

Molekulare Klonierung und Expression retroviraler  
chimärer Integrasen im proviralen Kontext  
des humanen Spumaretrovirus

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

Anja Doerks  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2001

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe- Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Entian

Gutachter: Prof. Dr. H. Zimmermann; Prof. Dr. R. Flügel

Datum der Disputation: 15. Oktober 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Retroviren	1
1.1.1. Morphologie und genetische Organisation	1
1.1.2. Lebenszyklus der Retroviren	2
1.2. HSRV (humanes Spumaretrovirus)	3
1.2.1. Genomorganisation und Genexpression	5
1.2.2. Besonderheiten des Replikationszyklus der Spumaviren	7
1.3. HTLV-1 (humanes T-Zell-Leukämievirus)	8
1.4. Integration	9
1.4.1. Integrationsprozess	9
1.4.2. Integrase	12
1.5. Zielsetzung	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1. Materialien	16
2.1.1. Zelllinien	16
2.1.2. Bakterienstämme	16
2.1.3. Antikörper	16
2.1.4. Enzyme	17
2.1.5. Vektoren	17
2.1.6. Reagenzienzusammenstellung (Kits)	18
2.1.7. Molekulargewichtsmarker	18
2.1.8. Medien	19
2.1.9. Häufig verwendete Puffer	20
2.1.10. Radiochemikalien	20
2.1.11. Primer	21
2.1.12. Fotografisches Material	23
2.1.13. Verbrauchsmaterial	23
2.1.14. Geräte	24
2.2. Methoden	26
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien	26
2.2.1.1. Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien durch DMSO	26
2.2.1.2. Herstellung und Transformation von Bakterien zur Elektroporation	26
2.2.2. Arbeiten mit DNA	27
2.2.2.1. Plasmidpräparation zur Analyse	27
2.2.2.2. Plasmidpräparation im großen Maßstab (Qiagen-Kit)	27
2.2.2.3. Plasmidpräparation im großen Maßstab (Cs Cl-Methode)	28
2.2.2.4. DNA Mengenbestimmung	28

2.2.2.5.	DNA Sequenzierung	28
2.2.2.6.	PCR	29
2.2.2.7.	Aufreinigung von PCR-Produkten	30
2.2.2.8.	Agarosegelelektrophorese	30
2.2.2.9.	Elution von DNA aus Agarosegelen	31
2.2.2.10.	DNA Restriktionsendonukleaseverdau	31
2.2.2.11.	Ligation	31
2.2.2.12.	Topo-Klonierung	31
2.2.2.13.	Ernten eukaryotischer Zellen zur Gewinnung von DNA	32
2.2.2.14.	DNA-Hybridisierung (Southernblotting)	32
2.2.2.15.	Radioaktive Markierung der Sonde	33
2.2.2.16.	Filterhybridisierung	33
2.2.3.	Arbeiten mit RNA	34
2.2.3.1.	Isolierung von gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen	34
2.2.3.2.	Poly(A) <sup>+</sup> -Selektion von RNA	35
2.2.3.3.	RNA-Mengenbestimmung	35
2.2.3.4.	Horizontale RNA-Elektrophorese	35
2.2.4.	Arbeiten mit Proteinen	36
2.2.4.1.	Ernten eukaryotischer Zellen zur Gewinnung von Protein	36
2.2.4.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.2.4.3.	SDS-Gelelektrophorese	36
2.2.4.4.	Proteinimmundetektion (Western-Blot)	37
2.2.4.5.	Radioimmunprecipitation	39
2.2.5.	Zellkultur und Virusnachweis	40
2.2.5.1.	Transfektion eukariontischer Zellen durch Elektroporation	40
2.2.5.2.	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	40
2.2.5.3.	Einzelzellklone von stabil transfizierten eukaryotischen Zellen	40
2.2.5.4.	Transfektion eukaryotischer Zellen (chemisch)	41
2.2.5.5.	β-Galaktosidase Assay	41
2.2.5.6.	Nachweis reverser Transkriptase	42
2.2.6.	Computeranalysen	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
3.1.	Austausch der HSRV Integrase gegen die HTLV-1 Integrase in pHSRV13	44
3.1.1.	Nachweis viraler Proteine in transfizierten eukaryotischen Zellen	46
3.1.2.	Infektiösitätstest der Plasmide p13ΔIN5, p13HTIN15 und p13HSIN11 mittels FAB-Zell Assay	50
3.2.	Reklonierung der ersten 15 Nukleotide der U3 und U5 Sequenzen des HTLV-1-Genoms in das chimäre p13HTIN5 Provirus	52
3.2.1.	Nachweis viraler Proteine in transfizierten eukaryotischen Zellen	53
3.2.2.	Infektiösitätstest der Plasmide pHTINHTU3U5 und p13HTU3U5 mittels FAB-Zell Assay	56

