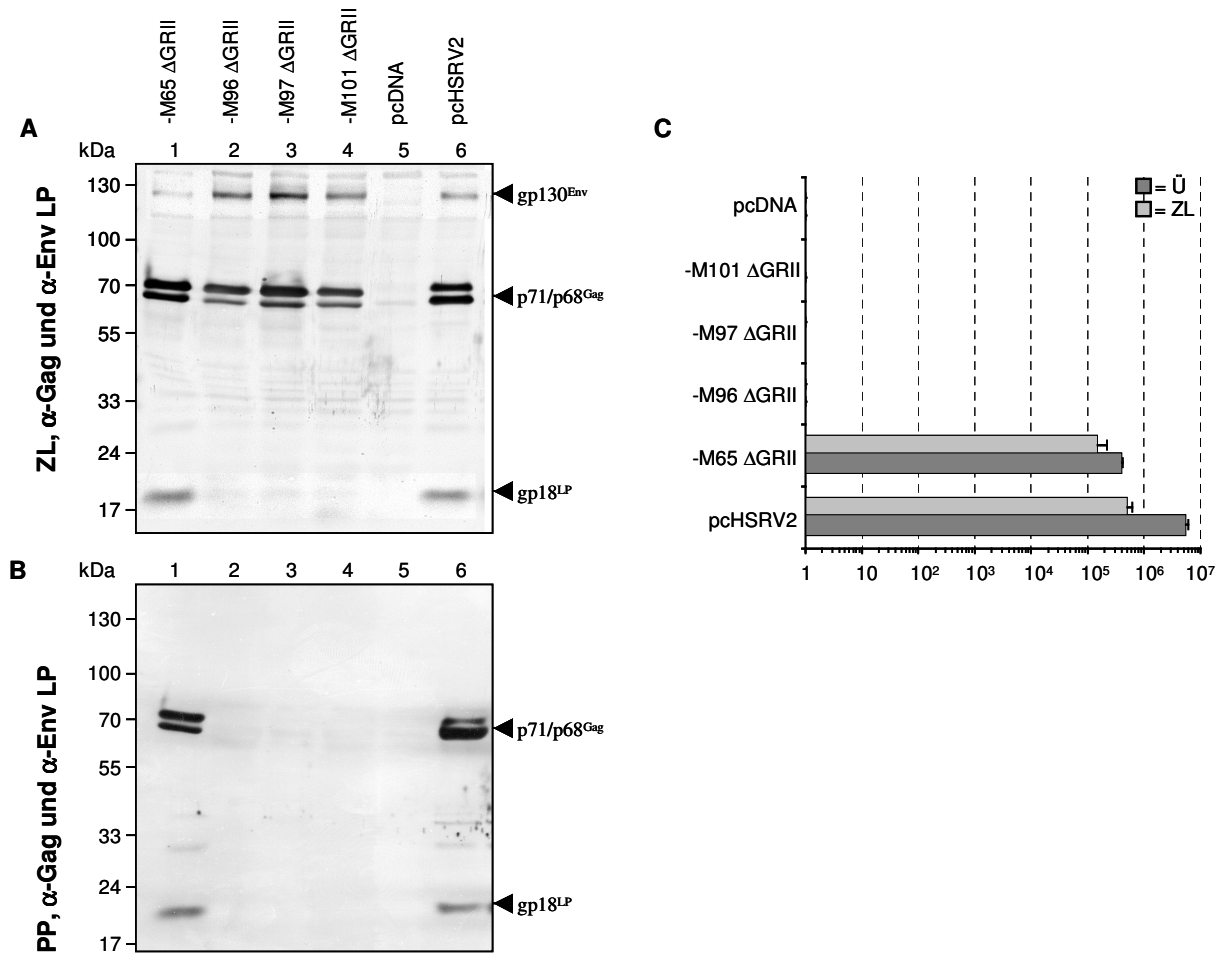


Abb. 30: Analyse der Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box.

(A) und (B) Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der proviralen Konstrukte. 293T-Zellen wurden mit den Doppelmutanten (Spur 2 – 4), pcHSRV2-M65 ΔGRII (Spur 1), dem wildtypischen Provirusklon pcHSRV2 (Spur 6) oder mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo, Spur 5) transfiziert. Zellysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll geerntet. Immunoblot mit polyklonalen AK Kaninchen-α-PFV Gag 11 und Kaninchen-α-PFV Env LP 1-86. ZL: Zellysate. PP: Partikelpräparation. (C) Nach Transfektion von 293T-Zellen mit den Doppelmutanten, der GRII-Box Deletionsmutante pcHSRV2-M65, dem wildtypischem Provirus (pcHSRV2) oder einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo) wurden 48 h n. T. die Überstände bzw. intrazelluläre Virusaufschlüsse auf Indikatorzellen titriert. Der infektiöse Titer wurde durch einen „Blue cell assay“ ermittelt. Das Experiment wurde 3x wiederholt, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Ü: Überstand; ZL: intrazellulärer Virusaufschluss.

ΔGRII (R50A) und -M101ΔGRII (L56&58A) wurde durch analytischen Verdau mit Restriktionsenzymen und kompletter Sequenzierung des Abschnittes zwischen den beiden verwendeten Restriktionsschnittstellen überprüft.

Zunächst wurde getestet, ob die Doppelmutanten durch die Deletion des NLS in der Lage waren, virale Partikel frei zu setzen. Der experimentelle Ablauf folgte der in dem vorangegangenen Kapitel beschriebenen Vorgehensweise. Nach transienter Transfektion von

Tab. 6: Lokalisation der Gag-Proteine verschiedener Mutanten und des Wildtyps im Zytoplasma (ZP) oder Zellkern (ZK) von HT1080-Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (n = 3).

+: Gag im Zytoplasma/Zellkern sichtbar, -: Gag im Zytoplasma/Zellkern nicht sichtbar, (+): Gag im Zytoplasma/Zellkern bei wenigen Zellen sichtbar, n. u.: nicht untersucht.

Zeitpunkt n. T.	12 h		24 h		48 h		72 h	
	ZP	ZK	ZP	ZK	ZP	ZK	ZP	ZK
pcHRSRV2 (wt Gag)	+	-	+	+	+	-	+	+
-M65 Δ GR11	-	-	+	(+)	+	-	+	(+)
-M96	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	(+)	+	n. u.	n. u.
-M96 Δ GR11	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	+	+	n. u.	n. u.
-M97	(+)	+	-	+	-	+	-	+
-M97 Δ GR11	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+
-M101	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+
-M101 Δ GR11	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+

293T-Zellen wurde 48 h n. T. ein Zelllysate hergestellt sowie die viralen Partikel aus dem Überstand präpariert und anschließend im Immunoblot analysiert. Die zelluläre Expression von Gag und Env durch die Doppelmутanten (Abb. 30A, Spur 2 – 4) war ähnlich stark wie die durch das wildtypischen Provirus (Abb. 30A, Spur 6). In der Partikelpräparation konnten für die Doppelmутanten keine viralen Proteine nachgewiesen werden (Abb. 30B, Spur 2 - 4). Die Deletion der GR11-Box führte also nicht zu einer erneuten Partikelfreisetzung bei den drei Alanin-Substitutionsmutanten. Die GR11-Box Deletionsmutante pcHRSRV2-M65 zeigte dagegen eine Partikelfreisetzung vergleichbar mit dem Wildtyp (Abb. 30B, Spur 1). Die Infektiosität der Doppelmутanten wurde nach Transfektion von 293T-Zellen durch Titration von intrazellulären Virusaufschlüssen und Überständen auf Indikatorzellen getestet. Es konnten keinerlei Infektionsereignisse durch die Doppelmутanten nachgewiesen werden (Abb. 30C). Dagegen erreichte die GR11-Box Deletionsmutante pcHRSRV2-M65 einen gegenüber dem Wildtypus um etwa eine Zehnerpotenz erniedrigten infektiösen Titer (Abb. 30C).

Da keine erneute Partikelfreisetzung durch die zusätzliche Deletion des NL-Signals erreicht werden konnte, wurde die zelluläre Lokalisation der verschiedenen mutierten Gag-Proteine näher untersucht. Mit Hilfe der Kalziumkoprazipitation wurden HT1080-Zellen mit den Konstrukten und entsprechenden Kontrollen transfiziert und in einer Zeitreihe 12 h, 24 h, 48 h und 72 h n. T. die transfizierten Zellkulturen auf die intrazelluläre Verteilung von Gag hin untersucht. Die Immunmarkierung der Gag-Proteine geschah wieder mit einem polyklonalen Antikörper gegen PFV Gag (Kaninchen- α -PFV Gag 127) und einem zweiten, FITC-markierten Antikörper (vgl. Kapitel 2.4.4).

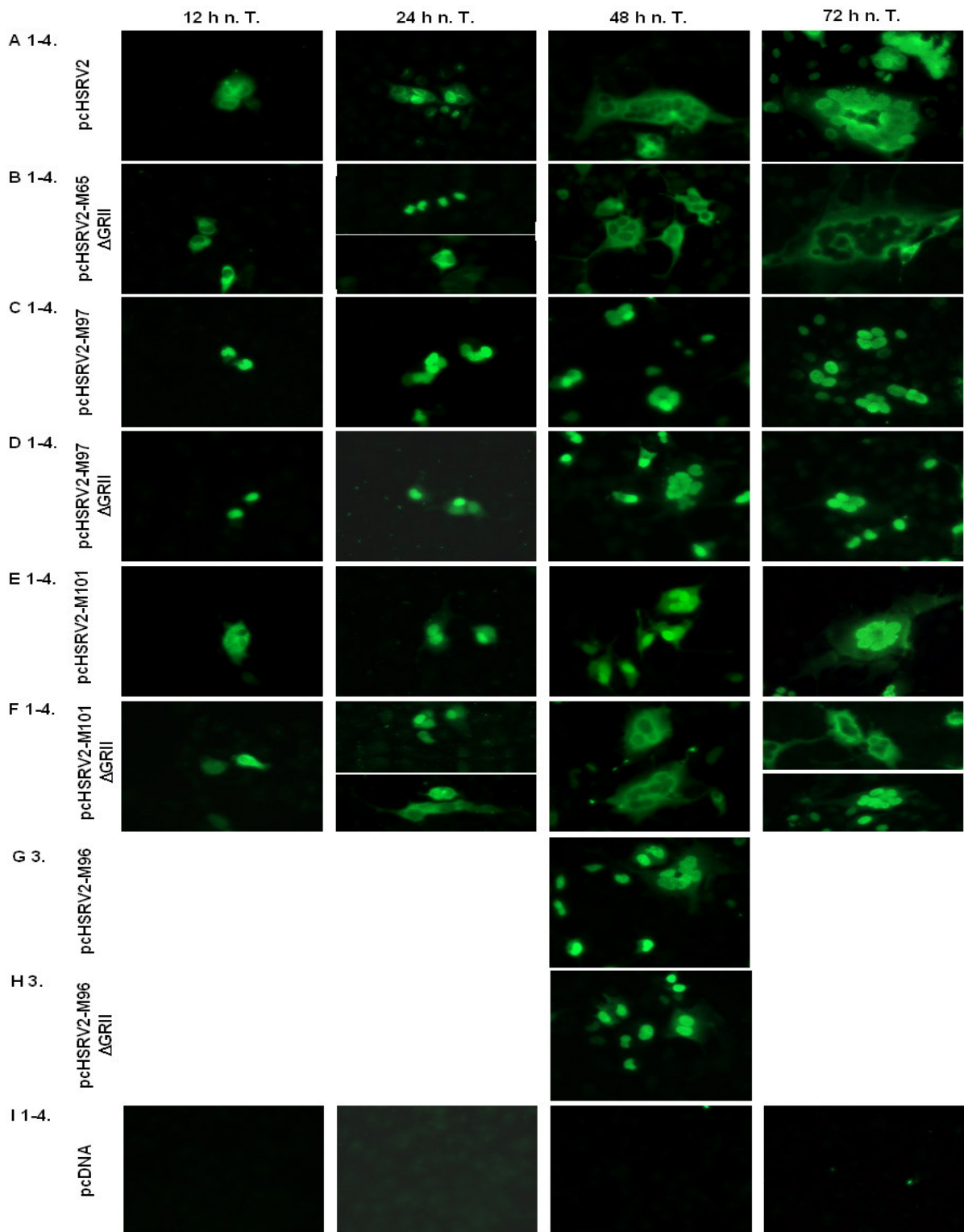


Abb. 31: Immunfluoreszenzanalyse der Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box.

HT1080-Zellen wurden mit den proviralen Konstrukten transfiziert und in einer Kinetik von 12 h bis 72 h n. T. mit einem ersten AK gegen PFV Gag (Kaninchen- α -PFV Gag 127) und einem zweiten FITC gekoppelten α -Kaninchen-AK markiert. **(A1-4)** pcHSRV2. **(B1-4)** pcHSRV2-M65 Δ GRII. **(C1-4)** pcHSRV2-M97 R50A. **(D1-4)** pcHSRV2-M97 Δ GRII R50A. **(E1-4)** pcHSRV2-M101 L56&58A. **(F1-4)** pcHSRV2-M101 Δ GRII L56&58A. **(G1-4)** pcHSRV2-M96 W45A. **(H1-4)** pcHSRV2-M96 Δ GRII W45A. **(I1-4)** pcDNA3.1+Zeo (Negativkontrolle).

Eine Übersicht über die in diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Verteilung der mutierten Gag-Proteine im Zytoplasma bzw. im Kern der HT1080-Zellen ist in Tab. 6 zu finden. Die entsprechenden Immunfluoreszenzaufnahmen einer Kinetik sind in Abb. 31 zu finden. Im Gegensatz zu früheren Befunden zeigte das Gag-Protein mit deletierter GR11-Box in diesen Versuchen eine intrazelluläre Verteilung, die kaum von der des wildtypischen Gag-Proteins zu unterscheiden war (vgl. Yu et al. 1996). Bei der Betrachtung der Immunfluoreszenzpräparate entstand der Eindruck, dass die Kernlokalisierung des Δ GR11 Gag-Proteins gegenüber dem Wildtypus zu allen Zeitpunkten reduziert war, gleichwohl aber stets vorhanden. Allerdings wurde keine exakten Quantifizierung vorgenommen. Auch die Gag-Proteine mit Alanin-Substitution und deletierter GR11-Box zeigten nur eine geringfügig von den korrespondierenden Einzelmutanten abweichende intrazelluläre Verteilung (Tab. 6 und Abb. 31). Insbesondere fiel erneut die ausschließliche Konzentration des R50A-Gag-Proteins im Zellkern zu allen untersuchten Zeitpunkten auf. Die entsprechende Doppelmutante zeigte eine geringfügige zytoplasmatische Fluoreszenz, der Hauptanteil an Gag-Protein war aber auch bei ihr zu allen untersuchten Zeitpunkten im Kern lokalisiert. Im Fall dieser Mutante sprechen alle Befunde für einen Transportdefekt, der ein Ausschleusen des mutierten Gag Proteins aus dem Zellkern verhinderte. Die Kerntranslokation nach Synthese des Gag-Proteins an den Ribosomen schien sehr effizient zu verlaufen, da zu keinem Zeitpunkt eine nennenswerte zytoplasmatische Fluoreszenz zu erkennen war.

3.2.7. Untersuchung von Alanin-Substitutionsmutanten mit N-terminalem Myristilierungssignal

Die meisten retroviralen Gag-Proteine werden posttranslational an ihrem N-Terminus modifiziert. Eine häufige Modifikation ist das Anhängen einer Myristinsäure an ein Glyzin an zweiter Position der Aminosäurenkette (u. a. Henderson et al. 1983, vgl. Vogt 1997c). Das endständige Methionin wird bei diesem Vorgang abgetrennt und die 14 C-Atome lange Fettsäure an die freie Aminogruppe des Glyzins verestert. Die Konsensussequenz für eine Myristilierung lautet Met-Gly-X-X-Ser/Thr (nach Vogt 1997c). Die Myristilierung des Glyzin dient wahrscheinlich sowohl als Transportsignal zur Zellmembran als auch als Anker für das Gag-Protein an der Zellmembran und ist in allen bisher untersuchten Fällen essentiell für die Freisetzung von viralen Partikeln (Rein et al 1986, Göttlinger et al. 1989, Bryant und Ratner 1990).

Das Gag-Protein von PFV wird nicht myristiliert, die entsprechende Konsensussequenz am N-Terminus fehlt allen foamyviralen Gag-Proteinen. Durch Hinzufügen eines Myristilierungssignales am N-Terminus der mutierten Gag-Proteine sollten die Transportblockaden aufgehoben und eine erneute Freisetzung von viralen Partikeln erreicht

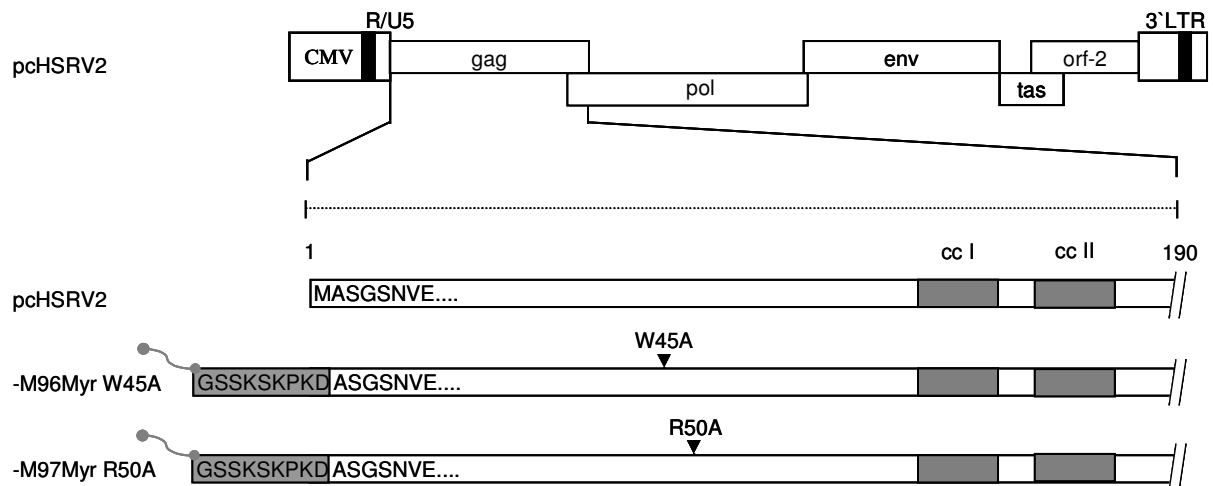


Abb. 32: Schematische Darstellung der Alanin-Substitutionsmutanten mit src-Myristilierungssignal am N-Terminus.

Funktionelle Bereiche des Gag-Proteins sind hervorgehoben. cc I und cc II: anhand von Sequenzanalysen ermittelte „coiled-coil“-Motive (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Petit et al. 2003); CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; LTR: „Long terminal Repeat“-Region; R: „repeat“-Region; U5: „Unique 5“-Region.

werden, wie es bereits für die PFV Gag-Mutante R50A beschrieben worden war (Eastman und Linial 2001). Als Signal für die Myristilierung wurde dabei die Sequenz des Src-Proteins verwendet, einer Tyrosin-spezifischen Kinase (Brugge und Erickson 1977, Hunter und Senfton 1980).

Für das Einfügen eines N-terminalen Myristilierungssignals wurde ein überlappendes Sense- und Antisensprimerpaar entworfen, die am 5'-Ende im Überlappungsbereich jeweils für die 9 Aminosäuren des Signals kodierten und 3' eine homologe Sequenz zur DNA-Matrize trugen, die eine Bindung an diese ermöglichte. Das Myristilierungssignal wurde in die beiden Alaninmutanten pcHSRV2-M96 (W45A) und -M97 (R50A) eingefügt. Der Einbau der Signalsequenz erfolgte mittels einer rekombinanten PCR mit pcHSRV2-M96 (W45A) und -M97 (R50A) als DNA-Matrize. Als Außenprimer wurden die Primer #1370 und #1125 und als mutagenes Innenprimerpaar #2108/#2109 verwendet. Das durchgängige Fragment wurde in einen Topo-Vektor subkloniert und anschließend über die beiden terminalen Schnittstellen *EheI* und *NheI* in die ebenfalls mit diesen beiden Restriktionsenzymen geöffneten Vektoren pcHSRV2-M96 (W45A) und -M97 (R50A) eingesetzt. Bei den auf diese Weise entstandenen Doppelmутanten pcHSRV2-M96Myr (W45A) und -M97Myr (R50A) befindet sich die 9 Aminosäuren umfassende Signalsequenz zwischen dem Translationsstart und dem kodierenden Basentriplett für die zweite Aminosäure des PFV gag-ORF, ein Alanin (Abb. 32). Die korrekte Sequenz beider Konstrukte wurde durch analytischen Verdau mit Restriktionsenzymen und kompletter Sequenzierung des Abschnittes zwischen den beiden verwendeten Restriktionsschnittstellen überprüft.

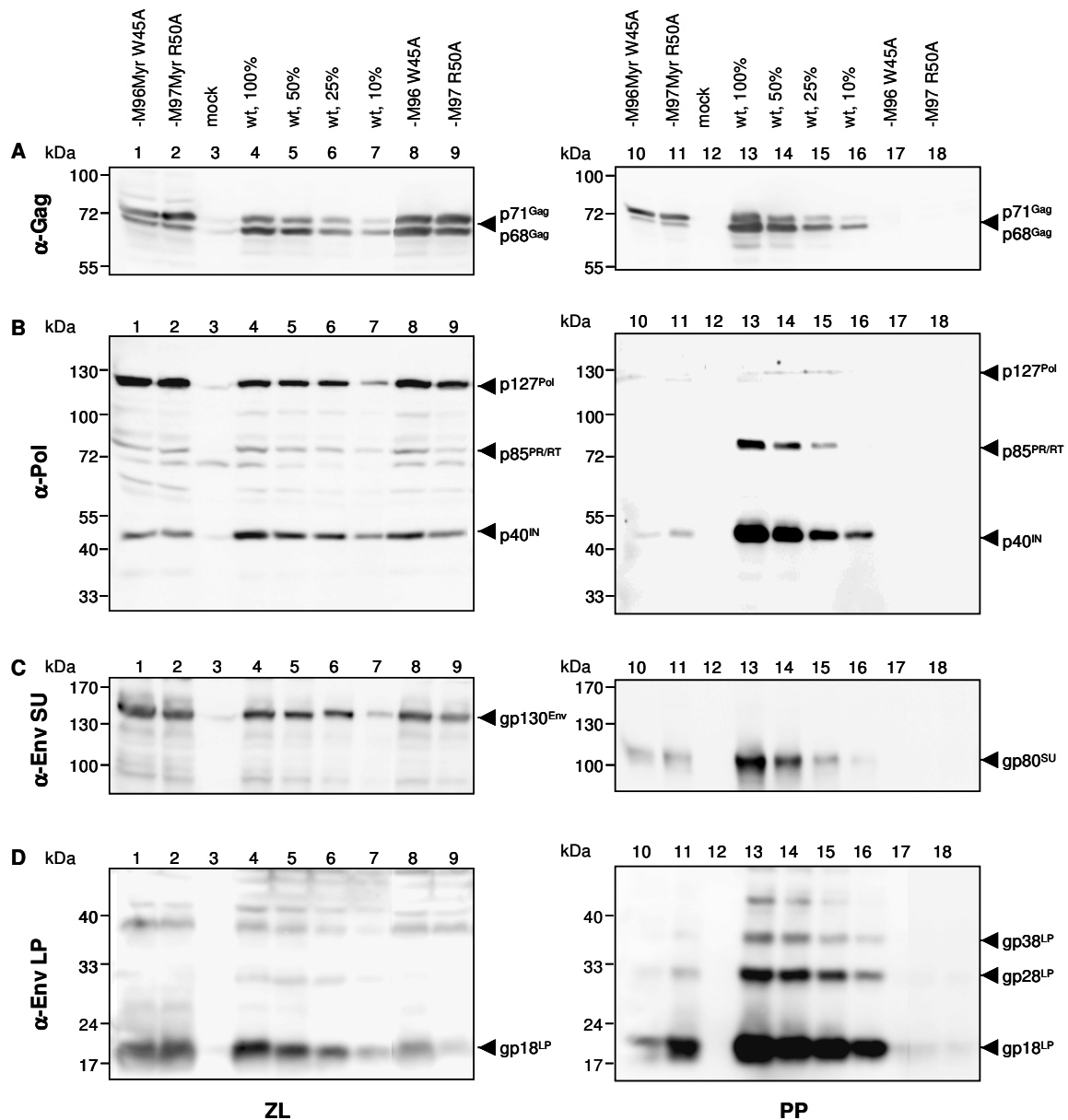


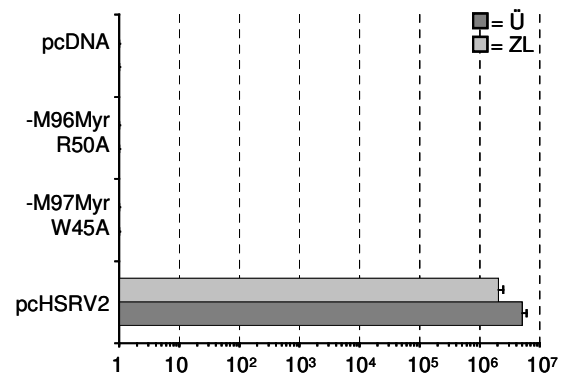
Abb. 33: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der Alanin-Substitutionsmutanten mit Myristilierungssignal.

293T-Zellen wurden mit den Doppelmutanten (Spur 1 und 2, 10 und 11), den Mutanten nur mit Alanin-Substitution (Spur 8 und 9, 17 und 18), dem wildtypischen Provirusklon (pcHSRV2, Spur 4 – 7, 13 - 16) oder mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo, Spur 3 und 12) transfiziert und 48 h n. T. ein Gesamtzelllysate hergestellt sowie die viralen Partikel aus dem Überstand präpariert. (A) Immunoblot mit Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Gag SGG 1. (B) Immunoblot mit Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Pol 3E11 & 15E10. (C) Immunoblot mit Hybridomaüberstand Maus- α -PFV Env SU P3E10. (D) Immunoblot mit polyklonalen AK Kaninchen- α -PFV Env LP 1-86. ZL: Zelllysate; PP: Partikelpräparation.

Zunächst wurden die Konstrukte auf zelluläre Expression und Freisetzung viraler Proteine getestet. Nach transienter Transfektion von 293T-Zellen wurde 48 h n. T. ein Zelllysate hergestellt sowie partikuläres Material aus dem Überstand präpariert und anschließend im Immunoblot analysiert.

Abb. 34: Infektionsanalyse der Alanin-Substitutionsmutanten mit Myristilierungssignal.

Nach Transfektion von 293T-Zellen mit den Doppelmutanten, dem wildtypischem Provirus (pcHSRV2) oder einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo) wurden 48 h n. T. die Überstände bzw. intrazelluläre Virusaufschlüsse auf Indikatorzellen titriert. Der infektiöse Titer wurde durch einen „Blue cell assay“ ermittelt. Das Experiment wurde 3x wiederholt, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Ü: Überstand; ZL: intrazellulärer Virusaufschluss.



Der Immunoblot zeigt, dass durch das Anfügen des Myristilierungssignals die zelluläre Expression von Gag nicht herabgesetzt wurde (Abb. 33A, Spur 1 und 2). Auch die Expression der viralen Proteine Pol und Env wurden durch die Modifikation nicht beeinflusst (Abb. 33B-D, Spur 1 und 2).