3.2.3. Aktivitätstest der reversen Transkriptase in den Klonen p13HTU3U5 und pHTINHTU3U5	57
3.3. Klonierung einer HTLV-1- und HSRV-chimären Integrase in pHSRV13 und HTINHTU3U5	60
3.3.1. Transfektion der chimären Integrase Klone in eukaryontische Zellen und Nachweis viraler Proteine	62
3.3.2. Infektiösitätstest der Klone pciHTU3U5 und pcip13 mittels FAB-Zell Assay	64
3.3.3. Nachweis viraler RNA in transfizierten BHK-Zellen	64
3.4. Kotransfektion eines HTLV-1-Gag Expressionsklons mit den rekombinanten, viralen Plasmiden pcip13, p13HTIN15, pHTINHTU3U5, pciHTU3U5	65
3.4.1. Nachweis von HTLV-1-Gag im Immunoblot	66
3.4.2. Infektiösitätstest der kotransfizierten Plasmide mittels FAB-Zell Assay	66
3.5. Klonierung des Zeocinresistenzgens in pHSRV13 und in die Konstrukte pHTINHTU3U5 und pciHTU3U5	68
3.5.1. Nachweis viraler Proteine nach transienter Transfektion von BHK-Zellen mit p13zeo14/-18, pHTINHTU3U5zeo und pciHTU3U5zeo	70
3.5.2. Charakterisierung der Expression viraler Proteine in den stabil transfizierten BHK-Einzelzellklonen	71
3.5.3. Infektiösitätstest der Zeocinkonstrukte mittels FAB-Zell Assay	75
3.5.4. Southernblot Hybridisierung der stabil transfizierten BHK-Zellklone	75
<b>4. Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1. Analyse der chimären Virusstrukture	82
4.1.1. Infektiösität der chimären Klone	82
4.1.2. Transkription	83
4.1.3. Proteinexpression und Prozessierung	86
4.1.4. Aktivität der reversen Transkriptase	91
4.2. Analyse der zeocinresistenten, chimären Virusstrukture	92
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>97</b>
<b>7. Abkürzungen</b>	<b>106</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>108</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Retroviren

Retroviren sind RNA-Viren, die in der Lage sind, ihre Erbinformation ins Wirtsgenom zu integrieren. Ihren Namen verdanken sie der Besonderheit, daß sie eine RNA-abhängige DNA-Polymerase besitzen, die reverse Transkriptase. Dieses Enzym ist in der Lage die virale RNA als Matrize zur Synthese von DNA zu benutzen, die dann in das Genom der Zielzelle eingefügt werden kann. So wird nach der Integration des DNA-Provirus in die Wirts-DNA das virale Genom bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Das Virus kann sich dann je nach Zelltyp replizieren oder jahrelang persistieren, ohne jemals aktiv zu werden. Der Mechanismus, welcher zur Aktivierung latenter Viren führt ist noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise spielt die Methylierung bzw. Demethylierung der viralen DNA in den Promotoren dabei eine Rolle.

Zum ersten Mal wurden Retroviren 1911 beschrieben, als Peyton Rous ein infektiöses Agens in Geflügelsarkomen entdeckte, welches später als Rous-Sarkoma-Virus bekannt wurde. Bis heute wurde eine Vielzahl weiterer Retroviren identifiziert. Von retroviralen Infektionen sind vorwiegend Wirbeltiere betroffen. Eine Infektion äußert sich dort unter anderem durch Tumorerkrankungen, Immundefizienzen oder neurologische Defekte, kann aber auch völlig symptomfrei verlaufen.

Taxonomisch werden Retroviren in verschiedene Gruppen eingeteilt. Dazu gehören, unter anderem die Onkoviren, die HTLV / BLV-Gruppe, die Lentiviren, deren prominentester Vertreter das HIV (Humanes Immundefizienzvirus) ist, sowie die Spumaviren. Weiterhin unterscheidet man in Abhängigkeit von der Genomstruktur zwischen einfachen und komplexen Retroviren, die zusätzlich zu den Strukturgenen noch regulatorische Proteine besitzen.

### 1.1.1. Morphologie und genetische Organisation

Ein infektiöses retrovirales Partikel enthält generell bei den meisten Gruppen zwei identische Kopien seines RNA-Genoms sowie die viralen Enzyme Integrase,

Protease und reverse Transkriptase. Dieser Ribonukleoproteinkomplex wird vom Kapsid umschlossen. Nach der Ausknospung wird dieses von einer Lipidmembran zellulären Ursprungs eingehüllt und durch die virale Hülle, des Envelope-Glykoproteins bedeckt. Ein solches virales Partikel hat einem Durchmesser von etwa 100-140 nm.

Das RNA-Genom der Retroviren umfasst etwa 7000 bis 12000 Nukleotide. Das in DNA revers transkribierte provirale DNA-Genom wird an den Enden von identischen Langen Terminalen Repetitionen (LTR) begrenzt, welche wesentlich für die Erkennung des Virusgenoms durch die Integrase sind, und außerdem die viralen Promotoren und Enhancer Elemente enthalten, die die virale Genexpression steuern. Das virale Genom ist bei einfachen Retroviren auf die Strukturgene *gag* (gruppenspezifisches Antigen), *pol* (enzymatische Aktivitäten) und *env* (Envelope, Glycoproteine) sowie die flankierenden LTR beschränkt. Die Gag-Proteine, welche in Matrix, Kapsid und Nukleokapsid unterteilt werden, bilden die internen Strukturproteine und haben zudem verschiedene Funktionen bei der viralen Replikation. Zu den enzymatisch aktiven *pol*-Genprodukten gehören die Protease, die reverse Transkriptase mit der RNase H und die Integrase. Die Spaltung des Env-Vorläuferproteins in die beiden Untereinheiten TM (Transmembrane Domäne) und SU („surface domain“) erfolgt durch eine zelluläre Furinprotease. Das TM-Protein wird in die Hüllmembran eingelagert und bildet mit SU-Proteinen meistens einen nichtkovalenten Komplex von Heterodimeren, die wiederum Trimere bilden.

Lentiviren, Spumaviren und die Viren der HTLV-Gruppe gehören zu den komplexen Retroviren, d.h., sie besitzen außer den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* noch weitere akzessorische Gene. Die Aufgaben dieser Regulatorproteine sind vielfältig; dazu gehört transkriptionelle Transaktivierung, RNA-Bindung, Transportfunktion und weitere teilweise ungeklärte Funktionen.