Im Immunoblot der Partikelpräparation ließ sich für die beiden Doppelmutanten mit Myristilierungssignal und Alanin-Substitution eindeutig Gag-Protein nachweisen (Abb. 33A, Spur 10 und 11). Wie erwartet zeigten dagegen die beiden Mutanten nur mit Alanin-Substitution pcHSRV2-M96 W45A und -M97 R50A keine Freisetzung viraler Proteine (Abb. 33A-D, Spur 17 und 18). Allerdings lag die Freisetzung von partikulärem Gag-Protein durch die beiden Doppelmutanten pcHSRV2-M96Myr W45A und -M97Myr R50A bei nur etwa 10 – 25 % der wildtypischen Kontrolle (Abb. 33A, vgl. Spur 10 und 11 mit Spur 13 – 16). Auch überwog der Anteil an unprozessierten p71^{Gag}-Protein in den Partikelpräparationen der beiden Doppelmutanten (Abb. 33A, Spur 10 und 11). Dagegen war in der Präparation wildtypischer PFV Partikel das prozessierte p68^{Gag}-Protein deutlich stärker nachweisbar als die unprozessierte Form p71^{Gag} (Abb. 33A, Spur 13 - 16). In den Zelllysaten war sowohl bei den Mutanten als auch beim Wildtypus das Verhältnis zwischen den beiden Gag-Proteinen nahezu ausgeglichen (Abb. 33A, Spur 1 - 9). Die geringe Menge an prozessiertem Gag-Protein in den Partikelpräparationen der beiden Myristilierungsmutanten deutete einen reduzierten Einbau der viralen Protease an. Es ließen sich in der Tat nur geringe Mengen an Pol-Protein in den Partikelpräparationen der Myristilierungsmutanten nachweisen (Abb. 33B, Spur 10 und 11). Die Env-Proteine ließen sich zwar in den Partikelpräparationen der Myristilierungsmutanten deutlich belegen, allerdings war die Intensität der Proteinbanden ebenfalls gegenüber dem Wildtypus reduziert (Abb. 33C-D, Spur 10 und 11).

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei den nachgewiesenen pelletierbaren viralen Proteinen tatsächlich um infektiöse Virionen handelte, wurden Infektionsversuche auf Indikatorzellen mit den Doppelmutanten durchgeführt (vgl. Kapitel 2.5.4.). Nach Übertrag von Überstand beziehungsweise intrazellulärem Virusaufschluss von mit den Konstrukten

pcHSRV2-M96Myr W45A und -M97Myr W50A transfizierter Zellkulturen auf Indikatorzellen konnten keine Infektionsereignisse beobachtet werden (Abb. 34). Bei dem in den Partikelpräparationen nachgewiesenen partikulärem viralem Proteinmaterial handelte es sich folglich nicht um Bestandteile infektiöser Virionen.

3.2.8. Untersuchung der PFV W45A-Mutation im FFV Gag-Protein

Die Substitution einzelner konservierter Aminosäuren zwischen Position 40 und 60 im PFV Gag-Protein hatte eine Partikelfreisetzung unterbunden. Es war nun von Interesse, ob dieser Bereich des Gag-Proteins auch bei anderen Foamyviren eine Rolle bei der Morphogenese und Freisetzung infektiöser Partikel spielte. Exemplarisch wurde eine der PFV Gag W45A-Substitution analoge Mutation im Gag-Protein des Felinen Foamyvirus (FFV) hergestellt und der Phänotyp dieser Mutante charakterisiert (Abb. 35A).

Das konservierte Tryptophan W45 des PFV Gag-Proteins findet sich im FFV Gag-Protein an Position 38 (vgl. Abb. 24). Der Austausch der Aminosäure gegen Alanin erfolgte mittels rekombinanter PCR. Als Außenprimer wurde das Primerpaar #1418/#1419 verwendet, die Mutation zu Alanin wurde über das Primerpaar #1420/#1421 in den FFV *gag*-ORF eingeführt. Das PCR-Fragment wurde in einen Topo-Vektor subkloniert, anschließend mit Bpu1102I/SnaBI verdaut und über diese beiden Schnittstellen gegen ein 1,4 kB großes Fragment im infektiösen Provirusklon pChatul-3 ausgetauscht. Der infektiöse provirale Klon pChatul-3 war aus einem in Zellkultur schnell replizierende FFV-Isolat hergestellt worden, das Virusgenom steht unter Kontrolle des CMV-Promotors (Roy et al. 2004).

Zu Beginn der Experimente wurde untersucht, ob die Mutante pChatul-3 W38A noch zur Infektion von Wirtszellen fähig war. Analog zu der Indikatorzelllinie BHK/LTR(PFV)/*lacZ* für PFV existiert auch für FFV eine Indikatorzelllinie, bei der ebenfalls das *lacZ*-Gen stabil unter Kontrolle des FFV LTR-Promotors in das Zellgenom integriert wurde (Bock et al 1998, siehe Kapitel 2.1.8.). Die Vorgehensweise bei diesen Infektionsexperimenten war ansonsten analog zur beschriebenen Methodik bei PFV (Kapitel 2.5.4.).

Nach Transfektion von 293T-Zellen mit der Mutante pChatul-3 W38A und entsprechenden Kontrollansätzen erfolgte 48 h n. T. die Titration der Überstände und der intrazellulären Virusaufschlüsse auf CrFK/LTR(FFV)/*lacZ*-Indikatorzellen. Während für das wildtypischen Provirus ein infektiöser Titer von etwa 7×10^4 ffu/ml im Überstand und in den intrazellulären Aufschlüssen bestimmt wurde, konnte für die Alaninmutante pChatul-3 W38A keine Infektion der Indikatorzellen nachgewiesen werden (Abb. 35E).

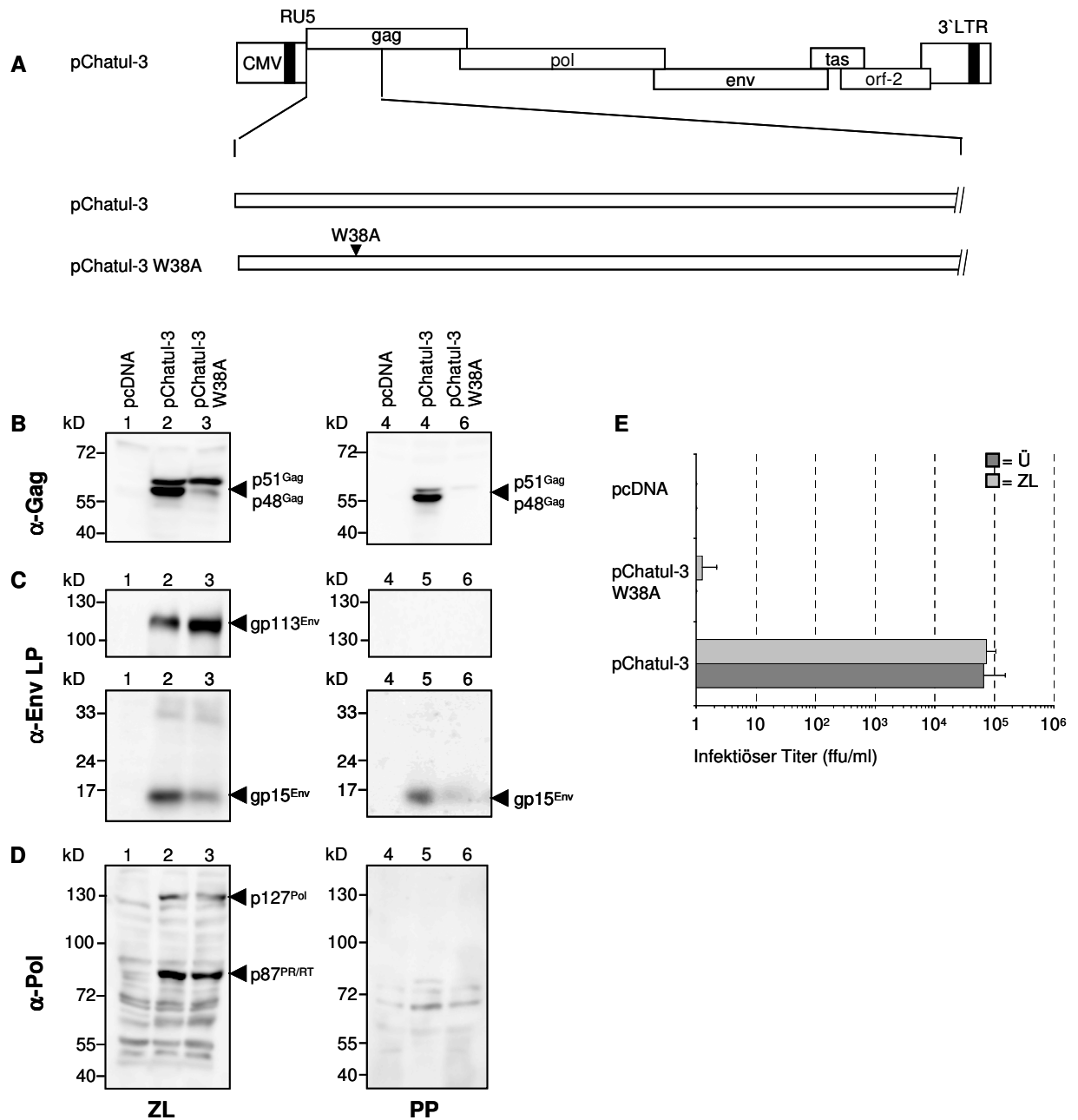


Abb. 35: Analyse der FFV Gag-Substitutionsmutante W38A.

(A) Schematische Darstellung des proviralen Konstruktes pChatul-3 und der Substitutionsmutante pChatul-3 W38A. CMV: Promotor/Enhancer des CM-Virus; LTR: „Long terminal Repeat“-Region; R: „repeat“-Region; U5: „Unique 5“-Region. (B-D) Immunoblot von Zelllysaten und Partikelpräparationen. 293T-Zellen wurden mit pChatul-3 W38A (Spur 3 und 6), pChatul-3 (Spur 2 und 5) oder mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo, Spur 1 und 4) transfiziert. Zelllysate und Viruspartikel wurden 48 h n. T. nach dem Standardprotokoll präpariert. (B) Immunoblot mit polyklonalen AK Kaninchen- α -FFV Gag 1-514. (C) Immunoblot mit polyklonalen AK Kaninchen- α -FFV Env 2-67. (D) Immunoblot mit polyklonalen AK Kaninchen- α -FFV Pol. ZL: Zelllysate; PP: Partikelpräparation. (E) Infektionsanalyse der Mutante pChatul-3 W38A. Nach Transfektion von 293T-Zellen mit der Mutante pChatul-3 W38A, dem wildtypischem Provirus pChatul-3 bzw. einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1+Zeo) wurden 48 h n. T. die Überstände bzw. intrazelluläre Virusaufschlüsse auf Indikatorzellen titriert. Der infektiöse Titer wurde durch einen „Blue cell assay“ ermittelt. Das Experiment wurde 3x wiederholt, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Ü: Überstand; ZL: intrazellulärer Virusaufschluss.

Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, ob die Mutante noch eine Freisetzung von viralen Partikeln zeigte. Dazu wurden erneut 293T-Zellen transfiziert und 48 h später nach dem Standardprotokoll ein Zelllysat hergestellt und die viralen Partikel aus dem Überstand aufgereinigt (vgl. Kapitel 2.4.3. und 2.5.5.). Im Immunoblot konnte die zelluläre Expression der viralen Proteine Gag, Pol und Env durch die W38A-Mutante bestätigt werden (Abb. 35B-D, Spur 3). In der Partikelpräparation allerdings ließ sich kein Gag-Protein mehr nachweisen (Abb. 35B, Spur 6). Auffällig war die fast völlig fehlende zelluläre Prozessierung des W38A Gag-Proteins (Abb. 35B, Spur 3), obwohl die Prozessierung der Pol-Untereinheit p87^{PR/RT} deutlich in den Zellen nachzuweisen war (Abb. 35D, Spur 2 und 3). Dieser Prozessierungsdefekt war bei der analogen PFV Mutante pCHSRV2-M96 (W45A) nicht zu beobachten (vgl. Abb. 27).

Die Übertragung der Substitution des Tryptophan 45 in Alanin von PFV auf das analoge Tryptophan 38 in FFV unterband also auch in FFV die Bildung und Freisetzung viraler Partikel.

3.2.9. Elektronenmikroskopische Analyse von Gag-Mutanten

Durch die bislang vorgestellten Untersuchungen konnten mehrere für die Partikelmorphogenese essentielle Aminosäuren bzw. Aminosäureabschnitte im N-Terminus von PFV Gag identifiziert werden. Die biochemischen Untersuchungen konnten allerdings nicht klären, ob die einzelnen Gag-Mutanten intrazelluläre Viruskapside bildeten oder die Mutationen sich schon auf eine frühe Stufe der Partikelmorphogenese auswirkten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden von den Mutanten, die einen vom Wildtypus abweichenden Phänotyp gezeigt hatten, elektronenmikroskopische Aufnahmen transfizierter Zellkulturen angefertigt.

Mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode wurden 293T-Zellen mit den verschiedenen Gag-Mutanten transfiziert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte 48 h n. T. wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben. Nach der initialen Fixierung der Proben wurden diese an das Deutsche Krebsforschungszentrum/ Heidelberg, Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie, zur weiteren Aufarbeitung der Proben durch Herrn Prof. Dr. Zentgraf und Mitarbeiter verschickt.

Zum Vergleich wurden bei jeder Analyse auch elektronenmikroskopische Aufnahmen einer entsprechenden Wildtypkontrolle angefertigt. Bei diesen Proben waren im Zytoplasma der transfizierten Zellen deutliche ringförmige Kapside zu erkennen (Abb. 36A und Abb. 38A), zu denen sich die wildtypischen PFV Gag-Proteine zusammenlagerten. In ihrer Morphologie sind sie mit den unreifen Kapsiden von Orthoretroviren vergleichbar. An zellulären Membranen war die Abschnürung von reifen Viruspartikeln zu beobachten (Abb. 37A und B).

Typisch für foamyvirale Viruspartikel sind die prominenten Stachelstrukturen auf der Außenhülle der Partikel, die vom viralen Glykoprotein gebildet werden. Innerhalb der Partikel ist als elektronendichte ringförmige Struktur das Kapsid zu erkennen. In manchen Partikeln waren auch mehr als ein Viruskapsid enthalten, eine Beobachtung, die auch bei Orthoretroviren gemacht wurde (Briggs et al. 2003).

Die Untersuchung der C-terminalen Deletionsmutanten hatte gezeigt, dass die As 1 – 297 des PFV Gag-Proteins ausreichend waren, um eine Freisetzung partikulären Gag-Materials in den Überstand zu erhalten. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit dem Expressionskonstruktes pMC60 Δ 297 transfizierten Zellen waren zahlreiche freigesetzte virusähnliche Partikel mit den prominenten Env-Spikes zu erkennen (Abb. 37E & F). Allerdings variierten diese Partikel stark in ihrer Größe und es fehlte ihnen die deutlich ausgeprägte ringförmige Kapsidstruktur. Auch im Zytoplasma konnten keine Kapside entdeckt werden. Die verkürzten Gag-Proteine bewirkten folglich noch eine Abschnürung virusähnlicher Partikel mit partikulären Gag-Aggregaten, konnten aber keine korrekten Kapside mehr aufbauen.

Die elektronenmikroskopische Analyse der N-terminalen Deletionsmutanten belegte, dass die Mutante mit der größten Deletion (pMC12 Δ 7-199, Abb. 36F) intrazellulär noch Kapside bildete. Dies gilt ebenso für die Konstrukte mit sukzessiv kleineren Deletionen am N-Terminus von Gag (pMC4 Δ 7-179, pMC3 Δ 7-92 und pMC11 Δ 7-92, Abb. 36C - E). Erstaunlicherweise konnten in den Aufnahmen der mit pMC1 Δ 7-78 transfizierten Zellkultur keine Kapside beobachtet werden, statt dessen lagerten sich diese Gag-Proteine zu tubulären Strukturen zusammen (Abb. 36B).

Im Zytoplasma der mit der Mutante pHSRV2-M93 Δ 123 - 199 transfizierten Zellen fanden sich annähernd kapsidförmige Gag-Aggregate (Abb. 37C & D). Auffällig war die Anhäufung elektronendichter Bereiche im Zellkern und besonders entlang der Kernmembran. Es ist zu vermuten, dass es sich dabei um Ansammlung unstrukturierter Gag-Aggregate handelte. In intrazellulären Kompartimenten ließen sich freie virusähnliche Partikel mit prominenten Env-Spikes nachweisen. Wie schon bei der C-terminalen Deletionsmutante pMC60 Δ 297 beobachtet, fehlte diesen Partikeln allerdings eine klare Kapsidstruktur, statt dessen waren unregelmäßige elektronendichte Bereiche im Inneren der Partikel erkennbar.

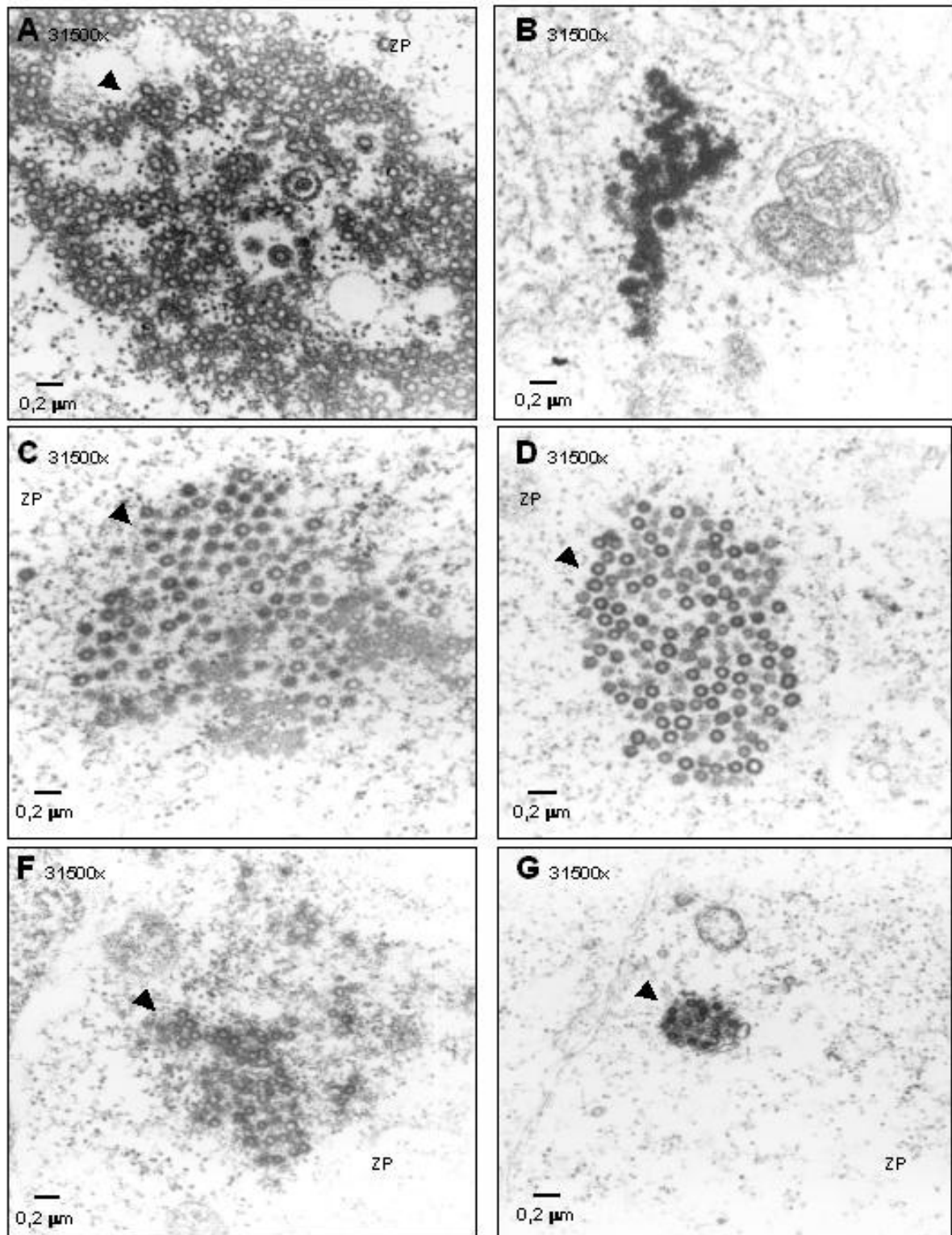


Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit den N-terminalen Deletionsmutanten pMC1 bis -5.
 293T-Zellen wurden mit dem jeweiligem Gag-Expressionskonstrukt sowie pCpol-2, pCenv-1, pMD9 (4-Plasmid-System) transfiziert (A) pCZlgag4 (PFV Gag wt). (B) pMC1 Δ 7-78. (C) pMC11 Δ 7-92. (D) pMC3 Δ 7-125. (E) pMC4 Δ 7-179 (F) pMC12 Δ 7-199. Vergrößerungsfaktor der Aufnahmen und Maßstab sind angegeben. Pfeilspitzen zeigen intrazelluläre Kapsidansammlungen. ZP: Zytoplasma.

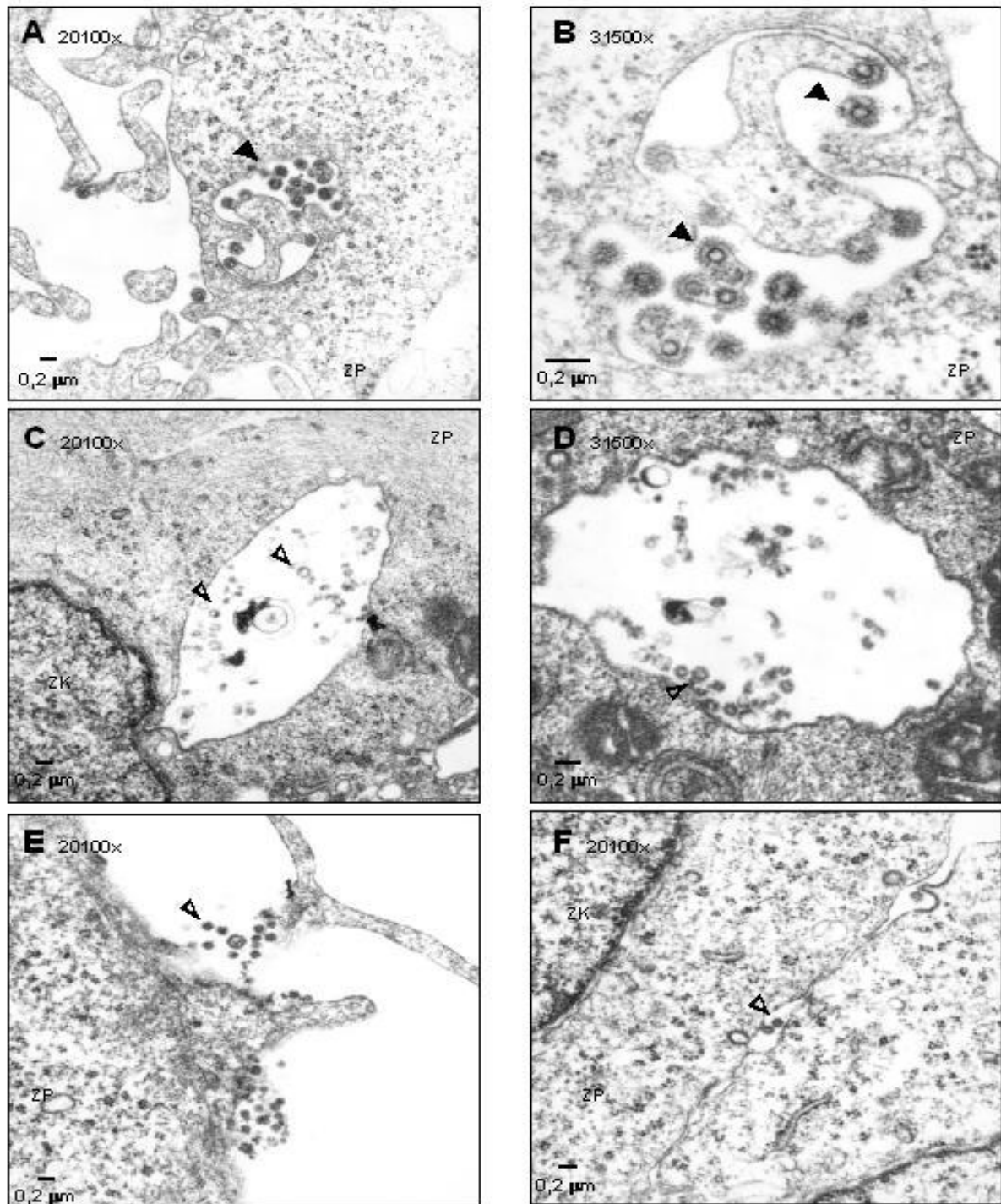


Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit den Deletionsmutanten pMC60 Δ C297 und pCHSRV2-M93 Δ 123-199.

(A – D) 293T-Zellen wurden mit den proviralen Konstrukten pCHSRV2 und pCHSRV2-M93 Δ 123-199 transfiziert. (A und B) pCHSRV2 (PFV Gag wt). (C und D) pCHSRV2-M93 Δ 123-199. (E und F) pMC60 Δ C297: 293T-Zellen wurden mit dem Gag-Expressionskonstrukt pMC60 Δ C297 sowie pCZlpol1, pczHFVenvEM02 und pMD9 transfiziert (4-Plasmid-System). Vergrößerungsfaktor der Aufnahmen und Maßstab sind angegeben. Geschlossene Pfeilspitzen zeigen intrazelluläre Kapside (A & B) an. Offene Pfeilspitzen deuten auf kapsidartige Gag-Aggregate (C – F) hin. ZP: Zytoplasma; ZK: Zellkern.