### **1.1.2. Lebenszyklus der Retroviren**

Eine Infektion durch ein Retrovirus beginnt mit dem Andocken des Viruspartikels an ein Rezeptorprotein auf der Zelloberfläche, welches dem viralen SU Protein die Adsorption an die Wirtszellmembran ermöglicht. Ist diese Voraussetzung erfüllt, fusioniert das Virus nach Umlagerung über das Transmembranprotein (TM) mit der Zellmembran und entläßt das Viruskapsid ins Cytosol. Hier wird das RNA-Genom,

welches im Komplex mit viralen Proteinen vorliegt, freigesetzt und durch die im Viruspartikel enthaltene reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Nun bildet sich der Präintegrationskomplex, bestehend aus dem DNA-Provirus, der Integrase, bestimmten Teilen von Gag und mehreren zellulären Proteinen. (Im Kapitel 1.2.2. Integration wird darauf genauer eingegangen.) Durch aktive Transportprozesse, an welchen die viralen akzessorische Proteine beteiligt sein könnten, gelangt dieser Komplex in den Zellkern, wo die provirale DNA in mehreren Schritten durch die Integrase stabil in das zelluläre Genom kovalent eingefügt wird. Nach erfolgter Integration beginnt die Transkription der viralen Transkripte und die Expression der viralen Proteine. Die genomische RNA wird in neue Viruspartikel verpackt, die daraufhin die Zelle in einer von der Cytoplasmamembran abgeschnürten Hülle verlassen („budding“) und neue Zellen infizieren können. Die Gag-Pol und Pol-Polyproteine werden erst im Viruspartikel von der viralen Protease prozessiert, was schließlich zum reifen infektiösen Viruspartikel führt, womit ein neuer viraler Lebenszyklus beginnen kann.

Durch ihre Eigenschaft, fremde DNA Sequenzen stabil in das Wirtsgenom zu integrieren, sind Retroviren auch als Vektoren zum gezielten Gentransfer interessant. Ein beliebiges Gen kann so mit dem Retrovirus als Vehikel stabil ins Genom eingebracht und dort von der Zelle exprimiert werden. Außerdem kann das Fremdgen so an die Tochterzellen weitergegeben werden. Limitierende Faktoren sind hierbei jedoch, die bei vielen Retroviren geringe Integrationsrate, die starke Pathogenität vieler Retroviren sowie das Problem, daß große Teile der Bevölkerung bereits mit bestimmten Retroviren infiziert sind. Das Immunsystem hat dann bereits Antikörper gegen Teile möglicher Vektoren gebildet. Im optimalen Fall sollte ein solcher Vektor nur einen Integrationszyklus vollenden, dann aber nicht mehr weiterreplizieren.

## **1.2. HSRV (humanes Spumaretrovirus)**

Spumaviren, synonym auch als FV (foamy virus) bezeichnet, werden allgemein als apathogene Viren angesehen. Obwohl sie in Zellkultur oft starke cytopathische Effekte aufweisen, verursachen sie beim infizierten Individuum keinerlei Krankheits-



Symptome (Linial 2000). Mit HFV infizierte Kaninchen wurden über Jahre beobachtet, ohne, daß definierte Krankheits-Symptome auftraten (Saib et al. 1997). Lediglich transgene Mäuse zeigten neurale Defekte wie Enzephalopathien und Myelopathien (Bothe et al. 1991, Aguzzi et al.1992).

Die cytopathischen Effekte in vitro zeigen sich durch die Bildung vielkerniger Riesenzellen, den Syncytien (Löchelt und Flügel 1995), sowie durch Vakuolisierung, woher sich auch ihr Name (Spuma=Schaum) ableitet. Eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen lassen sich infizieren, was Rückschlüsse auf eine weite Verbreitung des bisher noch unbekanntem zellulären Rezeptors zuläßt. Sogar Vogel- und Reptilienzellen lassen sich in vitro infizieren (Hill et al. 1999).