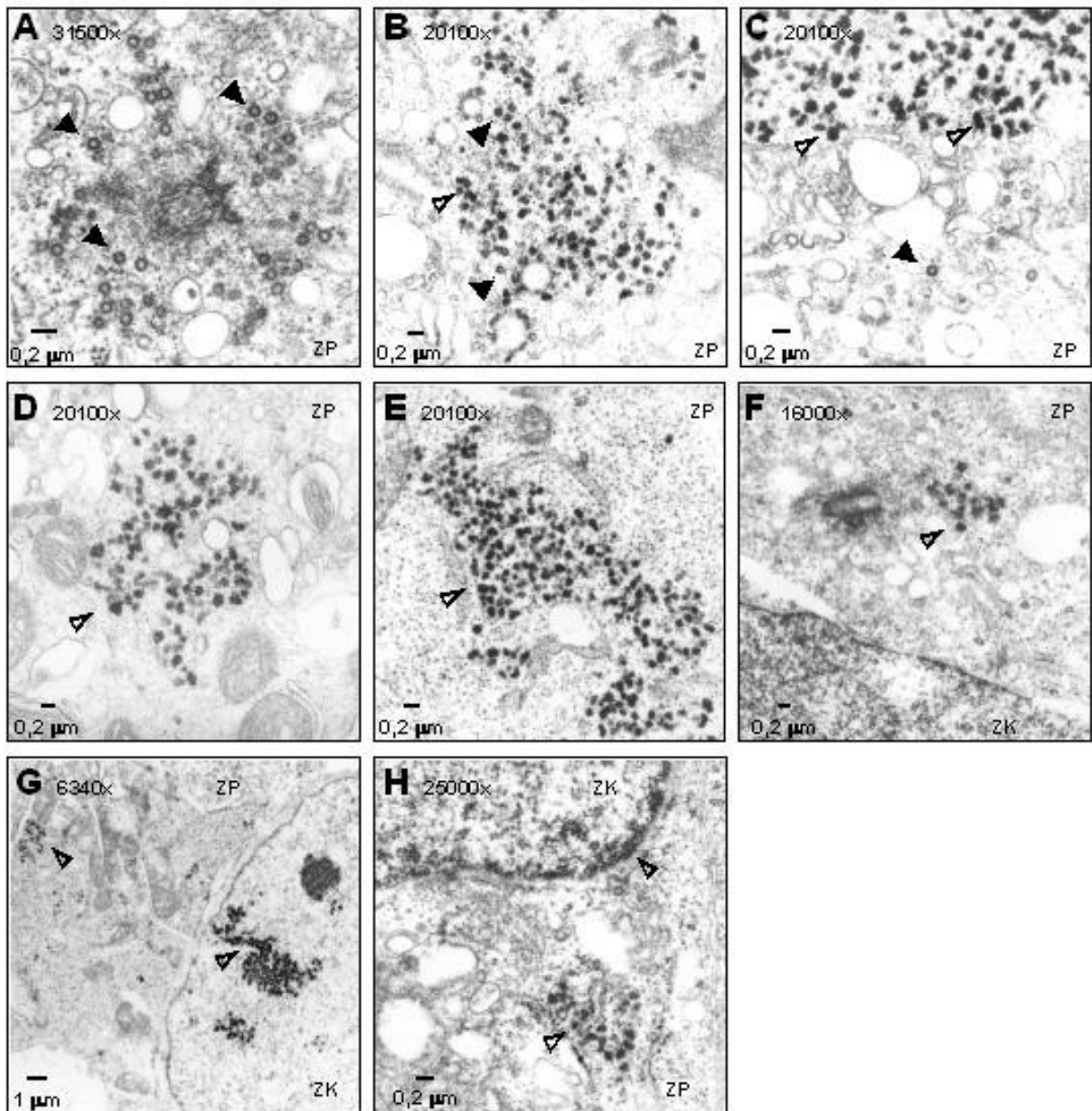


Abb. 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit den Alanin-Substitutionsmutanten in PFV Gag.

293T-Zellen wurden mit den proviralen Konstrukten transfiziert. (A) pcHSRV2 (PFV Gag wt). (B) pcHSRV2-M94 L17A. (C) pcHSRV2-M103 W44A. (D) pcHSRV2-M101 L56&58A. (E) pcHSRV2-M85 L17S. (F) pcHSRV2-M96 W45A. (G) pcHSRV2-M97 R50A. (H) pcHSRV2-M97 R50A. Vergrößerungsfaktor der Aufnahmen und Maßstab sind angegeben. Gefüllte Pfeilspitzen zeigen intrazelluläre Kapside an, offene Pfeilspitzen deuten auf intrazelluläre Gag-Aggregate hin. ZP: Zytoplasma; ZK: Zellkern.

EM-Aufnahmen wurden ebenfalls von alle Substitutionsmutanten angefertigt, die einen vom Wildtypus stark abweichenden Phänotyp gezeigt hatten.

Auf den Aufnahmen einer Zellkultur, die mit dem Konstrukt pcHSRV2-M97 L17A transfiziert worden war, ließen sich sowohl vereinzelte Kapside im Zytoplasma als auch freigesetzte Viruspartikel erkennen, die in ihrer Morphologie den Beobachtungen beim Wildtypus glichen

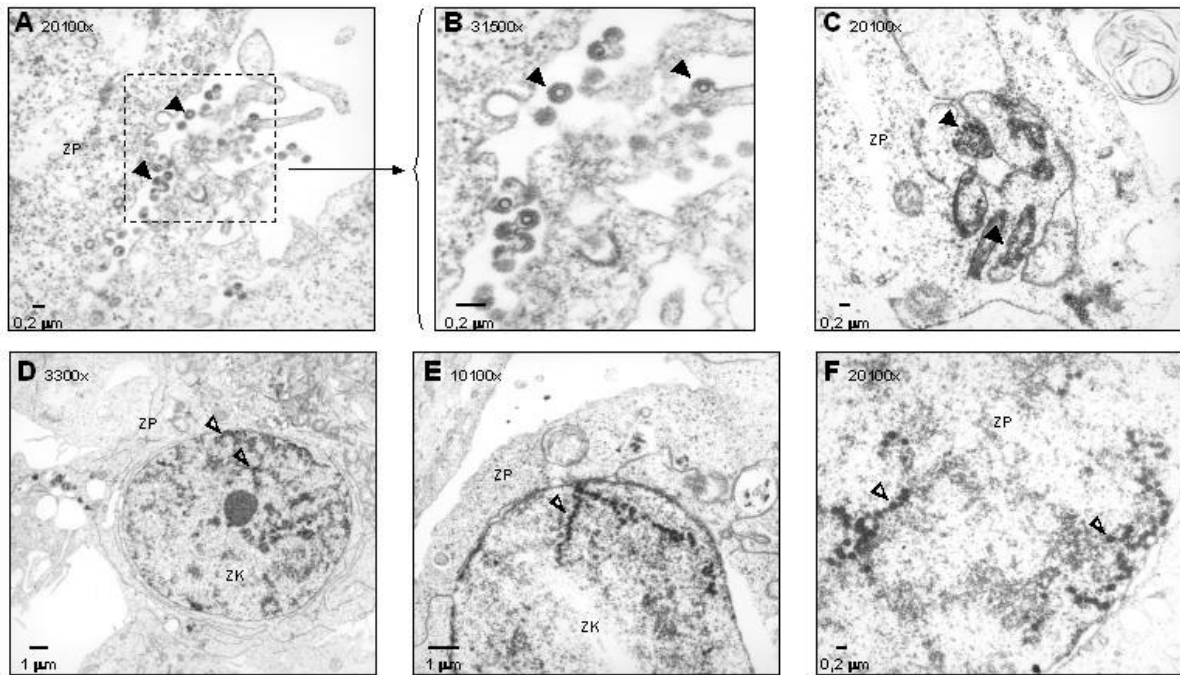


Abb. 39: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit der FFV Gag Mutante W38A.

(A-C) 293T-Zellkultur transfiziert mit pChatul-3. (D-F) 293T-Zellkultur transfiziert mit pChatul-3 W38A. Vergrößerungsfaktor der Aufnahmen und Maßstab sind angegeben. Geschlossene Pfeilspitzen zeigen virale Partikel (A und B) oder intrazelluläre Kapsidansammlungen (C) an. Offene Pfeilspitzen deuten intrazelluläre Gag-Aggregate an (D bis F). ZP: Zytoplasma; ZK: Zellkern.

(Abb. 38B, ausgefüllte Pfeile). Neben diesen vermutlich korrekt aufgebauten Partikel waren aber auch zahlreiche unregelmäßige und halboffene Kapside sowohl im Zytoplasma als auch in freigesetztem partikulärem Virusmaterial zu erkennen (Abb. 38B, offene Pfeile). Zudem ließen sich im Zytoplasma Akkumulationen von elektronendichten Material beobachten, bei dem es sich vermutlich um unstrukturierte Gag-Aggregate handelte und die in dieser Weise nicht in den mit dem Wildtyp transfizierten Proben vorgefunden wurden.

Diese Akkumulation elektronendichten Materials war in noch stärkerem Maße bei der Mutante pHSRV2-M103 W44A zu beobachten, während virale Kapside nur sehr vereinzelt im Zytoplasma zu finden waren (Abb. 38C).

Bei den Mutanten pHSRV2-M85 L17S, -M96 W45A, -M97 R50A und -M101 L56&58A waren im Zytoplasma der transfizierten Zellen keine eindeutigen Kapsidstrukturen zu entdecken. Statt dessen fanden sich elektronendichte kreisförmige Aggregate, die als lokale Anhäufungen von Gag-Proteinen interpretiert wurden (Abb. 38D – H, offene Pfeilspitzen). Insbesondere bei der Mutante pHSRV2-M97 R50A schienen solche lokalen Ansammlungen von Gag-Proteinen auch im Zellkern gehäuft aufzutreten (Abb. 38G - H).

Von der Substitutionsmutante im FFV Gag-Protein, pChatul-3 W38A, wurden ebenfalls elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Als Kontrolle wurden auch eine mit dem Wildtypus pChatul-3 transfizierte Zellkultur untersucht. Auf den Aufnahmen der Wildtypuskontrolle fanden sich im Zytoplasma wieder die deutlichen ringförmigen Viruskapside, ebenso wie sich abschnürende und bereits freigesetzte Viruspartikel mit den prominenten Spikes des FFV Hüllproteins (Abb. 39A – C).

Die Substitutionsmutante W38A dagegen konnte keine Kapside mehr ausbilden, statt dessen fanden sich wieder die bereits im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen elektronendichten kreisförmigen Aggregate (Abb. 39D – F). Wie bereits bei der PFV Gag-Mutante R50A beobachtet, waren auch hier eine deutliche Anhäufung dieser Aggregate in den Zellkernen der transfizierten Zellen festzustellen.

4. DISKUSSION

Foamyviren heben sich von den Orthoretroviren durch zahlreiche Besonderheiten ihrer Genomorganisation, der Proteinexpression und des Replikationszyklus ab (Kapitel 1.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei exklusive Merkmale der Foamyviren, die Gag unabhängige Pol-Expression und die ungewöhnliche Struktur des Gag-Proteins, in ihren Auswirkungen auf die Morphogenese und Zusammensetzung foamyviraler Partikel näher untersucht.

4.1. GAG/POL-ZUSAMMENSETZUNG FOAMYVIRALER VIRUSPARTIKEL AM BEISPIEL VON PFV

Retrovirale Kapside werden durch das Strukturprotein Gag aufgebaut, welches auch die Hauptmasse der Proteine in retroviralen Virionen stellt (vgl. Abb. 1A, Vogt 1997c). Die viralen Enzyme, Produkte des Pro- und des Pol-Gens, werden dagegen nur in geringerer Menge benötigt. Für die Bildung infektiöser Partikel sind folglich sehr unterschiedliche Mengen der Genprodukte eines Retrovirus nötig. Bei Orthoretroviren werden die Produkte der *pro/pol*-Gene stets von einer kompletten prägenomischen mRNA als Gag/Pol-Vorläuferprotein translatiert. Bisher wurden weder gespleißte mRNAs noch Sequenzen für einen internen ribosomalen Translationsstart (IRES = internal ribosomal entry sites) für die *pro/pol*-Gene nachgewiesen. Während der Translation ungespleißter, das volle Genom umfassender mRNAs kommt es im *gag*-ORF entweder zu einem ribosomalen Leserasterwechsel oder zu einer Unterdrückung des Stop-Kodons (vgl. Kapitel 1.1.2, Übersicht in Vogt 1997c). Beide Mechanismen führen zur Bildung von Gag/Pol-Fusionsproteinen, welche in die viralen Partikel eingebaut werden. Die Häufigkeit der Synthese eines Gag/Pol-Fusionsproteins entspricht der statistischen Wahrscheinlichkeit, mit der ein Leserasterwechsel bzw. eine Unterdrückung des Stop-Kodons durch den zellulären Translationskomplex erfolgt. Sie liegt bei etwa 1 Gag/Pol-Fusionprotein pro 10 – 20 translatierten Gag-Proteinen (Jamjoom et al. 1977, Oppermann et al. 1977, Hayman 1978). Diese gekoppelte Translation von Gag und Gag-Pol ermöglicht eine einfache und effektive Regulation der Syntheserate der beiden viralen Genprodukte. Es wird genügend Gag-Protein für die Partikelmorphogenese hergestellt und gleichzeitig die Wirtszelle nicht mit den in weit geringerer Zahl benötigten enzymatischen Proteinen des *pro/pol*-ORFs überladen. Ein Überschuß an Produkten des *pol*-Gens würde nicht nur eine Verschwendung der zellulären Ressourcen bedeuten, sondern könnte auch toxisch auf die Wirtszelle wirken (Orlova et al. 2003). Außerdem ist die effektive Verpackung der viralen Enzyme in das Virion durch die passive Kopplung an das

Gag-Protein sichergestellt (vgl. Swanstrom und Wills 1997). Die Einbindung der viralen Enzyme in ein Fusionsprotein verhindert auch eine frühzeitige Aktivierung der enzymatischen Aktivität der Pol-Proteine vor dem Einbau in das virale Kapsid (vgl. Swanstrom und Wills 1997). So bewirkt eine Überexpression des Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins eine vorzeitige Aktivierung der Protease und eine frühzeitige Prozessierung der viralen Proteine (Weaver et al. 1990, Park und Morrow 1991, Karacostas et al. 1993). Manipulationen der Balance zwischen Gag- und Gag/Pol-Bildung führen außerdem zu einer veränderten Kapsidmorphologie und Bildung nicht-infektiöser Viruspartikel (Felsenstein und Goff 1988, Shehu-Xhilaga et al. 2001, 2002). Die Gag-Pol-Fusionsproteine verschiedener Retroviren (HIV-1, MLV, ASLV) sind nicht in der Lage, selbständig die Bildung eines Kapsids zu initiieren, sondern benötigen dafür die Koexpression des Gag-Proteins (Karacostas et al. 1993, Smith et al. 1990, 1993, Srinivasakumar et al. 1995). Auch bei Retrotransposons von Hefen führen geringfügige Manipulationen des Gag/Pol-Syntheseverhältnisses zu einer massiven Herabsetzung der Infektiosität (Xu und Boeke 1990, Dinman und Wickner 1992, Kawakami et al. 1993). Die ausbalancierte Expression von Gag und Gag-Pro/Pol-Fusionsproteinen ist folglich unbedingt notwendig für eine korrekte Partikelmorphogenese.

Die veröffentlichten Angaben zum Gehalt an Gag- und Pro/Pol-Molekülen in orthoretroviralen Partikeln beruhen auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen an aufgereinigten Viruspartikeln. Anhand der ermittelten Größe und Form der Viruskapside wurde die Anzahl der am Aufbau beteiligten Gag-Moleküle berechnet und daraus indirekt über das Syntheseverhältnis von Gag zu Gag/Pol-Fusionsproteinen auf die Anzahl inkorporierter Pol-Moleküle geschlossen. Für RSV wurden auf diese Weise 1200 Gag-Moleküle pro virusähnlichem Partikel (VLP = „virus like particle“), bzw. 1500 Gag-Moleküle pro infektiösem Virion berechnet (Yu et al. 2001, Vogt und Simon 1999). Die Differenz lässt sich aus sterischen Unterschieden zwischen dem nur aus Gag-Molekülen zusammengesetzten VLP und dem infektiösen Virion erklären (Yu et al. 2001). Eine Studie an unreifen Virionen von M-PMV schloss auf 1900 – 2100 Gag-Moleküle pro Viruspartikel (Parker et al. 2001). Für HIV-1 wurden 1900 – 2100 CA-Moleküle berechnet, die ein Kapsid aufbauen (Wilk et al. 2001b, Briggs et al. 2003). Diese Studien wurden an den Kapsiden reifer HIV-1 Virionen durchgeführt, bei denen das Gag-Molekül bereits in MA, CA und NC prozessiert vorliegt. Eine Untersuchung an intakten unreifen HIV-1 Viruspartikeln kam allerdings auf die deutlich höhere Zahl von etwa 5000 Gag-Vorläuferproteinen, die am Aufbau eines Viruspartikels beteiligt sind (Briggs et al. 2004). In der gleichen Studie wurden für reife HIV-1 Virionen etwa 1000 – 1500 am Kapsidaufbau beteiligte CA-Untereinheiten kalkuliert (Briggs et al. 2004). Die Autoren erklärten die Differenz mit den deutlichen morphologischen Veränderungen, die mit der Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins einhergehen. Nur ein Teil der CA-

Untereinheiten wäre demnach am Aufbau des reifen Kapsides beteiligt, die übrigen Untereinheiten würden eventuell eine Verbindung zu den weiterhin an der Membran verankerten MA-Untereinheiten herstellen. Eine weitere Studie an HIV-1 kalkulierte etwa 4000 MA-Einheiten pro Virion (Benjamin et al. 2005). In allen elektronenmikroskopischen Studien wurde auf die Heterogenität retroviraler Viruspartikel in Größe und Form verwiesen (Parker et al. 2001, Briggs et al. 2003). Die Anzahl an Strukturproteinen, die am Aufbau eines retroviralen Partikels beteiligt sind, dürfte also pro Partikel stark schwanken und zwischen 2000 – 5000 Gag-Molekülen liegen. Die Kalkulation der im Virion befindlichen Pol-Moleküle erfolgte bei all diesen Studien nur indirekt über das bekannte Syntheseverhältnis von etwa 10 - 20 Gag-Proteinen zu einem Gag/Pol-Fusionsprotein. Je nach Studie würde also ein orthoretrovirales Virion 100 bis 500 Pol-Moleküle enthalten (vgl. Briggs et al. 2004). Da sowohl Protease wie auch Reverse Transkriptase der bisher untersuchten Retroviren funktionale Homo- oder Heterodimere bilden (Übersicht in Telesnitsky und Goff 1997), würden nach diesen Berechnungen pro Virion 50 bis 250 funktionale Einheiten der retroviralen Enzyme vorhanden sein. Es konnte keine publizierte Untersuchung gefunden werden, in der auf einem direkten Weg der Gehalt an Pol-Proteinen in retroviralen Virionen ermittelt worden wäre.

Bei allen Foamyviren erfolgt die Translation des Pro/Pol-Proteins unabhängig von Gag von einer eigenen, gespleißten mRNA (Bodem et al. 1996, Enssle et al. 1996, Jordan et al. 1996, Löchelt und Flügel 1996, Yu et al. 1996, Holzschu et al. 1998, Lecellier et al. 2002, vgl. Kapitel 1.2.2 und 1.3.4). Somit kann der Gag/Pol-Gehalt in den Viruspartikeln nicht wie bei Orthoretroviren über gekoppelte Translation und Inkorporation von Gag- und Gag-Pol-Fusionsproteinen reguliert werden. Da die Bildung infektiöser Virionen bei Orthoretroviren abhängig von einem ausgewogenen Gag/Pol-Syntheseverhältnis ist (siehe oben), stellt sich die Frage, wie im Fall der Foamyviren eine ausgewogene Gag/Pol-Zusammensetzung der Viruspartikel gewährleistet wird. Ein erster Schritt zur Klärung dieser Frage war die Untersuchung des tatsächlichen molekularen Verhältnisses von Gag- und Pol-Proteinen in foamyviralen Virionen.

Die biochemische Untersuchung des relativen Gehaltes an Gag- und Pol-Proteinen in PFV Virionen in dieser Arbeit ergab ein Verhältnis von 16 Gag-Molekülen zu einem p85^{PR/RT}-Molekül sowie 10 Gag-Molekülen pro p40^{IN}-Molekül (Tab. 4, Kapitel 3.1.5.). Die Gag/Pol-Zusammensetzung von PFV Partikeln entspricht damit den angenommenen stöchiometrischen Verhältnissen in orthoretroviralen Partikeln. Aufgrund theoretischer Überlegungen hatte man bislang einen wesentlich geringeren Pol-Anteil in foamyviralen Partikeln angenommen. Der Replikationszyklus der Foamyviren ähnelt in vielen Punkten eher dem der Hepadnaviren als dem der Orthoretroviren (Übersicht in Linial 1999, Rethwilm

2003). So findet die reverse Transkription des Genoms bei Foamy- und Hepadnaviren noch in der Produzentenzelle zu einem späten Zeitpunkt des Replikationszyklus statt (Foamyviren: Moebes et al. 1997, Yu et al. 1999, Roy et al. 2003, Übersicht für Hepadnaviren: Seeger und Hu 1997). Orthoretroviren dagegen führen die reverse Transkription ihres Genoms nach Eintritt in eine Zielzelle zu einem frühen Zeitpunkt des Replikationszyklus aus (Übersicht in Telesnitsky und Goff 1997). Im Gegensatz zu Orthoretroviren inkorporiert der Prototyp der Hepadnaviren, das Hepatitis B-Virus, in seine Viruspartikel nur ein bis zwei Moleküle des RT-Enzyms (P-Protein, Bartenschlager und Schaller 1992, Böttcher et al. 1997, Conway et al. 1997). Dies spricht für eine höhere Effizienz des RT-Schrittes durch den vorgezogenen Zeitpunkt der Reversen Transkription und daher für eine geringere Zahl notwendiger RT-Moleküle pro Viruspartikel als bei Orthoretroviren. Ein ähnlich effizienter RT-Schritt wurde auch bei Foamyviren vermutet, da *in vitro*-Studien für die PFV RT/RNase eine höhere Aktivität als für die HIV-1 RT/RNase ermittelt haben (Rinke et al. 2002, Boyer et al. 2004). Im Vergleich zu den meisten Orthoretroviren erfolgen bei Foamyviren außerdem eine sehr beschränkte Anzahl an Prozessierungsschritten durch die virale Protease, so dass auch hierfür eine geringere Anzahl an PR-Untereinheiten notwendig erscheinen. Entgegen diesen theoretischen Überlegungen wurde aber ein Gag/Pol-Verhältnis in PFV Partikeln ähnlich der Zusammensetzung von orthoretroviralen Partikeln ermittelt. Legt man die publizierten Zahlen von 2000 – 5000 Gag-Molekülen pro orthoretroviralem Virion (siehe oben) auch für Foamyviren zugrunde, würden PFV Virionen bei einem Mengenverhältnis von 10 bis 16 Gag-Molekülen pro Pol-Molekül etwa 100 bis 300 Pol-Proteine enthalten. Die Ursache für die hohe Anzahl an Pol-Molekülen sowohl in foamyviralen wie auch in orthoretroviralen Viruspartikeln ist wahrscheinlich in der geringen Effizienz der retroviralen Enzyme zu suchen. So benötigt HIV-1 für die erfolgreiche reverse Transkription seines Genoms etwa 20 bis 30 funktionale RT-Einheiten (Julias et al. 2001). Die retrovirale Integrase bindet sehr unspezifisch an Nukleinsäuren, so dass eventuell ein hoher Überschuss an diesem Enzym nötig ist, um die Integration des viralen Genoms nach Infektion einer Zelle sicherzustellen (Brown 1997). Sowohl die orthoretroviralen wie auch die foamyviralen Pro/Pol-Produkte sind nur als Homo- oder Heterodimere enzymatisch aktiv (Übersichten in Telesnitsky und Goff 1997, Brown 1997, Flügel und Pfrepper 2003). Für einige retrovirale Proteasen konnte ein kritischer Schwellenwert ihrer lokalen Konzentration festgestellt werden, oberhalb dessen sie erst ihre Aktivität entfalten (Vogt 1997b). Es ist anzunehmen, dass für alle drei retroviralen Enzyme eine minimale Konzentration erforderlich ist, oberhalb derer erst eine Multimerisierung eingeleitet wird. Eine geringe enzymatische Aktivität und die Notwendigkeit einer Mindestkonzentration zur Multimerisierung könnten den hohen Gehalt an Pol-Produkten sowohl in ortho- als auch in foamyviralen Viruspartikeln erklären.

Die große Anzahl an Pol-Molekülen pro PFV Virion wirft die Frage nach ihrem Einbau in die Viruspartikel auf. Die Inkorporation von Pol erfolgt über die Bindung an die prägenomische RNA, die wiederum mit den Gag-Proteinen interagiert und in die Partikel verpackt wird (Heinkelein et al. 2002b, Peters et al. 2005). Auf der prägenomischen RNA wurde je ein <100 Bp langer Sequenzabschnitt im U5-Bereich und ein etwa 1 kb langer Sequenzabschnitt am 3'-Ende des *pol*-ORF identifiziert, die minimal notwendig sind für eine effektive Inkorporation von Pol in PFV Partikel (Peters et al. 2005). Eine Rekrutierung von über 100 Pol-Molekülen durch Bindung an diese beiden kurzen Bereiche der prägenomischen RNA ist kaum vorstellbar. Möglicherweise erfolgt nach der initialen Bindung einiger Pol-Moleküle an die prägenomische RNA die Anbindung weiterer Pol-Moleküle über eine Pol-Pol-Interaktion. Für eine Klärung dieser Frage bedarf es weiterer Untersuchungen zur Morphogenese foamyviraler Partikel.

Es ist anzunehmen, dass sich das stöchiometrische Verhältnis von 10 - 16 Gag-Proteinen zu einem Polprotein in den Viruspartikeln auch im Syntheseverhältnis der beiden Proteine widerspiegelt. Bisher existieren nur wenige Hinweise auf einen möglichen Mechanismus zur Regulation des Syntheseverhältnisses von Gag zu Pro/Pol bei Foamyviren. In infizierten Zellen lässt sich die gespleißte *pol*-spezifische mRNA zwar in großen Mengen nachweisen, jedoch wird sie von der Menge an prägenomischer mRNA noch übertroffen (Holzschu et al. 1998). Die Möglichkeit besteht, dass anstatt der Regulation auf Translationsebene durch Generierung eines Fusionsproteins nach Art der Orthoretroviren, Foamyviren ihr Syntheseverhältnis von Gag zu Pol auf Ebene der Transkription und/oder mRNA-Stabilität regulieren. So konnte ein regulativer Einfluss der untranslatierten Bereiche im LTR von PFV auf die Gag- und Pol-Expression nachgewiesen werden (Heinkelein et al. 2000, Russell et al. 2001). Auch weist die *pol*-spezifische mRNA eine ungewöhnlich lange 5' untranslatierte Region auf, die möglicherweise eine verminderte Stabilität der mRNA und/oder eine weniger effiziente Translation an den Ribosomen bewirkt (Löchelt und Flügel 1996, Enssle et al. 1996). Ein direkter Einfluss von Gag auf die Expressionsrate von Pol kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da von einer proviralen Mutante mit mutiertem Gag-Startkodon mehr Pol-Protein gebildet wurde als vom Wildtyp (Baldwin und Linial 1999).

Der Vergleich der beiden Pol-Untereinheiten ergab einen relativen Anteil von einem p85^{PR/RT}- zu zwei p40^{IN}-Molekülen pro Viruspartikel (Tab. 4, Kapitel 3.1.5.). Diese Diskrepanz zwischen den beiden Untereinheiten ist ein unerwartetes Ergebnis, da die Inkorporation von Pol nur als Vorläuferprotein p127^{Pol} erfolgt (Peters et al. 2005). Einzeln exprimierte p85^{PR/RT}- und p40^{IN}-Untereinheiten werden dagegen nicht in PFV Partikel eingebaut (Peters et al. 2005). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von inkorporierten p85^{PR/RT}- und p40^{IN}-Untereinheiten könnte ein frühzeitiger RT-Schritt während der Partikelmorphogenese bieten. In einem solchen Modell würde die initiale

autoproteolytische Spaltung von Pol noch während der laufenden Kapsidmorphogenese erfolgen. Die RT-Untereinheit würde die Umschreibung der prägenomischen RNA in DNA beginnen und sich eventuell noch vor endgültiger Fertigstellung des Kapsids von dem viralen Genom wieder ablösen und nicht aktiv in das Virion eingebaut werden. Für eine Aktivität der viralen Protease bereits während des Partikelzusammenbaus spricht, dass die Prozessierung von Gag durch die virale Protease erfolgt und notwendig für die Bildung infektiöser Partikel ist (Enssle et al. 1997, Giron et al. 1997). Bislang konnte aber das kleine C-terminale Prozessierungsprodukt von Gag, das p3-Protein, nicht in PFV Virionen nachgewiesen werden (Konvalinka et al. 1995, Morozov et al. 1997, Fischer et al. 1998). Eine frühzeitige Initiierung des RT-Schrittes noch während des Kapsidzusammenbaus wäre eine weitere exklusive Besonderheit der Foamyviren. Auch bei Hepadnaviren mit einem RT-Schritt im späten Teil des Replikationszyklus wird die RT-Aktivität erst im fertigen Kapsid gestartet (Nassal 1992, Wang und Seeger 1992). Das berechnete Verhältnis von etwa 2 IN- zu einer PR/RT-Untereinheit könnte aber durchaus auch innerhalb der Schwankungsbreite des methodischen Fehlers liegen (siehe unten).

Das Verhältnis des Gag-Vorläuferproteins p71 zu dem Prozessierungsprodukt p68 in PFV Virionen wurde mit etwa 1 : 4 bestimmt (Tab. 4, Kapitel 3.1.5.). Die prozessierte Form des Gag-Proteins p68 ist folglich das dominierende Strukturelement infektiöser PFV Virionen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, die zeigen konnten, dass von dem unprozessierten Vorläuferprotein p71 nur unvollständige, replikationsinkompetente Kapside gebildet werden (Enssle et al. 1997, Fischer et al. 1998, Zemba et al. 1998). Die Expression eines PFV Gag p68-Proteins ist dagegen ausreichend für die Bildung von normalen viralen Partikeln, deren Infektiosität gegenüber dem Wildtyp allerdings deutlich reduziert ist (Enssle et al. 1997). Für die Bildung infektiöser PFV Virionen scheint also ein ausgewogenes stöchiometrisches Verhältnis von etwa vier prozessierten p68^{Gag}-Molekülen zu einem unprozessierten Vorläuferprotein p71^{Gag} essentiell zu sein (Tab. 4, Kapitel 3.1.5.). Das C-terminale Prozessierungsprodukt p3 konnte bislang in PFV Virionen nicht nachgewiesen werden (Konvalinka et al. 1995, Morozov et al. 1997, Fischer et al. 1998). Foamyvirale Kapside scheinen also hauptsächlich aus dem prozessierten p68^{Gag}-Protein zusammengesetzt zu sein, doch leistet möglicherweise das unprozessierte p71^{Gag}-Protein einen wichtigen Beitrag zur Morphologie und Stabilität des Kapsids.

Das in dieser Arbeit verwendete System zur biochemischen Bestimmung der relativen Proteinanteile in retroviralen Partikeln ist nach Kenntnis des Autors in dieser Form noch nicht verwendet worden. Eine ausführliche Diskussion dieser Methode erscheint deshalb notwendig, um die erzielten Ergebnisse beurteilen zu können.

Als grundsätzliche Bedingung für eine korrekte Bestimmung der Proteinverhältnisse in den PFV Virionen müssen die verwendeten monoklonalen AK gleiche Bindungsaffinitäten an die zu vergleichenden viralen und rekombinanten Proteine haben. Deshalb wurde jeweils der vollständige p85^{PR/RT}- und p40^{IN}-Anteil des Pol-Proteins in einem bakteriellen Expressionsvektor exprimiert. Für die Gag-Proteine waren die Voraussetzung etwas komplexer. Für die Detektion der beiden Gag-Varianten, p71 und p68, stand nur ein monoklonaler AK zur Verfügung. Die Lage des Bindungsepitops im Gag-Protein war zunächst nicht genau bekannt (Heinkelein et al. 2002a, Heinkelein pers. Mitteilung). In den Untersuchungen an den N-terminalen Deletionsmutanten konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Bindungsepitop am N-Terminus des Proteins liegen musste (vgl. Kapitel 3.2.3.). Sowohl das Vorläuferprotein p71^{Gag}, die prozessierte Form p68^{Gag} als auch das C-terminal verkürzte rekombinante Gag-Protein p71^{Gag-His} sollte also gleichermaßen das AK-Epitop enthalten. Durch den Affinitätstag am C-Terminus der rekombinanten Proteine wurde sichergestellt, dass nur vollständige Proteine aufgereinigt wurden. Die Auftrennung und Analyse der viralen und rekombinanten Proteine erfolgte zudem unter denaturierenden Bedingungen, so dass die Tertiärstruktur der Proteine keine Rolle spielte. Die verwendeten monoklonalen Antikörper sollten folglich mit gleicher Affinität an die viralen und rekombinanten Proteine binden.

Der relative Anteil an Gag- und Pol-Proteinen schwankte stark zwischen den einzelnen Gradientenfraktionen. Dies resultierte in hohen Standardabweichungen vom Mittelwert (vgl. Tab. 4, Kapitel 3.1.5.). In jedem Gradienten waren in durchschnittlich drei Fraktionen (12 Gradienten mit 37 ausgewerteten Fraktionen, vgl. Kapitel 3.1.4.) deutliche Gag- und Pol-Proteinbanden nachweisbar, die sich für eine anschließende Auswertung eigneten (zu den Kriterien vgl. Abb. 12, Kapitel 3.1.4.). Möglicherweise konzentrierten sich infektiöse PFV Partikel aber nur in einer Fraktion eines Gradienten, während sich in den Nebenfraktionen unvollständige Kapside mit abweichender Proteinzusammensetzung ansammelten. Dies wäre eine biologische Ursache als Erklärung für die beobachteten hohen Schwankungen in der relativen Proteinzusammensetzung. Eine getrennte Auswertung und anschließender Vergleich der Mittelwerte von Fraktionen mit hohem infektiösem Titer gegenüber Fraktionen mit niedrigem Titer konnte allerdings keinen Beweis für eine solche Annahme bringen (Tab. 5, Kapitel 3.1.5.). Zudem ergab sich eine gute Korrelation zwischen dem infektiösen Titer einer Fraktion und dem berechneten Gehalt an Gag- und Polprotein (Abb. 14, Kapitel 3.1.5.). Die ermittelte mittlere Dichte der Viruspartikel von 1,12 g/ml stimmt ebenfalls gut mit den Angaben anderer Studien an PFV überein (Morozov et al. 1997, Wilk et al. 2001a). Die beobachtete Verteilung der viralen Proteine auf zwei bis vier Fraktionen eines Gradienten entspringt also eher einer Normalverteilung um eine mittlere Dichte, die sich aus den unterschiedlichen Startpunkten der viralen Partikel bei ihrer Wanderung durch den

Dichtegradienten ergaben. Aus methodischen Gründen musste zwischen aufgelagertem Überstand und Dichtegradient ein Volumenverhältnis von 1 : 5 gewählt werden. Eine bessere Konzentration der viralen Partikel im Dichtegradienten hätte sich aus einem günstigerem Volumenverhältnis von etwa 1 : 10 ergeben.

Eine breite Streuung der ermittelten Gag-Moleküle pro Partikel um den Mittelwert wurde auch bei Studien orthoretroviraler Partikel mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen festgestellt (Parker et al. 2001, Briggs et al. 2003). Eine Ursache dafür könnte in der festgestellten Größenheterogenität orthoretroviraler Partikel liegen (Parker et al. 2001, Briggs et al. 2003), die auch bei foamyviralen Partikeln beobachtet wurde (Wilk et al. 2001a). Eine solche natürliche Schwankungsbreite im Aufbau retroviraler Partikel könnte auch die in dieser Arbeit aufgetretenen hohen Standardabweichungen erklären. Daneben sind aber auch die bei jedem Schritt der Auswertung zwangsläufig aufgetretenen Messungenauigkeiten zu berücksichtigen, die sich im Verlauf der Analyse aufsummieren und so die hohen Streuung um die Mittelwerte erklären könnten. Dies ist für die Aussagekraft der Methode zu berücksichtigen.

In der Fragestellung ging es um Aussagen im Zehnerpotenzbereich, ob in einem PFV Partikel pro Pol-Molekül ein, zehn oder hundert Gag-Moleküle vorhanden sind. In diesem Rahmen kann das Resultat dieser Studie, dass in PFV Virionen ein den Orthoretroviren vergleichbares Gag/Pol-Verhältnis von 10 – 20 : 1 vorgefunden wird, als aussagekräftig angesehen werden. In Hinsicht auf die völlig andersartige Synthese der Gag- und Pol-Proteine bei Foamyviren im Vergleich zu Orthoretroviren ist dieser Befund bemerkenswert. Anders als die Hepadnaviren, die nur wenige Moleküle ihres RT-Enzyms pro Viruspartikel einbauen (Bartenschlager und Schaller 1992, Böttcher et al. 1997, Conway et al. 1997), scheinen dagegen alle Retroviren für eine erfolgreiche Replikation eine große Anzahl an Pro- und Pol-Molekülen in die Viruspartikel rekrutieren zu müssen. Eine mögliche Ursache ist die geringere enzymatische Aktivität der retroviralen RT (s.o.). Weitere Forschung zum Replikationszyklus und der viralen Enzymaktivität sind nötig, um die unterschiedlichen Strategien der beiden Virusgruppen zu erklären.

Weiterhin ergab die Untersuchung, dass infektiöse PFV Partikel hauptsächlich aus dem Gag-Prozessierungsprodukt p68 aufgebaut werden. Dieses Ergebnis wird durch funktionale Analysen am PFV Gag-Protein unterstützt (Enssle et al. 1997, Fischer et al. 1998, Zamba et al. 1998). Allerdings ist auch das Vorläuferprotein p71 als essentielle Strukturkomponente zu etwa 25% an dem Aufbau des PFV Kapsids beteiligt (Tab. 4, Kapitel 3.1.5.). Ungeklärt ist die Frage nach dem Verbleib und einer eventuellen Funktion des C-terminalen Prozessierungsproduktes p3^{Gag}, das bislang nicht als Bestandteil der PFV Virionen nachgewiesen werden konnte (Konvalinka et al. 1995, Morozov et al. 1997, Fischer et al. 1998). Sollte sich der in dieser Untersuchung festgestellte quantitative Unterschied an

inkorporierten Pol-Untereinheiten p85^{PR/RT} und p40^{IN} bestätigen, wäre dies ein Hinweis auf eine eventuelle frühzeitige Initiierung des RT-Schrittes bei Foamyviren noch während des Kapsidzusammenbaus. Ein solcher frühzeitiger RT-Schritt wäre eine weitere Besonderheit der Foamyviren, die sie sowohl von den Orthoretroviren als auch den Hepadnaviren unterscheiden würde. Ein weiteres Feld für zukünftige Forschung ist die Frage, wie Foamyviren die Syntheseraten von Gag- und Pol-Proteinen regulieren.

4.2. FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG VON PFV GAG FÜR MORPHOGENESE UND FREISETZUNG VON VIRUSPARTIKELN

Wie in den einleitenden Kapiteln erläutert, kann die Funktion des Strukturproteins Gag im Reproduktionszyklus der Orthoretroviren kurzgefasst als „particle making machinery“ beschrieben werden (Dickson et al. 1984, vgl. Kapitel 1.3.2.). Die Expression des Strukturproteins in Wirtszellen *per se* ist ausreichend, um eine Freisetzung virusähnlicher Partikel zu erreichen. Das Strukturprotein kann sich folglich autonom in einem Prozess der Selbstorganisation zu intakten Viruskapsiden zusammenbauen, die anschließend unter Ausnutzung der zellulären Exportmaschinerie aus der Wirtszelle freigesetzt werden. Dies gilt für alle bislang untersuchten Orthoretroviren.

Orthoretrovirale Gag-Proteine werden nach der Freisetzung des Viruspartikels durch die virale Protease stets in die drei Untereinheiten Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidprotein prozessiert. Dem am N-Terminus von Gag liegendem Matrixanteil konnten einige wichtige Funktionen für den Verlauf der Partikelmorphogenese zugeordnet werden:

- Signalfunktion für den intrazellulären Transport zum Ort des Kapsidzusammenbaus (u. a. Rhee und Hunter 1990, Freed et al. 1994, Choi et al. 1999, Ono et al. 2000, Ono und Freed 2004);
- Verankerung in zelluläre Membranen (u. a. Zhou et al. 1994, Ono und Freed 1999).
- Inkorporation des viralen Glykoproteins in das Virion (u. a. Yu et al. 1992, Dorfman et al. 1994, Cosson 1996).

In dem einführenden Kapitel sind die einzelnen funktionellen Abschnitte des Matrixproteins und ihre Aufgaben während der Partikelmorphogenese bereits vorgestellt worden (vgl. Kapitel 1.3.2.).

Im Gegensatz zu der kanonischen Prozessierung orthoretroviraler Gag-Proteine erfolgt bei foamyviralen Gag-Proteinen zunächst nur ein einziger Prozessierungsschritt am C-Terminus des Vorläuferproteins (Giron et al. 1997, Morozov et al. 1997, Pfrepper et al. 1999). Auch in den reifen PFV Virionen lassen sich nur das Vorläuferprotein p71^{Gag} und das

Prozessierungsprodukt p68^{Gag} nachweisen (Giron et al. 1997, Morozov et al. 1997, Fischer et al. 1998). Eine weitergehende Prozessierung des PFV Gag-Proteins erfolgt erst nach dem Eintritt des Virions in eine neue Wirtszelle (Lehmann-Che et al. 2005). Damit fehlt eine klare strukturelle Aufteilung der foamyviralen Gag-Proteine in verschiedene Untereinheiten vergleichbar der bei Orthoretroviren. Während der C-Terminus des PFV Gag-Proteins mit den drei funktionellen GR-Boxen zu Beginn dieser Arbeit recht gut charakterisiert war (u. a. Schliephake und Rethwilm 1994, Yu et al. 1996), war über die Funktionen des N-Terminus nur wenig bekannt. Analog zu den Funktionen des Matrixproteins der Orthoretroviren wurde in diesem Teil des Gag-Proteins ein zelluläres Transportsignal vermutet (Eastman und Linal 2001), sowie ein Bereich, der eine zur Partikelfreisetzung essentielle Interaktion mit dem viralen Glykoprotein vermittelt (Wilk et al. 2001a). Außerdem gab es Hinweise auf eine Gag-Gag Interaktionsdomäne in den N-terminalen 200 Aminosäuren des PFV Gag-Proteins (Tobaly-Tapiero et al. 2001).

Durch die Analyse einer Reihe von Deletionsmutanten wurden in dieser Arbeit einzelne für die Partikelmorphogenese von PFV essentielle Bereiche im N-Terminus von Gag eingegrenzt. Die Aufgaben dieser Sequenzabschnitte im Morphogeneseprozess konnten durch gezielte Substitution konservierter Aminosäuren mit Alanin näher charakterisiert werden.

Die sukzessive Deletion des PFV Gag-Proteins von seinem C-Terminus her zeigte, dass die As 1 – 297 des Proteins für eine Freisetzung von partikelassoziiertem Gag-Protein ausreichend sind (Abb. 17, Kapitel 3.2.1.). Diese Fähigkeit hat der N-terminale Teil des PFV Gag-Proteins mit den orthoretroviralen Matrix-Proteinen von RSV und SIV gemeinsam, die ebenfalls autonom den Export des viralen Proteinmaterials vermitteln können (Weldon und Wills 1993, Gonzales et al. 1993). Die Freisetzung der verkürzten PFV Gag-Proteine war weiterhin obligat an die Koexpression des PFV Glykoproteins gebunden (Abb. 18, Kapitel 3.2.1.). Die vermutete Interaktionsdomäne mit dem foamyviralen Glykoprotein muss folglich in den ersten 300 Aminosäuren des PFV Gag-Proteins lokalisiert sein. Das verkürzte Gag-Protein der Mutante pMC60 Δ 297 baute allerdings keine Viruskapside mehr auf (Abb. 37, Kapitel 3.2.9.). Es lagerte sich aber zu Proteinaggregaten zusammen, die noch immer die notwendigen Schritte zur Freisetzung membranumhüllter Partikel vermitteln konnten. Für eine effektive Freisetzung dieser Pseudopartikel war neben der essentiellen Interaktion mit dem viralen Glykoprotein auch das LI-Motiv im PFV Gag-Protein zwischen Aminosäure 284 und 288 erforderlich (vgl. Abb. 15, Kapitel 3.2.1., Stange et al. 2005, Patton et al. 2005). Die Deletion dieses Motivs in der Mutante pMC61 Δ 276 hatte eine drastische Reduktion des freigesetzten partikulären viralen Proteinmaterials zur Folge (Abb. 17, Kapitel 3.2.1.). Weitergehende Deletionen des PFV Gag-Proteins brachten den zellulären Export von

viralem Proteinmaterial völlig zum Erliegen (Abb. 17, Kapitel 3.2.1.). Die Deletion des zweiten L-Motivs zwischen Aminosäure 298 und 301 übte dagegen keinen negativen Einfluss auf die Partikelfreisetzung aus, wie der Vergleich zwischen den Partikelpräparationen der Deletionskonstrukte pMC50 Δ 310 mit beiden L-Motiven und pMC60 Δ 297 mit nur noch dem LI-Motiv zeigte (Abb. 17, Kapitel 3.2.1.). Dieser Befund bestätigte das Ergebnis von Mutationsanalysen der L-Motive im PFV Gag-Protein (Stange et al. 2005). Nur das *PSAP*-Motiv hat die Funktion einer Late-Domäne im PFV Gag-Protein (LI, vgl. Abb. 15, Kapitel 3.2.1., Stange et al. 2005). Die Late-Domänen retroviraler Gag-Proteine vermitteln die Interaktion mit zellulären Proteinen des ESCRTI-Komplexes und schleusen auf diese Weise virale Partikel in die zelluläre Exportmaschinerie ein (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005, Übersicht in Freed 2002, Demirov und Freed 2004). Sowohl das potenzielle LII-Motiv mit der Aminosäureabfolge *PPPI* (As 298 – 301, vgl. Abb. 15, Kapitel 3.2.1.) als auch das potenzielle LIII-Motiv mit der Aminosäureabfolge *YEIL* (As 464 – 467, Stange et al. 2005, Patton et al. 2005) waren entgegen früherer Befunde für die Partikelfreisetzung entbehrlich (vgl. Patton et al. 2005).

Die schrittweise Deletion der GR-Boxen I-III am C-Terminus von PFV Gag konnte die Bedeutung dieser Sequenzabschnitte belegen. Während die Deletionen der GRII- und GRIII-Box zwar eine drastische Reduktion des infektiösen Titers bewirkten, waren in den Partikelpräparationen immer noch deutlich die beiden Prozessierungsprodukte p85^{PR/RT} und p40^{IN} des Pol-Proteins nachweisbar (Mutanten pMC53 Δ 594 und pMC52 Δ 544, Abb. 17, Kapitel 3.2.1.). Da die Rekrutierung von Pol in die Viruspartikel an den Einbau der prägenomischen RNA gekoppelt ist (Heinkelein et al. 2002b, Peters et al. 2005), kann der Nachweis von Pol als indirekter Beleg für die RNA-Inkorporation gewertet werden. Nach zusätzlicher Deletion der GRI-Box waren in der Partikelpräparation keine Pol-Banden mehr nachweisbar (vgl. Mutanten pMC51 Δ 482, Abb. 17, Kapitel 3.2.1.). Bei einer früheren Studie zur Rolle der GR-Boxen für die Nukleinsäurebindung und Pol-Inkorporation wurden provirale Konstrukte verwendet, in die Stop-Kodons vor die einzelnen GR-Boxen im *gag*-ORF eingefügt wurden (Stenbak und Linial et al. 2004). Dies setzte allerdings die zelluläre Expression von Pol deutlich herab (Stenbak und Linial et al. 2004). Dadurch war ein direkter, von der zellulären Expression unbeeinflusster Vergleich der Einbaurate von Pol in die viralen Partikel zwischen den verschiedenen Gag-Varianten nicht möglich (Stenbak und Linial et al. 2004). Die Verwendung separater Expressionskonstrukte für das Gag- und Pol-Protein in dieser Arbeit ermöglichte dagegen einen direkten Vergleich der Pol-Einbaurate in die Viruspartikel zwischen dem wildtypischem Gag-Protein und den verschiedenen Deletionskonstrukten. Die Ergebnisse untermauern, dass an der Bindung der genomischen Nukleinsäure und damit der indirekten Pol-Inkorporation in die Viruspartikel im wesentlichen

die GRI-Box des PFV Gag-Proteins beteiligt ist (Yu et al. 1996, Stenbak und Linial et al. 2004).

Die Integrität des N-Terminus von PFV Gag ist für die Morphogenese und den Export viraler Partikel von entscheidender Bedeutung. Alle in den ersten 200 Aminosäuren des N-Terminus vorgenommenen Deletionen brachten die Freisetzung von partikulärem viralem Proteinmaterial aus der Zelle zum Erliegen (Abb. 20, Kapitel 3.2.2. und Abb. 23, Kapitel 3.2.3.). Durch die schrittweise Analyse von Mutanten mit immer kleineren Deletionen im N-Terminus von PFV Gag ließen sich zwei für die Morphogenese und den Export viraler Partikel essentielle Proteinabschnitte in den ersten 200 As identifizieren. Ein Bereich umfasst den unmittelbaren N-Terminus des Gag-Proteins zwischen As 7 - 50, ein weiterer liegt in der Mitte des hypothetischen p33^{Gag}-Prozessierungsprodukts zwischen As 120 – 200 (vgl. Kapitel 3.2.3.).

Obwohl die N-terminal deletierten Gag-Proteine $\Delta 7-92$ bis $\Delta 7-199$ keinen Partikelexport mehr zeigten (Abb. 20, Kapitel 3.2.2.), bauten sie noch virale Kapside auf, die in ihrer Morphologie den Kapsiden des Wildtypus sehr ähnlich waren (Abb. 36, Kapitel 3.2.9.). Dagegen bildete eine Mutante mit einer kleineren Deletion keine Kapside mehr aus (pMC1 $\Delta 7-78$, vgl. Abb. 19, Kapitel 3.2.2.). Statt dessen fanden sich in den EM-Aufnahmen tubuläre Strukturen (Abb. 36, Kapitel 3.2.9.). Deletionen in Gag-Proteinen anderer Retroviren führten ebenfalls zur Bildung solcher tubulären Strukturen (Kräusslich et al. 1995, Morikawa et al. 2000). Offensichtlich waren die größeren Deletionen im PFV Gag-Protein beim Zusammenbau der Kapside tolerierbar, während kleinere Deletion sterische Zwänge schuf, die eine Ausbildung der Kapsidform unmöglich machten. Minimale Deletionen oder Substitutionen im HIV-1 MA-Protein führen ebenfalls häufig zu einem Abbruch der Partikelmorphogenese (u. a. Yuan et al. 1993, Freed et al. 1994, Morikawa et al. 1995, Übersicht in Kräusslich und Welker 1996). Dagegen erlauben größere Deletion im HIV-1 MA-Protein immer noch die Bildung von Kapsiden und eine Partikelfreisetzung (Wang et al. 1993, Lee und Linial 1994). Sogar die komplette Deletion des HIV-1 MA-Proteins ist tolerierbar und entsprechende Mutanten können infektiöse Viruspartikel produzieren, vorausgesetzt eine alternative Möglichkeit der Membranverankerung des Gag-Proteins wird gewährleistet (Reil et al. 1998). Auch im Fall von RSV kann die C-terminale Hälfte des MA-Protein komplett deletiert werden und trotzdem setzt die Mutante infektiöse Partikel frei (Nelle und Wills 1996). Im Fall der untersuchten PFV Gag-Mutanten $\Delta 7-92$ bis $\Delta 7-199$ konnte allerdings trotz Ausbildung von intrazellulären Kapsiden keine Partikelfreisetzung beobachtet werden (pMC11, pMC3 und -4 sowie pMC12, vgl. Abb. 20, Kapitel 3.2.2. und Abb. 36, Kapitel 3.2.9.). Dies deutet darauf hin, dass bei diesen Mutanten durch die Deletionen die für die Partikelfreisetzung notwendige spezifische

Interaktion von Gag mit dem FV Glykoprotein verhindert wurde. Durch Koexpression des wildtypischen Gag-Proteins konnten die deletierten PFV Gag-Proteine aber wieder in Viruspartikel eingebaut und exportiert werden (Abb. 20, Kapitel 3.2.2.). Dieser Befund bestätigte, dass diese Deletionsmutanten noch die Fähigkeit zur Gag-Gag Interaktion und damit zum Einbau in virale Kapside besaßen.