In vivo hat man Foamyviren nur bei Säugetieren wie Affen, Hamster, Rinder, Seelöwen, Katzen und Pferden gefunden (Tobaly-Taipiero et al. 2000). Das humane Spumavirus wurde erstmals 1971 beschrieben, als es aus dem Nasopharynxkarzinom eines afrikanischen Patienten isoliert wurde (Achong et al. 1971). Weltweit existieren nur wenige infizierte Personen, meist handelt es sich dabei um durch Primatenbisse angesteckte Tierpfleger. Die Infektion machte sich phänotypisch nicht bemerkbar, auch eine Übertragung an die Ehepartner fand nicht statt (Callahan et al. 1999). Bei Affen sowie Katzen sind dagegen oft bis zu 70% einer Population mit dem Virus infiziert (Neumann-Haefelin et al. 1993, Winkler et al. 1997). Hier erfolgt die Übertragung wahrscheinlich durch Speichel oder Blut (Kertayadnya et al. 1988).

Aufgrund des Fehlens einer klaren Assoziation natürlich vorkommender spumaviraler Infektionen mit einer definierten Krankheit und der geringen Verbreitung im Menschen wurden auf Spumavirus-basierende Vektoren zum gezielten Gentransfer entwickelt (Trobridge and Russell 1998, Russell and Miller 1996).

Hierzu wurden Fremdgene in das virale Genom eingebracht und z.B. in Zellkultur zur Expression gebracht (Schmidt et al. 1995).

Weiterhin gaben Tierexperimente auf der Grundlage des felines Foamyvirus Aufschluß über Immunantwort, Zielorgane und Viruspräsenz (Alke et al. 2000). Bei der Entwicklung von spumaviralen Vektoren ist der Integrationslokus im Chromosom der Zielzelle von entscheidender Bedeutung. Über HFV ist bekannt, daß es vor allem in hochrepetitiven Sequenzen sowie in transkriptionell aktiven Regionen im Genom integriert (Neves et al. 1998).

### 1.2.1 Genomorganisation und Genexpression

Das provirale DNA-Genom von HSRV ist ca. 12000 Basenpaare lang und damit für Retroviren relativ groß. Spumaviren gehören zu den komplexen Retroviren, und exprimieren zusätzlich zu den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* noch weitere regulatorische und akzessorische Proteine. Zu den regulatorischen Proteinen gehört das Bel1, ein starker Transaktivator der foamyviralen Promotoren und einiger zellulärer Gene (Wagner et al. 2000). Spumaviren besitzen neben dem LTR-Promotor einen weiteren Promotor im 3'-Bereich von Env, der für die Expression der Bel-Proteine verantwortlich ist (Löchelt et al. 1991).

Die Klonierung des proviralen HSRV-Genoms gelang 1991, es entstand der infektiöse Klon pHSRV13 (Löchelt et al. 1991).

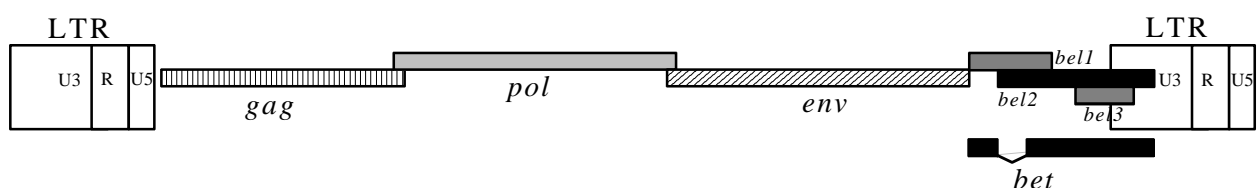


Fig. 1: Aufbau des HSRV Genoms

Es sind *gag*, *pol* und *env* dargestellt, sowie die akzessorischen Gene *bel1*, *bel2*, *bel3* und *bet*.