Der Abschnitt des PFV Gag-Proteins zwischen As 120 – 200 besteht aus einer regelmäßigen Abfolge hydrophober Aminosäuren. Computeranalysen der Aminosäuresequenz von PFV Gag belegten eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von ein oder zwei coiled-coil-Regionen in diesem Teil des Proteins (Tobaly-Tapiero et al. 2001, vgl. Abb. 40). Mit einem „coil-coiled“ wird die Ausbildung einer Superhelix zwischen zwei oder mehreren amphiphilen α -Helices bezeichnet. Innerhalb der Aminosäuresequenz dieser Helices kommt eine charakteristische sieben As lange repetitive Einheit vor (Heptade). An Position 1 und 4 einer jeden Heptade stehen dabei hydrophobe As, die eine Interaktion mit den weiteren α -Helices der Superhelix vermitteln (nach Lodish et al. 1995). Die Computeranalyse der Aminosäuresequenz weiterer foamyviraler Gag-Proteine ergab für die Gag-Proteine der Foamyviren von Primaten und dem Gag-Protein des felines Foamyvirus (FFV) ebenfalls eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Existenz von coiled-coil-Regionen in diesem Proteinabschnitt (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Abb. 40A und E sowie nicht gezeigte Daten). Dagegen ergab sich nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung eines coiled-coil-Motivs zwischen As 100 und 200 für die Gag-Proteine von EFV und BFV (Tobaly-Tapiero et al. 2001, Abb. 40F sowie nicht gezeigte Daten). Im PFV Gag-Protein dirigiert das zweite coiled-coil-Motiv zwischen Aminosäure 165 – 180 die viralen Kapside nach Zelleintritt an die MTOCs (Saib et al. 1997, Petit et al. 2003). Der Transport der Kapside erfolgt dabei mit Hilfe des Zytoskeletts. Eine direkte Interaktion zwischen dem PFV Gag-Protein und dem LC8-Protein, einem Bestandteil der leichten Ketten von Dynein, konnte nachgewiesen werden (Petit et al. 2003). Ob dieser Bereich auch eine Transportfunktion bei der Partikelmorphogenese erfüllt, ist noch nicht bekannt. Die Deletion der ersten potenziellen coiled-coil-Region zwischen Aminosäure 130 – 160 im PFV Gag-Protein verhinderte die Partikelfreisetzung und auf EM-Aufnahmen wurden keine viralen Kapside gefunden (Tobaly-Tapiero et al. 2001). In der Mutante pCHSRV2-M93 Δ 123-199 wurden beide potenziellen coiled-coil-Regionen deletiert (Abb. 40B, vgl. auch Abb. 22, Kapitel 3.2.3.). Diese Mutante setzte ebenfalls keine viralen Partikel mehr frei (Abb. 23, Kapitel 3.2.3.). In den EM-Aufnahmen ließen sich auch keine eindeutigen Kapside im Zytoplasma der transfizierten Zellen erkennen, gleichwohl noch kapsidähnliche Strukturen, die sich auch in intrazelluläre Kompartimente abschnürten (Abb. 37, Kapitel 3.2.9.). Dieser Befund steht in scheinbarem

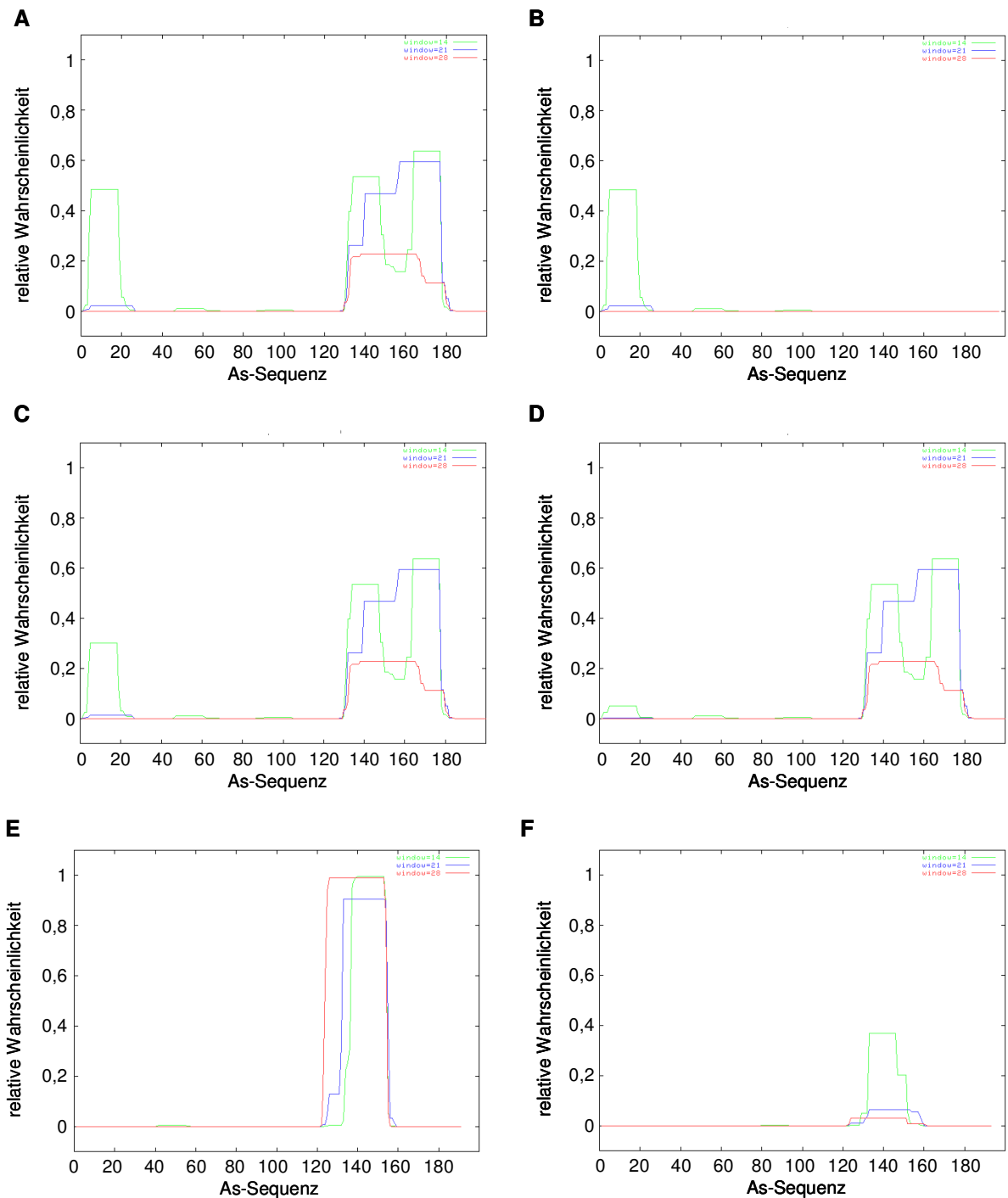


Abb. 40: Wahrscheinlichkeitsanalyse für die Ausbildung von coiled-coil-Motiven in FV Gag-Proteinen.

Aufgetragen wurde die relative Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung eines coiled-coil-Motivs in den ersten 200 Aminosäuren verschiedener FV Gag-Proteine. **(A)** PFV Gag wt. **(B)** PFV Gag Δ 123-199. **(C)** PFV Gag L17A. **(D)** PFV Gag L17S. **(E)** FFV Gag wt. **(F)** EFV Gag wt. Die Aminosäuresequenzen werden nach der Ausbildung einer typischen Heptade (Position 1 und 4: hydrophobe As, Position 2, 3, 5 – 7: hydrophile As) in drei unterschiedlichen Rastern (Raster von 14 As: Grün, 21 As: Blau, 28 As: Rot) überprüft und die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Superhelix im Vergleich zu bekannten Superhelices-Sequenzen berechnet (Programm Coils 2.2, Lupas et al. 1991, Lupas 1996, <http://www.ch.embnet.org/software/coils>).

Widerspruch zu den EM-Aufnahmen der Mutanten pMC4 Δ 7-179 und pMC12 Δ 7-179, bei denen der relevante Bereich des PFV Gag-Proteins zwischen As 123 – 199 ebenfalls teilweise oder ganz deletiert worden war. Bei beiden Mutanten ließen sich aber noch virale Kapside im Zytoplasma nachweisen (Abb. 36, Kapitel 3.2.9.). Wie im Fall der Mutante pMC1 Δ 7-78 schon ausgeführt, können kleinere Deletionen sterische Zwänge schaffen, die eine korrekte Kapsidmorphogenese unmöglich machen. Die Befunde aus den EM-Aufnahmen der Mutanten pMC4 Δ 7-179 und pMC12 Δ 7-179 wie auch der Mutante pcHSRV2-M93 Δ 123-199 sprechen aber gegen die Annahme, dass es sich bei den coiled-coil-Motiven zwischen As 120 - 200 um die einzige Gag-Gag Interaktionsdomäne im PFV Gag-Protein handelt (vgl. Tobaly-Tapiero et al. 2001). Eine weitreichende Deletion des N-Terminus von PFV Gag wie im Fall der Mutanten pMC4 Δ 7-179 und pMC12 Δ 7-179 scheint eine Interaktion und Zusammenlagerung der Gag-Proteine wieder zu ermöglichen. Weitere Interaktionsdomänen werden im C-terminalen Teil des PFV Gag-Proteins vermutet und können anscheinend auch alleine die notwendige Interaktion der Gag-Proteine für einen Kapsidzusammenbau gewährleisten (Bowzard et al. 1998, Stange et al. 2005, Mannigel, Stange und Lindemann, pers. Mitteilungen).

Durch die Substitution einzelner konservierter Aminosäuren wurde ein strukturell wichtiger Bereich am unmittelbaren N-Terminus von PFV Gag identifiziert. Die Substitution der As L17 gegen Alanin bewirkte eine Reduktion der Partikelfreisetzung und der Infektiosität (pcHSRV2-M94, Abb. 26 und 27, Kapitel 3.2.4.). Die Substitution des gleichen Leucin gegen Serin führte sogar zur völligen Unterbindung der Partikelfreisetzung (pcHSRV2-M85, Abb. 26 und 27, Kapitel 3.2.4.). Sequenzanalysen sagen für die As 9 – 18 im PFV Gag-Protein die Bildung einer α -Helix voraus (Programm „NNPREDICT“, McClelland und Rumelhart 1988, Kneller et al. 1990, www.cmpharm.ucsf.edu/cgi-bin/nnpredict.pl), die eventuell auch an der Ausbildung einer coiled-coil-Struktur beteiligt sein könnte (vgl. Abb. 40A). Der Austausch der hydrophoben As Leucin gegen die hydrophile, ungeladene As Serin bei der Mutante pcHSRV2-M85 L17S bewirkte möglicherweise eine massive Störung der Ausbildung dieser α -Helix. Dagegen hatte bei der Mutante pcHSRV2-M94 L17A der konservative Austausch zweier hydrophober Aminosäuren gegeneinander keine solchen drastischen Folgen für die Tertiärstruktur des Gag-Proteins (Abb. 40C und D). Auch für das FFV Gag-Protein sagen Sequenzanalysen die Bildung einer α -Helix in diesem Abschnitt des Proteins voraus (Geiselhart et al. 2003). Die Deletion dieses Bereiches im FFV Gag-Protein (As 3 – 20) führte zu einer überwiegenden Lokalisation des Gag-Proteins im Zellkern transfizierter Zellen und verhinderte die Partikelfreisetzung (Geiselhart et al. 2003). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Mutante pcHSRV2-M94 L17A eine etwa um die Hälfte verringerte

Partikelfreisetzung (Abb. 27, Kapitel 3.2.4.), dagegen war der infektiöse Titer um den Faktor 10^5 gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 26, Kapitel 3.2.4.). Der Verlust an Infektiosität kann auf eine veränderte Partikelmorphologie und/oder einen reduzierten Einbau von viralen oder zellulären Komponenten in die Viruspartikel beruhen. Möglicherweise beeinträchtigte der Aminosäureaustausch aber auch die Funktionen von Gag nach der Infektion einer Wirtszelle. Zur Klärung der genauen Funktion dieses Proteinabschnittes bedarf es weiterer Untersuchungen.

Die subzelluläre Organisation eukaryotischer Zellen verlangt den spezifischen intrazellulären Transport von Proteinen durch das Zytoplasma zum Ort ihrer Bestimmung. Eine Reihe von Signalen für spezifische zelluläre Transportwege sind identifiziert worden. Am besten charakterisiert sind dabei die Signalpeptide von Proteinen, die für den sekretorischen Transport bestimmt sind, sowie nukleäre Import- und Exportsignale (Übersichten in Stroud und Walter 1999, Simon und Blobel 1993, Christophe et al. 2000). Für die Morphogenese ihrer Kapside müssen Retroviren ebenfalls auf das zelluläre Transportsystem zurückgreifen. Bei Retroviren des C-Typ-Morphogeneseweges dient die Myristilierung des N-Terminus von Gag sowie eine Abfolge von basischen Aminosäuren im Matrixanteil als Signal für den Transport des Gag-Proteins zur Plasmamembran (Göttlinger et al. 1989, Ono und Freed 1999). Auch das Gag-Protein des Mason-Pfizer Monkey Virus (M-PMV) als Prototyp des Typ-D-Morphogeneseweges hat dieses doppelte Signal im Matrixanteil. Trotzdem findet der Kapsidzusammenbau bei diesem Virus im Zytoplasma statt. Als dominantes Signal fungiert eine 18 Aminosäuren lange Region im N-Terminus des Proteins, die als „cytoplasmic targeting/retention signal“ (CTRS) bezeichnet wird (Choi et al. 1999). Durch dieses Signal werden die Gag-Proteine kotranslational an den Zentriolen konzentriert, dort findet auch der Zusammenbau der Kapside statt (Sfakianos et al. 2003a). Die Mutation eines Arginin in Tryptophan in diesem Aminosäureabschnitt lenkt die Morphogenese der M-PMV Kapside an die Plasmamembran um, ähnlich wie es bei dem C-Typ-Morphogeneseweg der Fall ist (Rhee und Hunter 1990). Andererseits kann durch Umsetzung dieser Aminosäuresequenz in den N-Terminus des Gag-Proteins des „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MoMuLV), eines Retrovirus des Typ-C-Morphogeneseweges, der übliche Transport des Gag-Proteins zur Plasmamembran blockiert werden. Statt dessen ist ein Zusammenbau der Kapside im Zytoplasma zu beobachten (Choi et al. 1999). Dieses Signal ist in seiner Aminosäurezusammensetzung zwischen den Matrixproteinen verschiedener Retroviren des Typ-B- und Typ-D-Morphogeneseweges konserviert (Rhee und Hunter 1990). Der Proteinabschnitt zwischen Aminosäure 40 und 60 ist bei den Gag-Proteinen der verschiedenen Foamyviren hoch konserviert und zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit

A

M-PMV Gag CTRS	43	P	W	F	P	Q	E	G	T	I	D	I	K	R	W	R	R	V	G	D	C	F	Q	D	65
PFV Gag	43	G	W	W	G	Q	-	-	-	-	-	I	E	R	F	Q	M	V	R	L	I	L	Q	D	60
SFV _{cpz} Gag	43	G	W	W	G	Q	-	-	-	-	-	L	E	R	F	Q	M	V	R	L	I	L	Q	D	60
SFV _{mac} Gag	39	G	W	W	G	P	-	-	-	-	-	A	T	R	Y	N	L	V	S	L	L	L	Q	D	56
SFV _{agm} Gag	37	G	W	W	G	P	-	-	-	-	-	G	T	R	Y	I	L	V	S	I	F	L	Q	D	54
SFV _{ora} Gag	39	G	W	W	G	E	-	-	-	-	-	Q	E	R	Y	Q	S	A	R	I	I	L	Q	D	56
BFV Gag	34	G	P	W	G	I	-	-	-	-	-	G	D	R	Y	N	L	I	R	I	H	L	Q	D	51
EFV Gag	35	G	Q	W	G	I	-	-	-	-	-	G	D	R	W	L	Q	V	R	L	R	L	V	D	52
FFV Gag	36	G	P	W	G	P	-	-	-	-	-	G	D	R	W	T	R	V	A	I	R	L	Q	D	53
			/											*	/						/	/		*	

B

1. Konsensus	L	(X) ₁₋₃	$\begin{pmatrix} L \\ I \\ M \\ V \\ P \end{pmatrix}$	(X) ₁₋₃	L	X	$\begin{pmatrix} L \\ I \end{pmatrix}$	X
2. HIV-1 Rev	I	- P P	L	- E R	L	T	L	D
3. HTLV-1 Tax	I	- E E	L	- Y K	I	S	L	T
4. SIV Rev	M	- Q Q	L	- Q N	L	A	I	E
5. VMV Rev	L	- V G	M	- E N	L	T	L	E
6. HTLV-1 Rex	L	S A Q	L	Y S S	L	S	L	D
7. RSV Gag p6	L	T D W	A	R V R	E	E	L	
8. PFV Gag	48	I E R F Q	M	- V R	L	I	L	Q 59
	95	L - - A	F	- Q D	L	D	L	P 103

Abb. 41: Sequenzvergleich des PFV Gag Aminosäureabschnittes 43 – 60.

(A) Alignment des PFV Gag-Abschnittes As 43 - 60 mit dem CTRS-Signal des M-PMV (nach Eastman und Linal 2001) sowie homologer Aminosäurebereiche weiterer FV Gag-Proteine. Aminosäuren, deren Substitution mit Alanin nach den Ergebnissen dieser Arbeit einen vom wildtypischen Gag abweichenden Phänotyp ergaben, sind hervorgehoben. (*): konservierte Aminosäure. (/): semi-konservierte Aminosäuren. (B) Vergleich verschiedener Leucin-reicher NES-Signale retroviraler Proteine. Sequenzen 1 – 6 nach Alefantis et al. 2003. Sequenz 7 nach Scheifele et al. 2005. Für die Aminosäureabfolge As 95LAFQDL102 in PFV Gag wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit ein NES-Signal vorausgesagt (Programm NetNES 1.0, La Cour et al. 2004, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>). X: beliebige As.

dem CTRS-Signal des M-PMV (Abb. 41, Tobaly-Tapiero et al. 2000, Eastman und Linal 2001). Die Substitution konservierter Aminosäuren mit Alanin in diesem Proteinbereich von PFV Gag führte entweder zu einer stark reduzierten (pcHSRV2-M103 W44A, Abb. 27, Kapitel 3.2.4.) oder völlig verhinderten Partikelfreisetzung (pcHSRV2-M96 W45A, pcHSRV2-M97 R50A, pcHSRV2-M101 L56&58A, Abb. 27, Kapitel 3.2.4.). Mutationen im homologen Proteinabschnitt des FFV Gag-Proteins führten ebenfalls zu einem Abbruch der Partikelfreisetzung, wie die Analyse der W38A-Substitution in dieser Arbeit und eine weitere Studie am FFV Gag-Protein zeigen konnten (Abb. 35, Kapitel 3.2.8., Geiselhart et al. 2003). Dagegen führten Alanin-Substitutionen sowohl weiter N- als auch C-terminal gelegener

konservierter Aminosäuren in PFV Gag zu keiner Änderung im Phänotyp (vgl. pcHSRV2-M95 I36A, pcHSRV2-M102 D60A, pcHSRV2-M104 P65A, Abb. 27, Kapitel 3.2.4.). Ein mögliches CTRS-Signal beschränkt sich folglich auf den Proteinabschnitt zwischen As 44 und 58 im PFV Gag-Protein. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der foamyviralen Gag-Proteine in dem fraglichen Bereich mit dem CTRS-Signal von M-PMV zeigt, dass die phänotypisch auffallenden Substitutionen Aminosäuren betrafen, die zwischen den beiden Sequenzen semi- bis hochkonserviert sind (Abb. 41A). Während jedoch eine spezifische Aminosäuresubstitution im CTRS-Signal von M-PMV Gag die Strukturproteine zur Plasmamembran umlenkte und dort die Bildung von Kapsiden zu beobachten war (R55W, Rhee und Hunter 1990), konnte bei der homologen Aminosäuresubstitution im PFV Gag kein Zusammenbau viraler Kapside beobachtet werden (R50W, Eastman und Linial 2001). Wie die EM-Aufnahmen belegen verhinderten auch die in dieser Arbeit vorgenommenen Alanin-Substitutionen den Zusammenbau viraler Kapside (Abb. 38, Kapitel 3.2.9). In dem fraglichen Proteinabschnitt der FV Gag-Proteine befindet sich folglich eine von ihrer Funktion dem CTRS-Signal von M-PMV ähnliche Aminosäureabfolge, die den Transport der neu synthetisierten Gag-Proteine zu dem Ort des Kapsidzusammenbaus in der Wirtszelle vermittelt. Mutationen innerhalb dieses Motivs verhinderten den spezifischen intrazellulären Transport der PFV Gag-Proteine und damit den Zusammenbau viraler Kapside. Anders als bei M-PMV ist aber nach Mutation des CTRS-Signales in PFV Gag kein alternativer Kapsidzusammenbau an der Plasmamembran zu beobachten, da dem Protein die entsprechenden Signalsequenzen für einen Transport zur Plasmamembran und Verankerung in diese fehlen.

Die Myristilierung am N-Terminus zusammen mit den basischen Aminosäuresequenzen im MA-Anteil retroviraler Gag-Proteine dient als Transportsignal zu zellulären Membranen und der Verankerung in diese (Rhee und Hunter 1987, Göttlinger et al. 1989, Ono und Freed 1999). Unterbleibt die Myristilierung an den Gag-Proteinen von Retroviren des Typ-C-Morphogeneseweges, bei denen der Kapsidzusammenbau an der Plasmamembran stattfindet, resultiert dies in einer Blockierung der Partikelfreisetzung und Akkumulation von Gag in der Zelle (Rein et al. 1986, Göttlinger et al. 1989, Bryant und Ratner 1990). Wird die Myristilierung des Gag-Proteins von M-PMV verhindert, das als Retrovirus vom D-Typ-Morphogeneseweg sein Kapsid im freien Zytoplasma zusammenbaut, bilden sich zwar intrazelluläre Kapside, aber der Transport zur Plasmamembran oder die stabile Anlagerung an die Membran unterbleibt (Rhee und Hunter 1987).

Die Gag-Proteine der Foamyviren besitzen weder eine Konsensussequenz für eine Myristilierung ihres N-Terminus noch eine Anhäufung basischer Aminosäuren im Bereich des N-Terminus (Linial und Eastman 2003). Somit fehlt den foamyviralen Gag-Proteinen das bei Orthoretroviren übliche Signal für einen Transport zur und Verankerung in eine zelluläre

Membran. Vermutlich wird die stabile Anlagerung an eine zelluläre Membran bei foamyviralen Kapsiden durch die Interaktion der Gag-Proteine mit dem zytoplasmatischen Anteil der LP-Untereinheit des foamyviralen Env-Proteins übernommen (Lindemann et al. 2001, Wilk et al. 2001a). Dies würde die für eine Partikelfreisetzung essentielle Koexpression von Gag- und Env-Protein bei Foamyviren erklären. Durch Anfügen eines zusätzlichen Myristilierungssignales an den N-Terminus von PFV Gag kann jedoch eine Env-unabhängige Freisetzung viraler Kapside erreicht werden (Eastman und Linial 2001, Stanke und Lindemann, pers. Mitteilung). Die PFV Gag-Mutanten pcHSRV2-M96 W45A und -M97 R50A setzten beide keine Partikel mehr frei und wiesen eine veränderte intrazelluläre Verteilung der Gag-Proteine auf (Abb. 27, Kapitel 3.2.4.; Abb. 28, Kapitel 3.2.5. und Abb. 31, Kapitel 3.2.6.). Durch die zusätzliche Myristilierung des N-Terminus der mutierten Gag-Proteine konnte eine erneute Freisetzung partikulären Proteinmaterials erreicht werden (Abb. 33, Kapitel 3.2.7., sowie Eastman und Linial 2001). Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass durch die beiden Alanin-Substitutionen ein intrazelluläres Transportsignal im PFV Gag-Protein betroffen war (vgl. vorangegangener Abschnitt). Durch die Myristilierung am N-Terminus wurde ein dominantes Transportsignal hinzugefügt, welches die Transportblockade der mutierten Gag-Proteine aufheben konnte und zu einer Freisetzung von partikulärem viralem Proteinmaterial führte. Allerdings konnten die Doppelmутanten pcHSRV-M96Myr W45A und - M97Myr R50A keine infektiösen Viruspartikel mehr bilden (Abb. 34, Kapitel 3.2.7.). In dem freigesetzten partikulärem Proteinmaterial der beiden Doppelmутanten war eine eingeschränkte Prozessierung des Gag-Proteins zu beobachten (Abb. 33, Kapitel 3.2.7.). Dies deutete auf eine stark reduzierte Inkorporation der viralen Protease hin. Tatsächlich wurden in den Partikelpräparationen die beiden Pol-Untereinheiten p85^{PR/RT} und p40^{IN} nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen (Abb. 33, Kapitel 3.2.7.). Die Produktion infektiöser Viruspartikel gelang bislang auch nicht mit myristiliertem wildtypischem PFV Gag-Protein (Eastman und Linial 2001, Swiersy und Lindemann pers. Mitteilung). Ebenso wenig gelang die Pseudotypisierung der myristilierten Gag-Proteine mit den Glykoproteinen anderer Viren (Swiersy und Lindemann, pers. Mitteilung). Vermutlich wird das PFV Gag-Protein durch die Myristilierung am N-Terminus zur Plasmamembran umdirigiert. Durch die Myristinsäure in der Membran verankert, lagert es sich dort zu partikulären Strukturen zusammen und wird nun unabhängig vom viruseigenen Glykoprotein freigesetzt. Eine geordnete Morphogenese infektiöser Viruspartikel kann aber wohl auf diesen Wege nicht mehr stattfinden, wobei insbesondere die Inkorporation der prägenomischen RNA und der Pol-Proteine in die Partikel verhindert wird.

Die ausgeprägte Kernfluoreszenz aller Gag-Proteine der Foamyviren aus Primaten ist ein exklusives Merkmal innerhalb der Retroviren und wird als diagnostisches Merkmal für

foamyvirale Infektionen verwendet (Neuman-Haefelin 1993). Der Grund für die nukleäre Lokalisation des Gag-Proteins nach Translation im Zytoplasma ist aber noch unbekannt. Es wird unter anderem vermutet, dass die Kernfluoreszenz als Folge der intrazellulären Retrotransposition auftritt, bei der virale Kapside nicht die Zelle verlassen, sondern zurück an den Kern transportiert werden und eine neue Replikationsrunde gestartet wird (Heinkelein et al. 1998, vgl. Kapitel 1.2.2). Der GRII-Box konnte die Funktion als NLS-Signal im PFV Gag Protein zugeordnet werden (Schliephake und Rethwilm 1994, Yu et al. 1996). Nach transienter Transfektion eines Proviruskonstruktes war das wildtypische Gag-Protein zuerst im Zytoplasma zu finden und erst ab 18 – 24 h n. T. im Zellkern nachweisbar (Abb. 31, Kapitel 3.2.6., vgl. Schliephake und Rethwilm 1996, Imrich et al. 2000). Die Kernfluoreszenz war 24 – 48 h n. T. am stärksten ausgeprägt und nahm dann sukzessiv wieder ab (Abb. 31, Kapitel 3.2.6., vgl. Schliephake und Rethwilm 1996, Imrich et al. 2000). Dagegen war insbesondere nach Substitution der As R50 durch Alanin das mutierte Gag-Protein von dem frühesten Zeitpunkt der Analyse an (12 h n. T.) ausschließlich im Zellkern zu finden (pcHSRV2-M97 R50A, Abb. 28, Kapitel 3.2.5. und Abb. 31, Kapitel 3.2.6.). Bei den anderen beiden untersuchten Mutanten pcHSRV2-M96 W45A und pcHSRV2-M101 L56&58A war die Lokalisation des Gag-Proteins im Zellkern weniger dominant, aber immer noch stärker ausgeprägt als im wildtypischen Gag-Protein (Abb. 28, Kapitel 3.2.5. und Abb. 31, Kapitel 3.2.6.). Auch die Deletion der GRII-Box mit dem bekannten NLS-Signal konnte an der nahezu ausschließlichen Lokalisation der R50A-Gagmutante im Zellkern zu allen untersuchten Zeitpunkten nichts ändern (Tab. 4 und Abb. 31, Kapitel 3.2.6.). Allerdings zeigte auch das wildtypische Gag-Protein mit deletierter GRII-Box noch eine deutliche Kernfluoreszenz (pcHSRV2-M65 Δ GRII, Tab. 4 und Abb. 31, Kapitel 3.2.6.). Neben dem bekannten NLS-Signal in der GRII-Box deutet dies auf weitere, bislang unbekannte NLS-Signale im PFV Gag-Protein hin. Ein Signal für den Kernexport wurde im PFV Gag-Protein noch nicht nachgewiesen, doch könnten die Alanin-Substitutionen im PFV Gag-Protein zwischen As 40 und 60 ein mögliches Kernexport-Signal (NES) im N-Terminus des Proteins betroffen haben und auf diese Weise die verstärkte Kernfluoreszenz der Mutanten erklären. Für das Rous Sarcoma Virus (RSV) konnte ein transienter Transport des Gag-Proteins durch den Zellkern vor dem Kapsidzusammenbau nachgewiesen werden (Scheifele et al. 2002, 2005). Wahrscheinlich unterstützt das RSV Gag-Protein dabei den Export der prägenomischen RNA aus dem Zellkern (Scheifele et al. 2002). Im RSV Gag-Protein konnte ein klassisches NLS-Signal im NC-Anteil und ein weiteres NLS-Signal im CA-Anteil identifiziert werden, ebenso wie ein Leucin-reiches NES-Signal im MA-Anteil (Scheifele et al. 2002, 2005). Leucin-reiche NES-Signale waren bislang vor allem von akzessorischen Proteinen komplexer Retroviren bekannt, die den Export der prägenomischen RNA aus dem Zellkern vermitteln (vgl. Abb. 41B, Meyer et al. 1996, Alefantis et al. 2003). Durch die

Interaktion mit diesen akzessorischen Proteinen wird ein Spleißen der prägenomischen RNA verhindert. Dieses Problem müssen alle Retroviren für den Export ihrer prägenomischen RNA überwinden (Übersicht in Harris und Hope 2000). Möglicherweise wird auch das PFV Gag-Protein nach Translation im Zytoplasma in den Zellkern importiert, um dort die prägenomische RNA und das Pol-Vorläuferprotein für die Kapsidmorphogenese zu rekrutieren. Für das PFV Pol-Protein konnte ein Gag-unabhängiger Kernimport bereits nachgewiesen werden (Imrich et al. 2000). Leucin-reiche NES-Signale sind relativ unspezifisch und zeigen eine nur geringe Sequenzhomologie (Moroianu 1999, La Cour et al. 2004). Ein Vergleich zwischen den NES-Signalen der akzessorischen Proteine verschiedener Retroviren, dem NES-Signal von RSV Gag und dem Proteinabschnitt von PFV Gag zwischen As 42 und 60 zeigt eine nur mäßige Übereinstimmung (Abb. 41B). Zudem war die Kernfluoreszenz am deutlichsten bei der R50A-Mutante ausgeprägt und nicht bei der L56&58A-Mutante, in der die potentiell signalrelevanten Leucine mutiert wurden (vgl. Abb. 41B). Wahrscheinlich ist zwischen As 42 und 60 kein NES-Signal lokalisiert, sondern die Mutationen übten einen indirekten Effekt auf ein mögliches NES-Signal im N-Terminus von Gag aus. Eine Analyse der Proteinsequenz von PFV Gag erbrachte zudem für den betreffenden Abschnitt keinen Hinweis auf ein mögliches NES-Signal (Programm NetNES 1.0, La Cour et al. 2004, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>). Statt dessen wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein NES-Signal in einer weiter C-terminal liegenden Aminosäureabfolge berechnet (PFV Gag As 95LAFQDL102, vgl. Abb. 41B). Leucin-reiche NES-Signale vermitteln den Transport ihrer Proteine aus dem Kern über den Crm1/Exportin1-Weg. Dieser Exportweg lässt sich spezifisch mit Leptomycin B hemmen. Es gibt erste Hinweise, dass die Partikelmorphogenese von PFV durch Zugabe von Leptomycin B gehemmt werden kann (Bodem, pers. Mitteilung).