### Gag

Das HSRV Gag-Protein hat eine Größe von 71 kDa, es wird vom ungespleißten genomischen Transkript des LTR-Promotors exprimiert und zeigt keine Sequenzhomologie zu Gag-Proteinen anderer Retroviren. Es unterscheidet sich von anderen Gag-Proteinen durch das Fehlen eines Myristoylierungssignals, der MHR-Region („major homology region“) und einem Cys-His-Motiv, das bei anderen Retroviren für die Verpackung der viralen RNA bedeutsam ist (Berkowitz et al. 1996). Im Immunoblot konnten in freien Viruspartikeln Gag-Proteine der Größe 71 kDa, 68 kDa und 33 kDa nachgewiesen werden. Das 68 kDa-Protein entsteht durch die für die Infektiosität essentielle Abspaltung eines 3 kDa-Peptids von dem 71 kDa-Vorläuferprotein durch die virale Protease (Zemba et al. 1998, Konvalinka et al. 1995). Die Spaltstelle befindet sich am Carboxyterminus zwischen den AS Asn621-Thr622 (Pfrepper et al. 1997). Es wurden drei zusätzliche Spaltstellen der viralen Protease im zentralen Bereich des Gag-Proteins gefunden, von welchen in vivo die

Spaltung zwischen den AS Arg311-Ser312 bevorzugt wird (Pfrepper et al. 1999). Da diese Prozessierungsprodukte nur in geringen Mengen vorliegen, ist die Prozessierung offensichtlich unvollständig und/oder zeitlich verzögert.

### **Pol**

Das foamyvirale Pol-Polyprotein wird im Gegensatz zu den Pol-Proteinen anderer Retroviren nicht durch ribosomalen Leserasterwechsel, sondern durch Translation eines gespleißten *pol* Transkriptes exprimiert (Yu et al. 1996, Bodem et al. 1996).

Es besteht aus 1144 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 127 kDa. Es wird durch die virale Protease prozessiert (Konvalinka et al. 1995, Pfrepper et al. 1998). Durch Spaltung an den AS Asn751-Cys752 entsteht die 40 kDa Integrase und ein 80 kDa Protein, das sich aus Protease (PR), reverser Transkriptase (RT) und RnaseH (RH) zusammensetzt. Die Domänengrenze zwischen Protease und reverser Transkriptase liegt zwischen den AS Asn143-Gln144, die Spaltstelle zwischen RT und RH zwischen Phe596-Tyr597. In Viruspartikeln wurde das PR-RT-Polyprotein mit einem Laufverhalten von 65 kDa nachgewiesen. Eine Abspaltung der PR-Domäne vom PR-RT-Polyprotein wurde nur bei bestimmten rekombinanten Proteinen jedoch nicht in vivo beobachtet (Pfrepper 1999). Die Homologien der HFV-Pol-Proteine zu denen klassischer Retroviren sind relativ hoch (Löchelt und Flügel 1996). Wie auch bei anderen Retroviren ist eine aktive Integrase für die Replikation des HFV essentiell (Enssle et al. 1999). Die rekombinante HFV-Integrase ist enzymatisch aktiv (Pahl und Flügel 1993). Der Einbau von Pol in HFV-Partikel erfolgt unabhängig von proteolytischer Aktivität der viralen Protease; der Mechanismus ist wegen des Fehlens eines Gag-Pol Fusionsproteins verschieden von dem anderer Retroviren, ist jedoch noch nicht aufgeklärt (Baldwin und Linial 1999).

### **Env**

Das Env Protein von HFV wird ebenso wie Pol von einem gespleißten Transkript exprimiert (Muranyi et al. 1991). Die Env-Glykoproteine der bekannten Foamyviren weisen relativ hohe Homologien untereinander auf, höhere, als die entsprechenden Gag-Proteine (Wang und Mulligan 1999). Vergleichbar mit anderen klassischen Retroviren wird Env in eine transmembrane (TM) und eine Oberflächendomäne (SU) unterteilt, wofür vermutlich eine zelluläre Furinprotease verantwortlich ist.