Eventuell ist auch in FFV Gag ein entsprechendes NES-Signal vorhanden, obwohl für das wildtypische FFV Gag-Protein keine Kernlokalisierung beobachtet wurde (Bodem et al. 1998, Roy et al. 2003). Nach Deletion des zu den Aminosäuren 40 – 60 in PFV Gag analogen Proteinabschnitts in FFV Gag wurde eine deutliche Kernlokalisierung der deletierten Proteine beobachtet (Geiselhart et al. 2003). Die gleiche Beobachtung wurde gemacht, wenn das zum Arginin 50 in PFV Gag analoge Arginin 43 in FFV Gag zu Alanin substituiert wurde (Geiselhart et al. 2003).

Der Proteinabschnitt von PFV Gag zwischen As 40 – 60 beeinflusst folglich auf direkte Weise (CTRS-Signal) und/oder in indirekter Art (NES-Signal) die zelluläre Lokalisation des Strukturproteins und spielt eine essentielle Rolle bei der Partikelmorphogenese der Foamyviren. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Frage nach der Funktion dieses Proteinabschnittes endgültig zu klären.

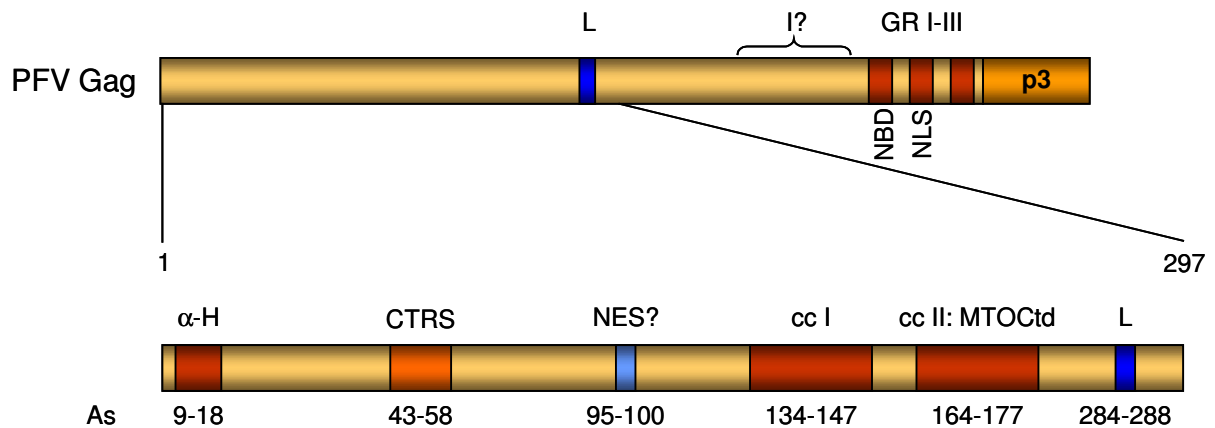


Abb. 42: Funktionelle Abschnitte im N-Terminus von PFV Gag.

α -H: Bereich einer α -Helix; cc I: hypothetisches coiled-coil Motiv (Tobaly-Tapiero 2001); cc II (MTOCtd): hypothetisches coiled-coil Motiv, als „Microtubuli organizing center targeting domain“ beschrieben (Petit et al. 2003); CTRS: CTRS-Signal (Eastman und Linial 2001); GRI-GRIII: Glyzin-Arginin reiche Sequenzabschnitte (Schliephake und Rethwilm 1994); I?: potentielle Gag-Gag Interaktionsdomäne (Bowzard et al. 1998); L: Late-Domäne (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005); NBD: Nukleinsäurebindungsdomäne; NES: hypothetisches nukleäres Exportsignal; NLS: Nukleäres Lokalisationssignal.

In dieser Arbeit konnten mehrere für die Partikelmorphogenese von PFV relevante Abschnitte am N-Terminus des Gag-Proteins identifiziert werden. In Abb. 42 wurden die Ergebnisse dieser Arbeit gemeinsam mit den publizierten Daten zu einem Gesamtbild über die funktionellen Abschnitte am N-Terminus von PFV Gag zusammengefügt.

Wie in dem einleitenden Kapitel erläutert, wurden in Analogie zu den Funktionen des MA-Anteils orthoretroviraler Gag-Vorläuferproteine am N-Terminus von PFV Gag intrazelluläre Transportsignale und eine Interaktionsdomäne mit dem viralen Glykoprotein vermutet. Eine eindeutige Zuordnung dieser Aufgaben zu bestimmten Proteinabschnitten kann aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen und den bereits veröffentlichten Ergebnissen noch nicht vorgenommen werden. Allerdings können die funktionell wichtigen Bereiche eingegrenzt werden.

Durch die C-terminalen Deletionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass alle notwendigen Informationen für einen Export viralen Proteinmaterials in den ersten 300 As des PFV Gag-Proteins enthalten sind. Der partikuläre Export dieses Restproteins erfolgte immer noch in Abhängigkeit von der Koexpression des viralen Glykoproteins. Für eine effektive Freisetzung ist das *PSAP*-Motiv zwischen Aminosäure 284 und 287 in PFV Gag essentiell, das die Funktion einer L-Domäne im PFV Gag-Protein erfüllt und den Kontakt zu der zellulären Exportmaschinerie des ESCORTI-Komplexes herstellt (Stange et al. 2005, Patton et al. 2005). Innerhalb der ersten 200 As des PFV Gag-Proteins lassen sich mehrere funktionelle Abschnitte unterscheiden (Abb. 42). Unmittelbar am N-Terminus des Proteins

liegt ein Aminosäureabschnitt, für den Sequenzanalysen die Konformation einer α -Helix voraussagen. Noch unbekannt ist, ob diese α -Helix eine spezifische Funktion bei der Morphogenese foamyviraler Partikel zu erfüllen hat oder nur Einfluss auf die Konformation des Gag-Proteins nimmt. Es folgt zwischen As 40 und 60 des PFV Gag-Proteins ein zelluläres Transportsignal, das eine große Ähnlichkeit zu den CTRS-Signalen der Retroviren mit Typ-B- oder D-Morphogeneseweg zeigt (Abb. 41A, Eastman und Linial 2001). Mutationsanalysen im FFV und EFV Gag-Protein sprechen dafür, dass dieser Aminosäureabschnitt in allen FV Gag-Proteinen vorhanden ist und eine wichtige Funktion bei der Partikelmorphogenese erfüllt (Wilk et al. 2001a, Lecellier et al. 2002, Geiselhart et al. 2003). Sequenzanalysen lassen ein mögliches NES-Signal im PFV Gag-Protein zwischen As 95 – 102 vermuten, das durch die Mutationen zwischen As 40 – 60 in seiner Funktion gestört wurde (Abb. 41B). Zwei weitere funktionelle Proteinabschnitte liegen im zentralen Teil des hypothetischen p33-Prozessierungsproduktes von PFV Gag, für den die Ausbildung von ein oder zwei Superhelices vorausgesagt werden (Abb. 40A). Möglicherweise werden nach einer Multimerisierung der Gag-Proteine die beiden vorausgesagten coiled-coil-Motive an der Kapsidoberfläche exponiert. Damit könnte das zweite coiled-coil-Motiv die Interaktion mit dem zellulären Zytoskelett für den Kapsidtransport nach Infektion einer Zelle übernehmen (Saib et al. 1997, Petit et al. 2003). Die Rolle des vorderen coiled-coil-Motivs ist noch nicht geklärt, doch sprechen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten gegen eine ausschließliche Rolle als Interaktions-Domäne zwischen den Gag-Molekülen (vgl. Tobaly-Tapiero et al. 2001). Eine Möglichkeit wäre, dass in diesem Bereich die für die Partikelfreisetzung essentielle Interaktion mit dem Glykoprotein vermittelt wird.

Anhand dieser gewonnenen Informationen lässt sich ein vorläufiges Modell der Partikelmorphogenese bei PFV erstellen. Nach Synthese der Gag-Proteine würden diese durch das Transportsignal zwischen As 40 – 60 zu einem zellulären Ort transportiert, an dem der Zusammenbau der viralen Kapside erfolgt. In Analogie zu den Vorgängen bei M-PMV könnte dieser Ort das Zentroplasma rund um die Zentriolen sein (Sfakianos et al. 2003a). Es gibt Hinweise für einen zuvor stattfindenden transienten Transport der PFV Gag-Proteine durch den Zellkern, möglicherweise um die prägenomische RNA und das Pol-Protein für die Kapsidbildung zu rekrutieren. Nach Zusammenbau des Kapsids wird der Kontakt mit dem N-Terminus des Hüllproteins entweder bereits im Zytoplasma oder an einer zellulären Membran hergestellt (Lindemann et al. 2001, Wilk et al. 2001a). Für M-PMV gibt es Hinweise, dass die Env-Proteine aktiv den Transport der Kapside an zelluläre Membranen unterstützen (Sfakianos et al. 2003b). Dies könnte auch bei Foamyviren der Fall sein. Biophysikalische Untersuchungen lassen vermuten, dass es zu einer direkten Interaktion zwischen den N-Termini der FV Gag- und Env-Proteine kommt (Wilk et al. 2001a, Geiselhardt et al. 2003). Unter Ausnutzung der zellulären Exportmaschinerie des ESCRTI-

Komplexes erfolgt dann eine Freisetzung der PFV Virionen bevorzugt in intrazelluläre Kompartimente (Baldwin und Linial 1998, Stange et al. 2005, Patton et al. 2005). Die bei Foamyviren essentielle Interaktion der Kapside mit dem Glykoprotein für eine Freisetzung viraler Partikel ist wohl primär auf das Fehlen membranbindender Domänen in den foamyviralen Gag-Proteinen zurückzuführen. Durch Anfügen einer Myristinsäure am N-Terminus von Gag kann die essentielle Interaktion mit dem viruseigenen Glykoprotein für eine Partikelfreisetzung aufgehoben werden (Kapitel 3.2.7., Eastman und Linial 2001, Stanke, Swiersy und Lindemann, pers. Mitt.).

Für eine eindeutigere Zuordnung bestimmter Funktionen zu definierten Aminosäuren bzw. Aminosäureabschnitten in den foamyviralen Gag-Proteinen bedarf es einer Strukturaufklärung der Proteine mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie. Anhand der bekannten Struktur könnten dann die existierenden Modellvorstellungen überprüft werden und eine noch detailliertere Funktionsanalyse der foamyviralen Gag-Proteine erfolgen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb der Retroviren unterscheiden sich die Foamyviren (FV) bezüglich ihrer Proteinexpression, der Partikelmorphogenese und ihres Reproduktionszyklus deutlich von den Orthoretroviren. Gleichzeitig zeigen sie interessante Parallelen zu den Hepadnaviren und nehmen so eine Zwischenstellung zwischen diesen beiden Virengruppen ein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei exklusive Merkmale der Foamyviren, die ungewöhnliche Struktur des Gag-Proteins und die Gag unabhängige Pol-Expression, in ihrer Auswirkung auf Morphogenese und Zusammensetzung foamyviraler Partikel untersucht.

Für die Morphogenese infektiöser Partikel sind sehr unterschiedliche Mengen der Genprodukte eines Retrovirus nötig. Orthoretroviren exprimieren die Produkte des *gag*- und *pro/pol*-ORFs von einer gemeinsamen, ungespleißten prägenomischen mRNA. Während der Translation der prägenomischen mRNA kommt es durch Unterdrückung des Stop-Kodons oder einer Verschiebung des Leserahmens am Ende des *gag*-ORF in etwa 5 - 10% der Translationsereignisse zur Bildung eines Gag/Pro/Pol-Fusionsproteins anstelle eines Gag-Proteins. Auf diese Weise wird bei Orthoretroviren das Syntheseverhältnis zwischen dem in großen Mengen benötigten Strukturprotein Gag und den nur im geringen Maße notwendigen viralen Enzymen Pro und Pol auf Translationsebene kontrolliert. Sowohl Gag- wie Gag/Pro/Pol-Fusionsproteine werden in die Virionen eingebaut, eine weitere Prozessierung in die Untereinheiten erfolgt erst nach Freisetzung des Virions aus der Wirtszelle. Manipulationen der Balance zwischen Gag- und Gag/Pro/Pol-Bildung führen zu massiven Störungen der Partikelmorphogenese und zur Bildung nicht-infektiöser Viruspartikel. Im Gegensatz dazu wird bei Foamyviren das Produkt des *pro/pol*-ORFs von einer eigenen, gespleißten mRNA translatiert. Der Gag/Pro/Pol-Gehalt in den Viruspartikeln kann folglich nicht wie bei Orthoretroviren über eine gekoppelte Translation und Inkorporation von Gag- und Gag/Pro/Pol-Fusionsproteinen reguliert werden. In dieser Arbeit wurde der Frage nach dem molekularem Verhältnis von Gag- und Pro/Pol-Proteinen in foamyviralen Partikeln nachgegangen. In PFV Virionen finden sich neben dem Gag-Vorläuferprotein p71 als einziges Gag-Prozessierungsprodukt das p68-Protein sowie die beiden Pro/Pol-Untereinheiten p85^{PR/RT} und p40^{IN}. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurde der relative Anteil dieser vier Proteine in PFV Virionen anhand einer mit bakteriell exprimierten Referenzproteinen erstellten Eichkurve bestimmt. Die Isolation der PFV Virionen erfolgte über einen Dichtegradienten. In guter Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten wurde für infektiöse PFV Partikel eine mittlere Dichte von 1,12 g/ml ermittelt. In den isolierten PFV Partikeln war der relative Gehalt an dem Gag-Prozessierungsprodukt p68 viermal höher als

der Gehalt an dem Gag-Vorläuferprotein p71. Das Gag-Prozessierungsprodukt p68 bildet somit das Hauptstrukturelement der PFV Kapside. Weiterhin ergab sich ein Verhältnis von 16 Gag-Molekülen zu einem p85^{PR/RT}-Molekül sowie 10 Gag-Molekülen pro p40^{IN}-Molekül. Damit entsprach die Gag/Pol-Zusammensetzung von PFV Partikeln den stöchiometrischen Verhältnissen in orthoretroviralen Partikeln von 10 – 20 Gag-Molekülen pro Pol-Molekül. Dieses Ergebnis ist in Hinsicht auf die unterschiedlichen Synthesestrategien von Gag und Pol bei Orthoretro- und Foamyviren bemerkenswert. Basierend auf diesen Ergebnissen stellt sich für weiterführende Untersuchungen nun die Frage nach der Regulation der Gag- und Pol-Synthese bei Foamyviren.

Während die Morphogenese orthoretroviraler Partikel in den vergangenen Jahren intensiv untersucht worden ist, ist der Entstehungsweg foamyviraler Partikel bislang weniger gut erforscht. Bei Orthoretroviren setzt sich in einem Prozess der Selbstorganisation das Strukturprotein Gag autonom zu virusähnlichen Partikeln zusammen, die auch in Abwesenheit weiterer viraler Komponenten aus der Wirtszelle freigesetzt werden. Foamyviren dagegen benötigen für die Freisetzung ihrer Viruspartikel neben dem Strukturprotein obligat die Koexpression ihres Glykoproteins. Im Unterschied zu den Orthoretroviren wird das Strukturprotein der Foamyviren auch nicht in eine MA-, CA- und NC-Untereinheit gespalten, sondern es erfolgt nur ein Prozessierungsschritt am C-Terminus des Proteins. Weiterhin fehlen den foamyviralen Gag-Proteinen die für orthoretrovirale Gag-Proteine typischen funktionellen Abschnitte. Anstatt dessen finden sich am C-terminalen Ende des foamyviralen Gag-Proteins Glyzin/Arginin-reiche Abschnitte (GR-Boxen), welche die Bindung und Inkorporation der prägenomischen RNA vermitteln und ein Kernlokalisierungssignal enthalten. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden weitere funktionelle Abschnitte im PFV Gag-Protein eingegrenzt und charakterisiert, die eine Rolle bei der Bildung und Freisetzung der viralen Partikel spielen. Eine schrittweise Deletion des PFV Gag-Proteins vom C-Terminus her zeigte, dass die N-terminalen 300 Aa von PFV Gag ausreichend für die Freisetzung von partikulärem viralem Proteinmaterial sind. Die Analyse weiterer Deletionsmutanten innerhalb des N-Terminus des PFV Gag-Proteins belegte, dass die Aa 6 – 200 für die Bildung viraler Kapside entbehrlich sind, aber für die Interaktion mit dem viralen Glykoprotein und für eine Freisetzung der viralen Partikel aus der Wirtszelle essentiell sind. Für eine detailliertere Analyse dieses Aminosäureabschnittes wurden Punktmutationen in das PFV Gag-Protein eingeführt. Die Substitution einzelner konservierter Aminosäuren durch Alanin zwischen Aa 40 – 60 blockierte die Partikelmorphogenese. Die Aminosäureabfolge dieses Proteinabschnittes zeigte eine große Ähnlichkeit mit einem zellulären Transportsignal, das in den Gag-Proteinen von Retroviren des Typ-D-Morphogeneseweges entdeckt worden ist. Eine parallele Mutationsanalyse des FFV Gag-

Proteins ließ vermuten, dass dieses Motiv wohl universell in allen FV Gag-Proteinen vorhanden ist. Weiterhin konnten Aminosäureabschnitte am unmittelbaren N-Terminus des PFV Gag-Proteins sowie zwischen As 130 – 200 eingegrenzt werden, die essentiell für die Struktur des Proteins sind und eventuell eine wichtige Funktion bei der Partikelmorphogenese erfüllen. Weitere Untersuchungen und insbesondere eine Strukturaufklärung des PFV Gag-Proteins sind nötig, um die genaue Funktion der einzelnen Proteinabschnitte zu charakterisieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Achong, B. G., Mansell, P. W. A., Epstein, M. A., und Clifford, P. (1971): An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst*, 46, S. 299 - 307.
- Aguzzi, A., Wagner, E. F., Netzer, K. O., Bothe, K., Anhauser, I., und Rethwilm, A. (1993): Human foamy virus proteins accumulate in neurons and induce multinucleated giant cells in the brain of transgenic mice. *Am-J-Pathol*. 142, S. 1061 - 1071.
- Aigner, A. und Neumann, S. (1997): *Immunchemie*. 1. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Berlin.
- Aldovini, A. und Young, R. A. (1990): Mutations of RNA and protein sequences involved in Human Immunodeficiency Virus Type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol*. 64, S. 1920 - 1926.
- Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E., Grant, C., und Wigdahl, B. (2003): Characterization of a nuclear export signal within the Human T Cell Leukemia Virus Type I transactivator protein Tax. *J. B. C.* 278 (24), S. 21814 – 21822.
- Ali, M., Taylor, G. P., Pitman, R. J., Parker, D., Rethwilm, A., Cheingsong, P. R., Weber, J. N., Bieniasz, P. D., Bradley, J., und McClure, M. O. (1996): No evidence of antibody to human Foamy Virus in widespread human populations. *AIDS-Res-Hum-Retroviruses*. 12 , S. 1473 - 1483.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A., und Struhl, K., (1987): *Current protocols in molecular biology*. 3. Aufl., John Wiley Verlag, New York.
- Baldwin, D. N. und Linial, M. L. (1998): The roles of Pol and Env in the assembly pathway of Human Foamy Virus. *J. Virol*. 72, S. 3658 - 3665.
- Baldwin, D. N., und Linial, M. L. (1999): Proteolytic activity, the carboxy terminus of Gag, and the primer binding site are not required for Pol incorporation into Foamy Virus particles. *J. Virol*. 73, S. 6387 - 6393.
- Baltimore, D. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, S. 1209 - 1211.
- Banks, J. D. und Linial, M. L. (2000): Secondary structure analysis of a minimal Avian Leukosis-Sarcoma Virus packaging signal. *J. Virol*. 74, S. 456 - 464.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., und Montagnier, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220, S. 868 - 871.
- Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1992): Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J*. 11, S. 3413 - 3420.
- Baunach, G., Maurer, B., Hahn, H., Kranz, M., und Rethwilm, A. (1993): Functional analysis of Human Foamy Virus accessory reading frames. *J. Virol*. 67, S. 5411 - 5418.

- Benjamin, J., Ganser-Pornillos, B. K., Tivol, W. F., Sundquist, W. I., und Jensen, G. J. (2005): Three-dimensional structure of HIV-1 virus-like particles by electron cryotomography. *J. Mol. Biol.* 346, S. 577 - 588.
- Bennett, R. P., Nelle, T. D., und Wills, J. W. (1993): Functional chimeras of the Rous Sarcoma Virus and Human Immunodeficiency Virus Gag proteins. *J. Virol.* 67, S. 6487 - 6498.
- Bennett, R. P. und Wills, J. W. (1999): Conditions for copackaging Rous Sarcoma Virus and Murine Leukemia Virus Gag proteins during retroviral budding. *J. Virol.* 73, S. 2045 - 2051.
- Berkowitz, R., Fisher, J., und Goff, S. P. (1996): RNA packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, S. 177 - 218.
- Bieniasz, P. D., Rethwilm, A., Pitman, R., Daniel, M. D., Chrystie, I., und McClure, M. O. (1995): A comparative study of higher primate Foamy Viruses, including a new virus from a gorilla. *Virology* 20, S. 217 - 228.
- Bieniasz, P. D. (2004): Intrinsic immunity: a front-line defence against viral attack. *Nat. Immunol.* 5, S. 1109 - 1115.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic-Acids-Res.* 7, S. 1513.
- Blair, W. S., Bogerd, H., und 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, S. 3803 - 3808.
- Bock, M., Heinkelein, M., Lindemann, D., und Rethwilm, A. (1998): Cells expressing the Human Foamy Virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* 10, S. 194 - 204.
- Bodem, J., Löchelt, M., Winkler, I., Flower, R. P., Delius, H., und Flügel, R. M. (1996): Characterization of the spliced pol transcript of Feline Foamy Virus: the splice acceptor site of the pol transcript is located in Gag of Foamy Viruses. *J. Virol.* 70, S. 9024 - 9027.
- Bodem, J., Zemba, M., und Flügel, R. M. (1998): Nuclear localization of the functional Bel 1 transactivator but not of the Gag proteins of the Feline Foamy Virus. *Virology* 251, S. 22 - 27.
- Bowzard, J. B., Bennett, R. P., Krishna, N. K., Ernst, S. M., Rein, A., und Wills, J. W. (1998): Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue. *J. Virol.* 72, S. 9034 - 9044.
- Boyer, P. L., Stenbak, C. R., Clark, P. K., Linial, M. L., und Hughes, S. H. (2004): Characterization of the Polymerase and RNase H activities of Human Foamy Virus Reverse Transcriptase. *J. Virol.* 78, S. 6112 - 6121.
- Böttcher, B., Wynne, S. A., und Crowther, R. A. (1997): Determination of the fold of the core protein of Hepatitis B Virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386, S. 88 - 91.
- Briggs, J. A. G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H. G., und Fuller, S. D. (2003): Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 22, S. 1707 - 1715.
- Briggs, J. A. G., Simon, M. N., Gross, I., Kräusslich, H. G., Fuller, S. D., Vogt, V. M., und Johnson, M. C. (2004): The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, S. 672 - 675.

- Brown, P. O. (1997): Integration. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): Retroviruses. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 161 - 204.
- Brugge, J. S., und Erickson, R. L. (1977): Identification of a transformation-specific antigen induced by Avian Sarcoma Virus. *Nature* 269, S. 346 - 348.
- Bryant, M., und Ratner, L. (1990): Myristoylation-Dependent Replication and Assembly of Human Immunodeficiency Virus 1. *PNAS* 87, S. 523 - 527.
- Callahan, M. E., und Wills, J. W. (2000): Repositioning basic residues in the M Domain of the Rous Sarcoma Virus Gag protein. *J. Virol.* 74, S. 11222 - 11229.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., und Kim, P. S. (1997): Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, S. 263 - 273.
- Chermann, J. C. (2001): A brief reflection on the development of human retrovirology: the past, the present and the future. *J. Hum. Virol.* 4, S. 289 - 295.
- Choi, G., Park, S., Choi, B., Hong, S., Lee, J., Hunter, E, und Rhee, S. S. (1999): Identification of a Cytoplasmic Targeting/Retention Signal in a Retroviral Gag Polyprotein. *J. Virol.* 73, S. 5431 - 5437.
- Christophe, D., Christophe-Hobertus, C., und Pichon, B. (2000): Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal.* 12, S. 337 - 341.
- Clark, J. M. (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16, S. 9677 - 9686.
- Coffin, J. M. (1986): Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* 46, S. 1 - 4.
- Cole, C. N. (1996): Polyomavirinae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. (Hrsg.): *Fundamental Virology*. 3. Auflage, Lipcott, Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 917 - 945.
- Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., und Steven, A. C. (1997): Visualization of the 4-helix bundle in the Hepatitis B Virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature* 386, S. 91 - 94.
- Cosson, P. (1996): Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* 15, S. 5783 - 5788.
- Craven, R. C., und Parent, L. J. (1996): Dynamic interactions of the Gag polyprotein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, S. 65 - 94.
- Delelis, O., Saib, A. und Sonigo, P. (2003): Biphasic DNA Synthesis in Spumaviruses. *J. Virol.* 77, S. 8141 - 8146.
- Deminie, C. A., und Emerman, M. (1993): Incorporation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag proteins into Murine Leukemia Virus virions. *J. Virol.* 67, S. 6499 - 6506.
- Deminie, C. A., und Emerman, M. (1994): Functional exchange of an oncoretrovirus and a lentivirus matrix protein. *J. Virol.* 68, S. 4442 - 4449.
- Demirov, D. G., und Freed, E. O. (2004): Retrovirus budding. *Virus Res.* 106, S. 87 - 102.
- Dickson, C. R., Eisenman, F. F., Hunter, E., und Teich, N. (1984): Protein biosynthesis and assembly. In: Weiss, R. : *Molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses* 1. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 513 - 648.

- Dinman, J. D. und Wickner, R. B. (1992): Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J. Virol.* 66, S. 3669 - 3676.
- Dorfman, T., Mammano, W., Haseltine, W. A., und Göttlinger, H. G. (1994): Role of the matrix protein in the virion association of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 68, S. 1689 - 1696.
- Duda, A., Stange, A., Lüftenegger, D., Stanke, N., Westphal, D., Pietschmann, T., Eastman, S. W., Linial, M. L., Rethwilm, A., und Lindemann, D. (2004): Prototype Foamy Virus envelope glycoprotein leader peptide processing is mediated by a furin-like cellular protease, but cleavage is not essential for viral infectivity. *J. Virol.* 78, S. 13865 - 13870.
- Dunbar, B. S. (1994): Protein blotting - a practical approach. 1. Aufl., Oxford University Press, Oxford.
- Eastman, S. W., und Linial, M. L. (2001): Identification of a conserved residue of Foamy Virus Gag required for intracellular capsid assembly. *J. Virol.* 75, S. 6857 - 6864.
- Einfeld, D., und Hunter, E. (1991): Transport of membrane proteins to the cell surface. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170, S. 107 -139.
- Ellermann, V. und Bang, O. (1908): Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46, S. 595 - 609.
- Enders, J. F. und Peebles, T. C. (1954): Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, S. 277 - 286.
- Enssle, J., Jordan, I., Mauer, B., und Rethwilm, A. (1996): Foamy Virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein. *PNAS* 93, S. 4137 - 4141.
- Enssle, J., Fischer, N., Moebes, A., Mauer, B., Smola, U., und 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, S. 7312 - 7317.
- Falcone, V., Schweizer, M., und Neumann-Haefelin, D. (2003): Replication of primate Foamy Viruses in natural und experimental hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 161-180.
- Felsenstein, K. M. und Goff, S. P. (1988): Expression of the Gag-Pol fusion protein of Moloney Murine Leukemia Virus without Gag protein. *J. Virol.* 62, S. 2179 - 2182.
- Fischer, N., Heinkelein, M., Lindemann, D., Enssle, J., Baum, C., Werder, E., Zentgraf, H., Müller, J. G., und Rethwilm, A. (1998): Foamy Virus particle formation. *J. Virol.* 72, S. 1610 - 1615.
- Flügel, R. M. und Pfrepper, K. I. (2003): Proteolytic processing of Foamy Virus Gag und Pol proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 63 - 88.
- Freed, E. O., Orenstein, J. M., Buckler-White, A. J., und Martin, M. A. (1994): Single amino acid changes in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 matrix protein block virus particle production. *J. Virol.* 68, S. 5311 - 5320.
- Freed, E. O., und Martin, M. A. (1995): Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 matrix. *J. Virol.* 69, S. 1984 - 1989.
- Freed, E. O., und Martin, M. A. (1996): Domains of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 matrix und gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.* 70, S. 341 - 351.

- Freed, E. O. (2002): Viral Late Domains. *J. Virol.* 76, S. 4679 - 4687.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., und Safai, B. (1984): Frequent detection und isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS und at risk for AIDS. *Science* 224, S. 500 - 503.
- Ganem, D. (1991): Assembly of hepadnaviral virions und subviral particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 168, S. 61 - 83.
- Ganem, D., und Schneider, R. J. (2001): Hepadnaviridae: the viruses und their replication. In: Knipe, D. M. und Howley, P. M. (Hrsg.): *Fields – Virology*. 3. Aufl., Lippincott, Williams und Wilkins, Philadelphia.
- Garoff, H., Hewson, R., und Opstelten, D. J. (1998): Virus maturation by budding. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, S. 1171 - 1190.
- Garrett, E. D., He, F., Bogerd, H. P., und Cullen, B. R. (1993): Transcriptional trans activators of Human and Simian Foamy Viruses contain a small, highly conserved activation domain. *J. Virol.* 67, S. 6824 - 6827.
- Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., und Rich, R. L. (2001): Tsg101 und the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding. *Cell* 107, S. 55 - 65.
- Geiselhart, V., Schwantes, A., Baston, P., Frech, M., und Löchelt, M. (2003): Features of the Env leader protein und the N-terminal Gag domain of Feline Foamy Virus important for virus morphogenesis. *Virology* 310, S. 235-244.
- Geiselhart, V., Bastone, P., Kempf, T., Schnolzer, M., und Löchelt, M. (2004): Furin-mediated cleavage of the Feline Foamy Virus Env leader protein. *J. Virol.* 78, S. 13573 - 13581.
- Gilboa, E. (1990): Retroviral gene transfer: applications to human therapy. *Prog. Clin. Biol. Res.* 352, S. 301-311.
- Giron, M. L., Colas, S., Wybier, J., Rozain, F., und Emanoil, R. R. (1997): Expression und maturation of Human Foamy Virus Gag precursor polypeptides. *J. Virol.* 71, S. 1635 - 1639.
- Giron, M. L., de The, H., und Saib, A. (1998): An evolutionarily conserved splice generates a secreted Env-Bet fusion protein during Human Foamy Virus infection. *J. Virol.* 72, S. 4906 - 4910.
- Goepfert, P. A., Wang, G., und Mulligan, M. J. (1995): Identification of an ER retrieval signal in a retroviral glycoprotein. *Cell* 82, S. 543 - 544.
- Goepfert, P. A., Shaw, K. L., Ritter, G. D., und Mulligan, M. J. (1997): A sorting motif localizes the Foamy Virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 71, S. 778 - 784.
- Goepfert, P. A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B. H., und Mulligan, M. J. (1999): An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions Human Foamy Virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J. Virol.* 73, S. 7210 - 7217.
- Gonzales, S. A., Affranchino, J. L., Gelderblom, H. R., und Burny, A. (1993): Assembly of the matrix protein of Simian Immunodeficiency Virus into virus-like particles. *Virology* 194, S. 548 - 556.
- Gorelick, R. J., Nigida, S. M., Bess, J. W., Arthur, L. O., Henderson, L. E., und Rein, A. (1990): Noninfectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J. Virol.* 64, S. 3207 - 3211.

- Göttlinger, H. G., Sodroski, J. G., und Haseltine, W. A. (1989): Role of capsid precursor processing und myristoylation in morphogenesis und infectivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1. PNAS 90, S. 7381 - 7385.
- Griffin, H. G., und Griffin, A. M. (1994): PCR technology: current innovations. 1. Aufl., CRC Press, London, Tokyo.
- Hahn, H., Baunach, G., Brautigam, S., Mergia, A., Neumann-Haefelin D., Daniel, M. D., McClure, M. O., und Rethwilm, A. (1994): Reactivity of primate sera to Foamy Virus Gag und Bet proteins. J. Gen. Virol. 75, S. 2635 - 2644.
- Hammarstedt, M., Wallengren, K., Pedersen, K. W., Roos, N., und Garoff, H. (2000): Minimal exclusion of plasma membrane proteins during retroviral envelope formation. PNAS 97, S. 7527 - 7532.
- Hammarstedt, M., und Garoff, H. (2004): Passive und active inclusion of host proteins in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag particles during budding at the plasma membrane. J. Virol. 78, S. 5686 - 5697.
- Harris, M. E., und Hope, T. J. (2000): RNA export: insights from viral models. Essays Biochem. 36, S. 115 - 127.
- Harris, R. S., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Malim, M. H., und Neuberger, M. S. (2003): DNA deamination: not just a trigger for antibody diversification but also a mechanism for defence against retroviruses. Nat. Immunol. 4, S. 641 - 643.
- Hatton, T., Zhou, S., und Stundring, D. N. (1992): RNA- und DNA-binding activities in Hepatitis B Virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. J. Virol. 66, S. 5232 - 5241.
- Hayman, M. J. (1978): Viral polyproteins in chick embryo fibroblasts infected with Avian Sarcoma Leukosis Viruses. Virology 85, S. 241 - 252.
- He, F., Blair, W. S., Fukushima, J., und Cullen, B. R. (1996): The Human Foamy Virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein. J. Virol. 70, S. 3902 - 3908.
- Heinkelein, M., Pietschmann, T., Jarmy, G., Dressler, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., Bock, M., Moebes, A., Roy, J., Herchenröder, O., und Rethwilm, A. (1998): Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome. EMBO J. 19, S. 3436 - 3445.
- Heinkelein, M., Thurow, J., Dressler, M., Imrich, H., Neumann-Haefelin, D., McClure, M. O., und Rethwilm, A. (2000): Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate Foamy Virus on viral gene expression und RNA packaging. J. Virol. 74, S. 3141 - 3148.
- Heinkelein, M., Dressler, M., Jarmy, G., Rammling, M., Imrich, H., Thurow, J., Lindemann, D., und Rethwilm, A. (2002a): Improved Primate Foamy Virus vectors und packaging constructs. J. Virol. 76, S. 3774 - 3783.
- Heinkelein, M., Leurs, C., Rammling, M., Peters, K., Hanenberg, H., und Rethwilm, A. (2002b): Pregenomic RNA is required for efficient incorporation of Pol polyprotein into Foamy Virus capsids. J. Virol. 76, S. 10069 - 10073.
- Henderson, L. E., Krutzsch, H. C., und Oroszlan, S. (1983): Myristyl amino terminal acylation of murine retrovirus proteins: an unusual post translational protein modification. PNAS 80, S. 339 - 443.

- Heneine, W., Switzer, W. M., Sundstrom, P., Brown, J., Vedapuri, S., Schable, C. A., Khan, A. S., Lerche, N. W., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., Chapman, L. E., und Folks, T. M. (1998): Identification of a human population infected with Simian Foamy Viruses [see comments]. *Nat-Med.* 4, S. 403 - 407.
- Heneine, W., Schweizer, M., Sundstrom, P., und Folks, T. (2003): Human infection with Foamy Viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 181 - 196.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A., und Luciw, P. A. (1994): Isolation, cloning, and sequencing of Simian Foamy Viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to Human Foamy Virus (HFV). *Virology* 201, S. 187 - 199.
- Herchenröder, O., Turek, R., Neumann-Haefelin, D., Rethwilm, A., und 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, S. 685 - 689.
- Hill, C. L., Bieniasz, P. D., und McClure, M. O. (1999): Properties of Human Foamy Virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J. Gen. Virol.* 80, S. 2003 - 2009.
- Holzschu, D. L., Delaney, M. A., Renshaw, R. W., und Casey, J. W. (1998): The nucleotide sequence and spliced pol mRNA levels of the nonprimate spumavirus Bovine Foamy Virus. *J. Virol.* 72, S. 2177 - 2182.
- Hooks, J. J., Gibbs, C. J., Jr., Cutchins, E. C., Rogers, N. G., Lampert, P., und Gajdusek, D. C. (1972): Characterization and distribution of two new Foamy Viruses isolated from chimpanzees. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 38, S. 38 - 55.
- Hooks, J. J., Gibbs, C. J., Chou, S., Howk, R., Lewis, M., und Gajdusek, D. C. (1973): Isolation of a new Simian Foamy Virus from a spider monkey brain culture. *Infect. Immun.* 8, S. 804 - 813.
- Hooks, J. J. und Gibbs, C. J. (1975): The Foamy Viruses. *Bacteriol. Rev.* 39, S. 169 - 185.
- Hunter, T., und Senfton, B. M. (1980): Transforming gene product of Rous Sarcoma Virus phosphorylates tyrosin. *PNAS* 77, S. 1311 - 1315.
- Hunter, E., und Swanstrom, R. (1990): Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 157, S. 187 - 253.
- Hunter, E. (1997): Viral entry and receptors. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 71 - 120.
- Imrich, H., Heinkelein, M., Herchenröder, O., und Rethwilm, A. (2000): Primate Foamy Virus Pol proteins are imported into the nucleus. *J. Gen. Virol.* 81, S. 2941 - 2947.
- Jamjoom, G. A., Naso, R. B., und Arlinghaus, R. B. (1977): Further characterization of intracellular precursor polyproteins of Rauscher Leukemia Virus. *Virology* 78, S. 11-34.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A., und Stunnenberg, H. G. (1991): Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *PNAS* 88, S. 8972 - 8976.
- Johnston, P. B. (1961): A second immunologic type of Simian Foamy Virus: monkey throat infections and unmasking by both types. *J. Infect. Dis.* 109: S. 1-9.

- Johnston, P. B. (1971): Taxonomic features of seven serotypes of simian and ape Foamy Viruses. *Infect. Immun.* 3, S. 793 - 799.
- Jordan, I., Enssle, J., Guttler, E., Mauer, B., und Rethwilm, A. (1996): Expression of Human Foamy Virus reverse transcriptase involves a spliced pol mRNA. *Virology* 224, S. 314 - 319.
- Julias, J. G., Ferris, A. L., Boyer, P. L., und Hughes, S. H. (2001): Replication of phenotypically mixed Human Immunodeficiency Virus Type 1 virions containing catalytically active and catalytically inactive reverse transcriptase. *J. Virol.* 75, S. 6537 - 6546.
- Karacostas, V., Wolffe, E. J., Nagashima, K., Gonda, M. A., und Moss, B. (1993): Overexpression of the HIV-1 Gag-Pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* 193, S. 661 - 671.
- Kawakami, K., Punde, S., Faiola, B., Moore, D. P., Boeke, J. D., Farabaugh, P. J., Strathern, J. N., Nakamura, Y., und Garfinkel, D. J. (1993): A rare tRNA-Arg (CCU) that regulates Ty1 element ribosomal frameshifting is essential for Ty1 retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 135, S. 309-320.
- Keller, A., Partin, K. M., Löchelt, M., Bannert, H., Flügel, R. M. und Cullen B. R. (1991): Characterization of the transcriptional trans activator of Human Foamy Retrovirus. *J. Virol.* 65, S. 2589 - 2594.
- Kneller, D. G., Cohen, F. E., and Langridge, R. (1990): Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network. *J. Mol. Biol.* 214, S. 171 - 182.
- Konvalinka, J., Löchelt, M., Zentgraf, H., Flügel, R. M., und Kräusslich, H. G. (1995): Active Foamy Virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein. *J. Virol.* 69, S. 7264 - 7268.
- Kräusslich, H. G., Facke, M., Heuser, A. M., Konvalinka, J., und Zentgraf, H. (1995): The spacer peptide between Human Immunodeficiency Virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J. Virol.* 69, S. 3407 - 3419.
- Kräusslich, H. G. und Welker, R. (1996): Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, S. 25 – 63.
- La Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., und Brunak, S. (2004): Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, S. 527 - 536.
- Lecellier, C. H., Neves, M., Giron, M. L., Tobaly-Tapiero, J., und Saib, A. (2002): Further characterization of Equine Foamy Virus reveals unusual features among the Foamy Viruses. *J. Virol.* 76, S. 7220 - 7227.
- Lee, P. P., und Linial, M. L. (1994): Efficient particle formation can occur if the matrix domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag is substituted by a myristylation signal. *J. Virol.* 68, S. 6644 - 6654.
- Lehmann-Che, J., Giron, M. L., Delelis, O., Löchelt, M., Bittoun, P., Tobaly-Tapiero, J., de The, H., und Saib, A. (2005): Protease-dependent uncoating of a complex retrovirus. *J. Virol.* 79, S. 9244 - 9253.
- Li, X., Yuan, B., und Goff, S. P. (1997): Genetic analysis of interactions between Gag proteins of Rous Sarcoma Virus. *J. Virol.* 71, S. 5624 - 5630.

- Lindemann, D., Bock, M., Schweizer, M., und Rethwilm, A. (1997): Efficient pseudotyping of Murine Leukemia Virus particles with chimeric Human Foamy Virus envelope proteins. *J. Virol.* 71, S. 4815 - 4820.
- Lindemann, D., und Rethwilm, A. (1998): Characterization of a Human Foamy Virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing. *J. Virol.* , 72, S. 4088 - 4094.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H., und Rethwilm, A. (2001): A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J. Virol.* 75, S. 5762 - 5771.
- Lindemann, D., und Goepfert, P. A. (2003): The Foamy Virus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 111 - 129.
- Linial, M. L. (1999): Foamy Viruses are unconventional retroviruses. *J. Virol.* 73, S. 1747 - 1755.
- Linial, M. L. und Eastman, S. W. (2003): Particle assembly and genome packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 89 - 110.
- Löchelt, M., Aboud, M., und Flügel, R. M. (1993): Increase in the basal transcriptional activity of the Human Foamy Virus internal promoter by the homologous long terminal repeat promoter in cis. *Nucleic. Acids Res.* 11, S. 4226 - 4230.
- Löchelt, M., und Flügel, R. M. (1996): The Human Foamy Virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein. *J. Virol.* 70, S. 1033 - 1040.
- Löchelt, M. (2003): Foamy Virus transactivation and gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 27-61.
- Löchelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y. B., Truyen, U., Rosler, U., Battenberg, M., Saib, A., Flory, E., Cichutek, K., und Munk, C. (2005): The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the Foamy Virus accessory Bet protein. *PNAS* 102, S. 7982 - 7987.
- Lodge, R., Göttlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, E. A., und Lemay, G. (1994): The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* 68, S. 4857 - 4861.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudeira, P., und Darnell, J. (1995): *Molecular Cell Biology*. 3. Aufl., Freeman and Company, New York, Basingstoke.
- Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpan, G. V., und Goff, S. P. (1993): Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73, S. 1067 - 1078.
- Lüftenegger, D., Picard-Maureau, M., Stanke, N., Rethwilm, A., und Lindemann, D. (2005): Analysis and function of Prototype Foamy Virus envelope N glycosylation. *J. Virol.* 79, S. 7664 - 7672.
- Lupas, A. (1996): Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* 266, S. 513 - 525.
- Lupas, A., Van Dyke, M., und Stock, J. (1991): Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, S. 1162 - 1164.
- Malmquist, W. A., Van der Maaten, M. J., und Boothe, A. D. (1969): Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence, and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.* 29, S. 188 - 200.

- Marczynska, B., Jones, C. J., und Wolfe, L. G. (1981): Syncytium-forming virus of common marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*). *Infect. Immun.* 31, S. 1261 - 1269.
- Martin-Serrano, J., Perez-Caballero, D., und Bieniasz, P. D. (2004): Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J. Virol.* 78, S. 5554 - 5563.
- Maurer, B., Bannert, H., Darau, G., und Flügel, R. M. (1988): Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the *gag* and *pol* genes of Human Spumaretrovirus. *J. Virol.* 62, S. 1590 - 1597.
- McClelland, J. L., und Rumelhart, D. E. (1988): Explorations in the microstructure of cognition: A handbook of models, programs, and exercises. 1. Aufl., MIT Press, Cambridge, MA (USA).
- McClure, M. O., Bieniasz, P. D., Schulz, T. F., Chrystie, I. L., Simpson, G., Aguzzi, A., Hoad, J. G., Cunningham, A., Kirkwood, J., und Weiss, R. A. (1994): Isolation of a new foamy retrovirus from orangutans. *J. Virol.* 68, S. 7124 - 7130.
- Meiering, C. D., und Linial, M. L. (2001): Historical perspective of Foamy Virus epidemiology and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, S. 165 - 176.
- Mergia, A., Shaw, K. E., Pratt, L. E., Barry, P. A., und Luciw, P. A. (1990): Simian Foamy Virus Type 1 is a retrovirus which encodes a transcriptional transactivator. *J. Virol.* 64, S. 3598 - 3604.
- Mergia, A. und Heinkelein, M. (2003): Foamy Virus vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 131 - 159.
- Merril, C. R. (1990): Gel staining techniques. In: Deutscher, M. P. (Hrg.): Guide to protein purification. 1. Aufl., Academic Press, San Diego, S. 477 - 487.
- Meyer, B. E., Meinkoth, J. L., und Malim, M. H. (1996): Nuclear transport of Human Immunodeficiency Virus Type 1, Visna Virus, and Equine Infectious Anemia Virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J. Virol.* 70, S. 2350 - 2359.
- Modrow, S., Falke, D., und Truyen, U. (2003): Molekulare Virologie. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O., und Rethwilm, A. (1997): Human Foamy Virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J. Virol.* 71, S. 7305 - 7311.
- Morikawa, Y., Kishi, T., Zhang, W. H., Nermut, M. V., Hockley, D. J. und Jones, I. M. (1995): A molecular determinant of human immunodeficiency virus particle assembly located in matrix antigen p17. *J. Virol.* 69, S. 4519 - 4523.
- Morikawa, Y., Hockley, D. J., Nermut, M. V., und Jones, I. M. (2000): Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag assembly. *J. Virol.* 74, S. 16 - 23.
- Moroianu, J. (1999): Nuclear import and export pathways. *J. Cell Biochem., Suppl.* 32 - 33, S. 76 - 83.
- Morozov, V. A., Copelund, T. D., Nagashima, K., Gonda, M. A., und Oroszlan, S. (1997): Protein composition and morphology of Human Foamy Virus intracellular cores and extracellular particles. *Virology* 228, S. 307 - 317.
- Muranyi, W., und Flügel, R. M. (1991): Analysis of splicing patterns of Human Spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures. *J. Virol.* 65, S. 727 - 735.

- Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., und Rein, A. (2001): RNA is a structural element in retrovirus particles. *PNAS* 98, S. 5246 - 5251.
- 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, S. 4107 - 4116.
- Nassal, M., und Schaller, H. (1993): Hepatitis B Virus replication. *Trends Microbiol.* 1, S. 221 - 228.
- Nelle, T. D. und Wills, J. W. (1996): A large region within the Rous sarcoma virus matrix protein is dispensable for budding and infectivity. *J. Virol.* 70, S. 2269 - 2276.
- Netzer, K. O., Rethwilm, A., Maurer, B., und ter, Meulen, V. (1990): Identification of the major immunogenic structural proteins of Human Foamy Virus. *J. Gen. Virol.* 71, S. 1237 - 1241.
- Neumann-Haefelin, D., Fleps, U., Renne, R., und Schweizer, M. (1993): Foamy Viruses. *Intervirolology* 35, S. 196 - 207.
- Ono, A. und Freed, E. O. (1999): Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J. Virol.* 73, S. 4136 - 4144.
- Ono, A., Orenstein, J. M., und Freed, E. O. (2000): Role of the Gag matrix domain in targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 assembly. *J. Virol.* 74, S. 2855 - 2866.
- Ono, A. und Freed, E. O. (2004): Cell-type-dependent targeting of Human Immunodeficiency Virus Type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J. Virol.* 78, S. 1552 - 1563.
- Oppermann, H., Bishop, J. M., Varmus, H. E., und Levintow, L. (1977): A joint produce of the genes gag and pol of Avian Sarcoma Virus: a possible precursor of reverse transcriptase. *Cell* 12, S. 993 - 1005.
- Orlova, M., Yueh, A., Leung, J., und Goff, S. P. (2003): Reverse transcriptase of Moloney Murine Leukemia Virus binds to eukaryotic release factor 1 to modulate suppression of translational termination. *Cell* 115, S. 319 - 331.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Sowder, R. C., Adams, J., und Schubert, U. (2003): Retroviruses have differing requirements for proteasome function in the budding process. *J. Virol.* 77, S. 3384 - 3393.
- Owens, R. J., Dubay, J. W., Hunter, E., und Compans, R. W. (1991): Human Immunodeficiency Virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *PNAS* 88, S. 3987-3991.
- Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., Montelaro, R. C., und Wills, J. W. (1995): Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous Sarcoma Virus and Human Immunodeficiency Virus Gag proteins. *J. Virol.* 69, S. 5455 - 5460.
- Parent, L. J., Wilson, C. B., Resh, M. D., und Wills, J. W. (1996): Evidence for a second function of the MA sequence in the Rous Sarcoma Virus Gag protein. *J. Virol.* 70, S. 1016 - 1026.
- Park, J., und Morrow, C. D. (1991): Overexpression of the gag-pol precursor from Human Immunodeficiency Virus Type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production. *J. Virol.* 65, S. 5111 - 5117.

- Parker, S. D., Wall, J. S., und Hunter, E. (2001): Analysis of Mason-Pfizer Monkey Virus Gag particles by scanning transmission electron microscopy. *J. Virol.* 75, S. 9543 - 9548.
- Patton, G. S., Morris, S. A., Chung, W., Bieniasz, P. D., und McClure, M. O. (2005): Identification of domains in Gag important for Prototypic Foamy Virus egress. *J. Virol.* 79, S. 6392 - 6399.
- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., und Marsh, M. (2003): Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* 162, S. 443 - 455.
- Pelchen-Matthews, A., Raposo, G., und Marsh, M. (2004): Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* 12, S. 310 - 316.
- Petit, C., Giron, M. L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., de The, H., und Saib, A. (2003): Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J. Cell Science* 16, S. 3433 - 3442.
- Pfrepper, K. I., Rackwitz, H. R., Schnolzer, M., Heid, H., Lochelt, M., und 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, S. 7648 - 7652.
- Pfrepper, K. I., Löchelt, M., Rackwitz, H. R., Schnolzer, M., Heid, H., und Flügel, R. M. (1999): Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of Human Spumavirus. *J. Virol.* 73, S. 7907 - 7911.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., und Lindemann, D. (2003): Foamy Virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *J. Virol.* 77, S. 4722 - 4730.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A., und Lindemann, D. (1999): Foamy Virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J. Virol.* 73, S. 2613 - 2621.
- Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A., und 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, S. 4474 - 4482.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., und Gallo, R. C. (1980): Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *PNAS* 77, S. 7415 - 7419.
- Rabson, A. B., und Graves, B. J. (1997): Synthesis and Processing of viral RNA. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 205 - 262.
- Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R. und Göttlinger, H. G. (1998): Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J.* 17, S. 2699 - 2708.
- Rein, A., McClure, M. R., Rice, N. R., Luftig, R. B., und Schultz, A. M. (1986): Myristylation site in pr65^{Gag} is essential for virus particle formation by Moloney Murine Leukemia Virus. *PNAS* 83, S. 7246 - 7250.
- Rein, A. (1994): Retroviral RNA packaging: a review. *Arch. Virol. Suppl.* 9, S. 513 - 522.
- Renne, R., Friedl, E., Schweizer, M., Fleps, U., Turek, R., und Neumann-Haefelin, D. (1992): Genomic organization and expression of Simian Foamy Virus Type 3 (SFV-3). *Virology* 186, S. 597 - 608.

- Rethwilm, A., Baunach, G., Netzer, K. O., Maurer, B., Borisch, B., und ter Meulen, V. (1990): Infectious DNA of the Human Spumaretrovirus. *Nucleic Acids Res.* 18, S. 733 - 738.
- Rethwilm, A., Erlwein, O., Baunach, G., Maurer, B., und ter Meulen, V. (1991): The transcriptional transactivator of Human Foamy Virus maps to the bel 1 genomic region. *PNAS* 88, S. 941 - 945.
- Rethwilm, A. (1995): Regulation of Foamy Virus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 1 - 24.
- Rethwilm, A. (2003): The replication strategy of Foamy Viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 277, S. 1-26.
- Rhee, S. S., und Hunter, E. (1987): Myristilation is required for intracellular transport but not for assembly of D-type retrovirus capsid. *J. Virol.* 61, S. 1046 - 1053.
- Rhee, S. S., und Hunter, E. (1990): 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, S. 77 - 86.
- Rhodes-Feuillette, A., Saal, F., Lasneret, J., Dubouch, P., und Peries, J. (1979): Isolation and characterization of a new Simian Foamy Virus serotype from lymphocytes of a *Papio cynocephalus* baboon. *J. Med. Primatol.* 8, S. 308 - 320.
- Riggs, J. L., Oshiro, L. S., Taylor, D. O., und Lennette, E. H. (1969): Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature* 222, S. 1190 - 1191.
- Rinke, C. S., Boyer, P. L., Sullivan, M. D., Hughes, S. H., und Linial, M. L. (2002): Mutation of the catalytic domain of the Foamy Virus reverse transcriptase leads to loss of processivity and infectivity. *J. Virol.* 76, S. 7560 - 7570.
- Rogers, N. G., Basnight, M., Gibbs, C. J., und Gajdusek, D. C. (1967): Latent viruses in chimpanzees with experimental kuru. *Nature* 216, S. 446 - 449.
- Rosenberg, N., und Jolicoeur, P. (1997): Retroviral Pathogenesis. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 475 - 586.
- Rous, P. (1911): A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13, S. 397 - 411.
- Roy, J., Rudolph, W., Juretzek, T., Gärtner, K., Bock, M., Herchenröder, O., Lindemann, D., Heinkelein, M., und Rethwilm, A. (2003): Feline Foamy Virus genome and replication strategy. *J. Virol.* 77, S. 11324 - 11331.
- Russell, R. A., Zeng, Y., Erlwein, O., Cullen, B. R., und McClure, M. O. (2001): The R region found in the Human Foamy Virus long terminal repeat is critical for both Gag and Pol protein expression. *J. Virol.* 75, S. 6817 - 6824.
- Russell, R. A., Wiegund, H. L., Moore, M. D., Schafer, A., McClure, M. O., und Cullen, B. R. (2005): Foamy Virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defence factors. *J. Virol.* 79, S. 8724 - 8731.
- Rustigian, R., Johnston, P., und Reihart, H. (1955): Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88, S. 8 - 16.
- Saib, A., Puvion, D. F., Schmid, M., Peries, J., und de The, H. (1997): Nuclear targeting of incoming Human Foamy Virus Gag proteins involves a centriolar step. *J. Virol.* 71, S. 1155 - 1161.

- Sandstrom, P. A., Phan, K. O., Switzer, W. M., Fredeking, T., Chapman, L., Heneine, W., und Folks, T. M. (2000): Simian Foamy Virus infection among zoo keepers. *Lancet* 355, S. 551 - 552.
- Seeger, C., und Hu, J. (1997): Why are hepadnaviruses DNA and not RNA viruses? *Trends Microbiol.* 5, S. 447 - 450.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987): Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, S. 368 - 379.
- Scheifele, L. Z., Garbitt, R. A., Rhoads, J. D., und Parent, L. J. (2002): Nuclear entry and CRM1-dependent nuclear export of the Rous Sarcoma Virus Gag polyprotein. *PNAS* 99, S. 3944 - 3949.
- Scheifele, L. Z., Ryan, E. P., und Parent, L. J. (2005): Detailed mapping of the nuclear export signal in the Rous Sarcoma Virus Gag protein. *J. Virol.* 79, S. 8732 - 8741.
- Schliephake, A. W. und Rethwilm, A. (1994): Nuclear localization of Foamy Virus Gag precursor protein. *J. Virol.* 68, S. 4946 - 4954.
- Schmidt, M., und Rethwilm, A. (1995): Replicating Foamy Virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* 20, S. 167 - 178.
- Schmidt, M., Herchenröder, O., Heeney, J., und Rethwilm, A. (1997): Long terminal repeat U3 length polymorphism of Human Foamy Virus. *Virology* 230, S. 167 - 178.
- Schweizer, M., Turek, R., Hahn, H., Schliephake, A., Netzer, K. O., Eder, G., Reinhardt, M., Rethwilm, A., und 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, S. 161 - 170.
- Schweizer, M., Falcone, V., Gange, J., Turek, R., und Neumann-Haefelin, D. (1997): Simian Foamy Virus isolated from an accidentally infected human individual. *J. Virol.* 71, S. 4821 - 4824.
- Sfakianos, J. N., LaCasse, R. A., und Hunter, E. (2003a): The M-PMV Cytoplasmic Targeting-Retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic* 4, S. 660 - 670.
- Sfakianos, Jeffrey N., LaCasse, R. A., und Hunter, E. (2003b): M-PMV Capsid Transport Is Mediated by Env/Gag Interactions at the Pericentriolar Recycling Endosome. *Traffic* 4, S. 671 - 680.
- Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M., und Mak, J. (2001): Maintenance of the Gag/Gag-Pol Ratio Is Important for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Dimerization and Viral Infectivity. *J. Virol.* 75, S. 1834 - 1841.
- Shehu-Xhilaga, M., Lee, J. Y., Campbell, S., Marshall, J. A., Crowe, S. M., und Mak, J. (2002): Overexpression and incorporation of GagPol precursor does not impede packaging of HIV-1 tRNA(Lys3) but promotes intracellular budding of virus-like particles. *J. Biomed. Sci.* 9, S. 697 - 705.
- Shikova-Lekova, E., Lindemann, D., Pietschmann, T., Juretzek, T., Rudolph, W., Herchenröder, O., Gelderblom, H. R., und Rethwilm, A. (2003): Replication-Competent Hybrids between Murine Leukemia Virus and Foamy Virus. *J. Virol.* 77, S. 7677 - 7681.
- Simon, S. M. und Blobel, G. (1993): Mechanisms of translocation of proteins across membranes. *Subcell. Biochem.* 21, S. 1 - 15.

- Smith, A. J., Cho, M. I., Hammarskjold, M. L., und Rekosh, D. (1990): Human Immunodeficiency Virus Type 1 pr55 *gag* and pr160 *gag-pol* expressed from a Simian Virus 40 late replacement vector are efficiently processed and assembled into virus-like particles. *J. Virol.* 64, S. 2743 - 2750.
- Smith, A. J., Srinivasakumar, N., Hammarskjold, M. L., und Rekosh, D. (1993): Requirements for the incorporation of pr160 *gag-pol* from Human Immunodeficiency Virus Type 1 into virus-like particles. *J. Virol.* 67, S. 2266 - 2275.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., und Kingsman, A. J. (1995): A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* 23, S. 628 - 633.
- Srinivasakumar, N., Hammarskjold, M. L., und Rekosh, D. (1995): Characterization of deletion mutations in the capsid region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 that affect particle formation and Gag- Pol precursor incorporation. *J. Virol.* 69, S. 6106 - 6114.
- Stange, A., Mannigel, I., Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Göttlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H., und Lindemann, D. (2005): Characterization of Prototype Foamy Virus Gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *J. Virol.* 79, S. 5466 - 5476.
- Stenbak, C. R. und Linial, M. L. (2004): Role of the C-terminus of Foamy Virus Gag in RNA packaging and Pol expression. *J. Virol.* 78, S. 9423 - 9430.
- Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B., Xie, Y., und Chen, I. S. (1999): Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells. *PNAS* 96, S. 12039 - 12043.
- Stiles, G. E., Bittle, J. L., und Cabasso, V. J. (1964): Comparison of Simian Foamy Virus strains including a new serological type. *Nature* 201, S. 1350 - 1351.
- Stroud, R. M. und Walter, P. (1999): Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, S. 754 - 759.
- Summers, J. und Mason, W. S. (1982): Replication of the genome of a Hepatitis B-Like Virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29, S. 403 - 415.
- Swanstrom, R. und Wills, J. W. (1997): Synthesis, assembly and processing of viral proteins. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 263 - 335.
- Switzer, W. M., Bhullar, V., Shanmugam, V., Cong, M. E., Parekh, B., Lerche, N. W., Yee, J. L., Ely, J. J., Boneva, R., Chapman, L. E., Folks, T. M., und Heneine, W. (2004): Frequent Simian Foamy Virus infection in persons occupationally exposed to nonhuman primates. *J. Virol.* 78, S. 2780 - 2789.
- Telesnitsky, A. und Goff, S. P. (1997): Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 121 - 160.
- Temin, H. M. (1989): Retrovirus vectors: promise and reality. *Science* 246, 933 – 983.
- Temin, H. M. und Mizutani, S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* 226, S. 1211 - 1213.

- ten Dam, E. B., Pleij, C. W., und Bosch, L. (1990): RNA pseudoknots: translational frameshifting and readthrough on viral RNAs. *Virus Genes*. 4, S. 121 - 136.
- 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., und Saib, A. (2000): Isolation and characterization of an Equine Foamy Virus. *J. Virol.* 74, S. 4064 - 4073.
- Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Giron, M. L., Neves, M., Koken, M., Saib, A., und de The, H. (2001): Human Foamy Virus capsid formation requires an interaction domain in the N-terminus of Gag. *J. Virol.* 75, S. 4367 - 4375.
- Tuttleman, J. S., Pourcel, C., und Summers, J. (1986): Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47, S. 451 - 460.
- Venkatesh, L. K. und Chinnadurai, G. (1993): The carboxy-terminal transcription enhancement region of the Human Spumaretrovirus transactivator contains discrete determinants of the activator function. *J. Virol.* 67, S. 3868 - 3876.
- Vogt, P. K. (1997a): Historical introduction to the general properties of retroviruses. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 1 - 26.
- Vogt, V. M. (1997b): Proteolytic processing and particle maturation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, S. 95 - 131.
- Vogt, V. M. (1997c): Retroviral virions and genomes. In: Coffin, J. M., Hughes, S. H., und Varmus, E. V. (Hrsg.): *Retroviruses*. 1. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. S. 27 - 70.
- Vogt, V. M. und Simon, M. N. (1999): Mass Determination of Rous Sarcoma Virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J. Virol.* 73, S. 7050 - 7055.
- Wang, C. T., Zhang, Y., McDermott, J. und Barklis, E. (1993): Conditional infectivity of a human immunodeficiency virus matrix domain deletion mutant. *J. Virol.* 67, S. 7067 - 7076.
- Wang, G. H. und Seeger, C. (1992): The reverse transcriptase of Hepatitis B Virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71, S. 663 - 670.
- Weaver, T. A., Talbot, K. J., und Panganiban, A. T. (1990): Spleen Necrosis Virus Gag polyprotein is necessary for particle assembly and release but not for proteolytic processing. *J. Virol.* 64, S. 2642 - 2652.
- Weldon, R. A. Jr. und Wills, J. W. (1993): Characterization of a small (25-kilodalton) derivative of the Rous Sarcoma Virus Gag protein competent for particle release. *J. Virol.* 67, S. 5550 - 5561.
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flügel, R. M., und Löchelt, M. (2000): The intact retroviral Env glycoprotein of Human Foamy Virus is a trimer. *J. Virol.* 74, S. 2885 - 2887.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S., Flügel, R. M., und Löchelt, M. (2001a): Specific Interaction of a novel Foamy Virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J. Virol.* 75, S. 1 - 13.
- Wilk, T., Gross, I., Gowen, B. E., Rutten, T., de Haas, F., Welker, R., Kräusslich, H. G., Boulanger, P., und Fuller, S. D. (2001b): Organization of immature Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 75, S. 759 - 771.

- Wills, J. W., Cameron, C. E., Wilson, C. B., Xiang, Y., Bennett, R. P., und Leis, J. (1994): An assembly domain of the Rous Sarcoma Virus Gag protein required late in budding. *J. Virol.* 68, S. 6605 - 6618.
- Wills, J. W., und Craven, R. C. (1991): Form, function, and use of retroviral Gag proteins. *Aids.* 5, S. 639 - 654.
- Wills, J. W., Craven, R. C., Weldon, R. A. Jr., Nelle, T. D., und Erdie, C. R. (1991): Suppression of retroviral MA deletions by the amino-terminal membrane-binding domain of p60src. *J. Virol.* 65, S. 3804 - 3812.
- Xu, H., und Boeke, J. D. (1990): Host genes that influence transposition in yeast: the abundance of a rare tRNA regulates Ty1 transposition frequency. *PNAS* 87, S. 8360 - 8364.
- Yang, P., Zemba, M., Aboud, M., Flügel, R. M., und Löchelt, M. (1997): Deletion analysis of both the long terminal repeat and the internal promoters of the Human Foamy Virus. *Virus Genes* 15, S. 17 - 23.
- Young, J. A., Bates, P., Willert, K., und Varmus, H. E. (1990): Efficient incorporation of human CD4 protein into Avian Leukosis Virus particles. *Science* 250, S. 1421 - 1423.
- Yu, F., Joshi, S. M., Ma, Y. M., Kingston, R. L., Simon, M. N., und Vogt, V. M. (2001): Characterization of Rous Sarcoma Virus Gag particles assembled in vitro. *J. Virol.* 75, S. 2753 - 2764.
- Yu, S. F., Baldwin, D. N., Gwynn, S. R., Yendapalli, S. und Linal, M. L. (1996): Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses. *Science* 271, S. 1579 - 1582.
- Yu, S. F., Edelmann, K., Strong, R. K., Moebes, A., Rethwilm, A., und Linal, M. L. (1996): The carboxyl terminus of the Human Foamy Virus Gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domains. *J. Virol.* 70, S. 8255 - 8262.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D., und Linal, M. L. (1999): Evidence that the Human Foamy Virus genome is DNA. *J. Virol.* 73, S. 1565 - 1572.
- Yu, X., Yu, Q. C., Lee, T. H., und Essex, M. (1992): The C terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *J. Virol.* 66, S. 5667 - 5670.
- Yuan, B., Campbell, S., Bacharach, E., und Goff, S. P. (2000): Infectivity of Moloney Murine Leukemia Virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J. Virol.* 74, S. 7250-7260.
- Yuan, X., Yu, X., Lee, T. H., und Essex, M. (1993): Mutations in the N-terminal region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J. Virol.* 67, S. 6387 - 6394.
- Zabransky, A., Sakalian, M., und Pichova, I. (2005): Localization of self-interacting domains within betaretrovirus Gag polyproteins. *Virology* 332, S. 659 - 666.
- Zakian, V. A. (1995): Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270, S. 1601 - 1607.
- Zemba, M., Wilk, T., Rutten, T., Wagner, A., Flügel, R. M., und Löchelt, M. (1998): The carboxy-terminal p3Gag domain of the Human Foamy Virus Gag precursor is required for efficient virus infectivity. *Virology* 247, S. 7-13.

Zhou, W., Parent, L. J., Wills, J. W., und Resh, M. D. (1994): Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* 68, S. 2556 – 2569.

7. ANHANG

7.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Struktur und Genomorganisation von Retroviren.	10
Abb. 2: Retroviraler Replikationszyklus.....	13
Abb. 3: Genom und Genexpression von PFV.	17
Abb. 4: Der foamyvirale Replikationszyklus.	20
Abb. 5: Strategien der retroviralen Partikelmorphogenese.	23
Abb. 6: Schematische Darstellung der unprozessierten Gag-Proteine von HIV-1 und PFV.	25
Abb. 7: Vektorsysteme für die Untersuchungen am PFV Gag-Protein.	67
Abb. 8: Schematische Darstellung der prokaryotischen Expressionsvektoren und der 5' Hälfte des PFV Provirus.....	81
Abb. 9: Kontrolle der in <i>E. coli</i> exprimierten und mittels IMAC aufgereinigten rekombinanten Proteine auf Verunreinigungen.	82
Abb. 10: Bestimmung der Sensitivitätsgrenze und des Linearitätsbereiches des Immunoassays.	85
Abb. 11: Vorgehensweise bei der Aufkonzentration und Isolation von PFV Virionen.	87
Abb. 12: Vorgehensweise bei der Auswertung der Immunoblots zur Bestimmung der Gag/Pol-Ratio in PFV Virionen.	88
Abb. 13: Analyse eines Dichtegradienten von PFV Partikeln.	92
Abb. 14: Analyse der Dichte und der infektiösen Titer der Gradientenfraktionen.....	93
Abb. 15: Schematische Darstellung der C-terminalen PFV Gag Deletionskonstrukte.	95
Abb. 16: Schematische Darstellung des PFV Gag-Expressionskonstruktes pCZlgag4.	97
Abb. 17: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der C-terminalen Deletionskonstrukte.....	101
Abb. 18: Analyse der Env-unabhängigen Partikelfreisetzung und der Transduktionseffizienz der C-terminalen Deletionskonstrukte.	103
Abb. 19: Schematische Darstellung der N-terminalen PFV Gag Deletionskonstrukte im Expressionsvektor pCZlgag4.....	105
Abb. 20: Analyse der N-terminalen Gag-Deletionsmutanten im Expressionsvektor pCZlgag4.....	106
Abb. 21: Schematische Darstellung des PFV Provirus pCHSRV2.	108

Abb. 22: Schematische Darstellung der PFV Gag Deletionsmutanten, die im Provirus-konstrukt pcHSRV2 hergestellt wurden.	109
Abb. 23: Analyse der proviralen Gag-Deletionsmutanten.	111
Abb. 24: Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener FV Gag-Proteine.	112
Abb. 25: Schematische Darstellung der PFV Gag Alanin-Substitutionsmutanten, die im infektiösen Proviruskonstrukt pcHSRV2 hergestellt wurden.	114
Abb. 26: Infektionsanalyse der Alanin-Substitutionsmutanten.	116
Abb. 27: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der Alanin-Substitutionsmutanten.	118
Abb. 28: Immunfluoreszenzanalyse nicht-infektiöser Alanin-Substitutionsmutanten.	119
Abb. 29: Schematische Darstellung der Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box.	121
Abb. 30: Analyse der Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box.	122
Abb. 31: Immunfluoreszenzanalyse der Alanin-Substitutionsmutanten mit deletierter GRII-Box.	124
Abb. 32: Schematische Darstellung der Alanin-Substitutionsmutanten mit src-Myristilierungssignal am N-Terminus.	126
Abb. 33: Zelluläre Expression und Partikelfreisetzung der Alanin-Substitutionsmutanten mit Myristilierungssignal.	127
Abb. 34: Infektionsanalyse der Alanin-Substitutionsmutanten mit Myristilierungssignal.	128
Abb. 35: Analyse der FFV Gag-Substitutionsmutante W38A.	130
Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit den N-terminalen Deletionsmutanten pMC1 bis -5.	133
Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit den Deletionsmutanten pMC60 Δ C297 und pcHSRV2-M93 Δ 123-199.	134
Abb. 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit den Alanin-Substitutionsmutanten in PFV Gag.	135
Abb. 39: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellkulturen transfiziert mit der FFV Gag Mutante W38A.	136
Abb. 40: Wahrscheinlichkeitsanalyse für die Ausbildung von coiled-coil-Motiven in FV Gag-Proteinen.	151
Abb. 41: Sequenzvergleich des PFV Gag Aminosäureabschnittes 43 – 60.	154
Abb. 42: Funktionelle Abschnitte im N-Terminus von PFV Gag.	159

7.2. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Klassifizierung der Familie der Retroviren (nach Rethwilm 2003, verändert).....	8
Tab. 2: Foamyvirus-Isolate und ihre Wirte (nach Meiring und Linial 2001, Falcone et al. 2003).....	15
Tab. 3: Konzentration bakteriell exprimierter PFV Gag- und Pol-Proteinlösungen nach IMAC-Aufreinigung.	84
Tab. 4: Stöchiometrische Verhältnisse der Gag/Pol-Proteinkomponenten, wie sie experimentell für aufgereinigte PFV Partikel ermittelt wurden (n = 37).	90
Tab. 5: Vergleich von Haupt- und Nebenfraktionen der ausgewerteten Gradienten.	91
Tab. 6: Lokalisation der Gag-Proteine verschiedener Mutanten und des Wildtyps im Zytoplasma (ZP) oder Zellkern (ZK) von HT1080-Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (n = 3).	123

7.3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -	=	Anti-			activated cell sorter
Abb.	=	Abbildung	FFV	=	engl. Feline Foamy Virus
AIDS	=	engl. Aquired Immuno- deficiency Syndrome	Fig.	=	Figur
AK	=	Antikörper	FKS	=	fötales Kälberserum
ALV	=	Avian Leukosis Virus	FV	=	Foamy Virus
APS	=	Ammoniumpersulfat	Gag	=	retrovirales gruppen- spezifisches Antigen
As	=	Aminosäure	gp	=	Glykoprotein
BFV	=	engl. Bovine Foamy Virus	h	=	Stunde
Bp	=	Basenpaare	HBV	=	Hepatitis B Virus
BSA	=	engl. Bovine Serum Albumin	HIV	=	engl. Human Immuno- deficiency Virus
bzw.	=	beziehungsweise	HRP	=	Meerrettich-Peroxidase
°C	=	Grad Celsius	HTLV	=	engl. Human T-cell Leukemia Virus
CA	=	retrovirales Kapsidprotein	IN	=	retrovirale Integrase
CIAP	=	engl. Calf Intestine Alkaline Phosphatase	IRES	=	engl. internal ribosomal entry site
CMV	=	Cytomegalovirus	IP	=	interner Promotor
CTRS	=	engl. Cytoplasmic Targeting/Retention Signal	kBp	=	Kilobasenpaare
DNA	=	engl. Desoxyribonucleinacid	kDa	=	Kilodalton
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>	min	=	Minute
EDTA	=	Ethylendiamin- Tetraacetat	lat.	=	lateinisch
EFV	=	engl. Equine Foamy Virus	LP	=	engl. Leader Peptide
EGFP	=	engl. Enhanced Green Fluorescent Protein	LTR	=	engl. long terminal repeat
EM	=	Elektronenmikroskop(ie)	ml	=	Milliliter
Env	=	retrovirales Hüllprotein	M	=	Molar
engl.	=	englisch	MA	=	retrovirales Matrixprotein
ER	=	Endoplasmatisches Reticulum	MCS	=	engl. multiple cloning site
FACS	=	engl. Fluorescence	mM	=	Millimolar
			MMTV	=	engl. Mouse Mammary Tumor Virus
			MTOC	=	engl. Microtubuli

	Organizing Center	Pol	=	Polymerase	
mRNA	=	engl. messenger RNA	PP	=	Polypurintrakt
MSD	=	Membran Spannende Domäne	PPP	=	Protein-Probenpuffer
MuLV	=	engl. Murine Leukemia Virus	PR	=	retrovirale Protease
µm	=	Mikrometer	ψ	=	Verpackungssignal
µl	=	Mikroliter	RNA	=	engl. Ribonucleinacid
NC	=	retrovirales Nukleokapsidprotein	rpm	=	Umdrehungen pro Minute
NES	=	Nukleäres Exportsignal	R-Region	=	retrovirale redundante Region im LTR
NLS	=	Nukleäres Lokalisations-signal	RT	=	retrovirale Reverse Transkriptase
nm	=	Nanometer	SA	=	Spleißakzeptor
OD	=	optische Dichte	SD	=	Spleißdonor
ORF	=	engl. open reading frame	SDS	=	Natriumlaurylsulfat
ori	=	engl. origin of replication	sek	=	Sekunde
PB	=	Primer Bindungsstelle	SFV	=	engl. Simian Foamy Virus
PBS	=	engl. Phosphate Buffered Saline	SU	=	engl. Surface
PCR	=	Polymerasekettenreaktion	TM	=	Transmembran
PFV	=	engl. Prototype Foamy Virus	u.a.	=	unter anderem
			vgl.	=	vergleiche
			z.B.	=	zum Beispiel

7.4. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Untersuchungen zum Gag- und Pol-Protein des Prototypischen Foamyvirus (PFV)“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind bereits publiziert worden in:

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

Cartellieri, M., Herchenröder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H.
und Rethwilm, A. (2005): N-terminal Gag domain required for Foamy Virus particle
assembly and export. *J. Virol.* 79, S. 12464 – 12476.

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

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

Dresden, den 04.10.2005

(Marc Cartellieri)

7.5. LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 07. November 1971

Geburtsort: Hanau

Nationalität: Deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung:

08/1982 - 08/1992 Besuch des Spessart-Gymnasiums Alzenau, Abschluss: Abitur (1,6).

11/1992 – 09/1993 Zivildienst im Caritas Kinder- und Jugenddorf Riedenberg

10/1993 – 09/1995 Grundstudium Biologie an der E.–M.–Arndt-Universität Greifswald, Abschluss: Vordiplom (1,5).

10/1995 – 02/2000 Hauptstudium Biologie an der E.–M.–Arndt-Universität Greifswald, Abschluss: Diplom (1,0).

seit 08/2000 Anfertigung einer Dissertationsarbeit am Institut für Virologie der TU Dresden, Betreuer: Prof. A. Rethwilm, Prof. G. Barth.

Stipendien und Praktika:

01/1996 – 02/2000 Studienstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes.

07/1996 – 03/1997 Praktikum am Department of Ecology, Massey University, Palmerston North, Neuseeland: Taxonomische und ökologische Studien an endemischen Laufkäfern (Carabidae) Neuseelands und Neukaledoniens. Betreuer: Dr. G.L. Lövei, Dr. I.A.N. Stringer.

7.6. PUBLIKATIONSLISTE

- Cartellieri, M., Rudolph, W., Herchenröder, O., Lindemann, D., und Rethwilm, A. (2005): Determination of the relative amounts of Gag and Pol proteins in foamy virus particles. *Retrovirology* 2, S. 44.
- Cartellieri, M., Herchenröder, O., Rudolph, W., Heinkelein, M., Lindemann, D., Zentgraf, H. und Rethwilm, A. (2005): N-terminal Gag domain required for Foamy Virus particle assembly and export. *J. Virol.* 79, S. 12464 – 12476.
- Stange, A., Mannigel, I., Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Göttlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H. und Lindemann, D. (2005): Characterization of Prototype Foamy Virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. – *J. Virol.* 79, S. 5466 – 5476.
- Cartellieri, M. und Lövei, G. L. (2003): Seasonal dynamics and reproductive phenology of ground beetles (Carabidae, Coleoptera) in fragments of native forest in the Manawatu, New Zealand. – *N. Z. J. Zool.* 30, S. 31 – 42.
- Lövei, G. L. und Cartellieri, M. (2000): Ground beetles (Coleoptera, Carabidae) in forest fragments of the Manawatu, New Zealand: Collapsed assemblages? – *J. Insect Conserv.* 4, S. 239 – 244.
- Cartellieri, M., und Lövei, G. L. (2000): Seasonal dynamics and reproductive phenology of *Plocamostethus planiusculus* (WHITE) and *Megadromus turgidiceps* BROUN (Carabidae, Coleoptera). – in “Natural history and applied ecology of carabid beetles”, ed. Brandmayr, P. et al.; Proceedings of the IX. European Carabidologists Meeting, Cosenza, 26 – 31.07.1998.
- Lövei, G. L., Stringer, I. A. N., Devine, C. D. und Cartellieri, M. (1997): Harmonic radar – a method using inexpensive tags to study invertebrate movement on land. - *N. Z. J. Ecol.* 21 (2), S. 187 – 193.
- Schulz, R. und Cartellieri, M. (1996): Erfassung der Laufkäferfauna (Coleoptera: Carabidae) im Bereich der Südküste des Kleinen Haffs bei Altwarp. - *Insecta* 4, S. 96 – 104.