Das Env Protein ist für den starken zytopathischen Effekt, den die Infektion mit HFV in Zellkulturen auslöst, verantwortlich. Ein zellulärer Rezeptor als Interaktionspartner für HFV Env konnte aber noch nicht identifiziert werden. Die Struktur des HFV-Env-Glykoproteins wurde kürzlich mittels Elektronenmikroskopie aufgedeckt. Env liegt auf der Virushülle in regelmäßigen trimeren Komplexen vor, welche häufig zu hexagonalen Ringen angeordnet sind (Wilk et al. 2000).

### **Akzessorische Proteine**

Die *bel*-Gene (Baunach et al. 1993, Flügel et al. 1987) werden sowohl von gespleißten Transkripten des LTR-Promotors als auch vom internen Promotor (Löchelt et al. 1993) exprimiert. Die Bezeichnung „*bel*“ leitet sich von der Lokalisation der Gene ab („between env and LTR“). Das Protein Bel1 ist für die Infektiosität absolut notwendig und ist ein starker transkriptioneller Transaktivator der Genexpression. Es wirkt sowohl auf den LTR- als auch auf den internen Promotor. Das Protein vermag direkt an die DNA zu binden (He et al. 1996). Die Funktionen der Proteine Bel2, Bel3 und Bet sind noch unbekannt.

### **1.2.2. Besonderheiten des Replikationszyklus der Spumaviren**

Foamyviren gleichen anderen Retroviren in einigen Punkten bezüglich ihres Lebens- und Replikationszyklus. Die Viruspartikel binden an einen bislang noch unbekanntem Rezeptor auf der Zelloberfläche, penetrieren die Zelle und setzen das Virusgenom frei. Dieses wird revers transkribiert und ins Wirtsgenom integriert. Dann werden wie bei anderen Retroviren neue infektiöse Partikel gebildet, die die Zelle verlassen und neue Zellen infizieren können.

Foamyviren weisen jedoch auch Unterschiede zu allen anderen Retroviren auf, und zeigen Analogien zur Gruppe der Hepadnaviren (Lecellier et al. 2000, Linial 1999, Ganem 1996). Neuere Arbeiten gehen davon aus, daß extrazelluläre Viruspartikel zusätzlich zum RNA-Genom auch unvollständige doppelsträngige DNA-Kopien beinhalten können (Yu et al. 1999). Auch die proteolytische Prozessierung des FV-Gag-Proteins erscheint untypisch für Retroviren. Reife Virionen enthalten nicht die typischen Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid-Proteine, sondern zwei große Gag-Proteine, die lediglich durch Abspaltung eines 3 kDa-Peptids am Carboxyterminus und Spaltungen im zentralen Bereich des Proteins prozessiert sind (Pfrepper et al.

1999). Die Expression des Pol-Proteins erfolgt im Gegensatz zu anderen Retroviren von einem gespleißten Transkript (Yu et al. 1996).

Das „budding“ von Viruspartikeln erfolgt bei HFV größtenteils am endoplasmatischen Retikulum. Die Mehrzahl der Viruspartikel ist daher intrazellulär lokalisiert. Außerdem ist das Env Protein zur Freisetzung viraler Partikel aus der Zelle unbedingt nötig, (Pietschmann et al. 1999, Baldwin and Linial 1998), Env-freie extrazelluläre virusähnliche Partikel wurden nicht gefunden.

### 1.3. HTLV-1 (Humanes T-Zell-Leukämievirus)

HTLV wurde 1981 als erstes humanes onkogenes Retrovirus von Robert Gallo und Mitarbeitern aus einem Patienten mit adulter T-Zell-Leukämie (ATL) isoliert. Die adulte T-Zell-Leukämie ist in weiten Gebieten Japans, Afrika, den Karibischen Inseln sowie im Südosten der Vereinigten Staaten endemisch. Die meisten HTLV infizierten Menschen sind lebenslang symptomfreie Virusträger, nur 1-4% entwickeln eine ATL (Kondo et al. 1987). Die Übertragung von HTLV erfolgt über Bluttransfusionen, Sexualkontakte und beim Stillen. Das Blutplasma ist nicht infektiös, da die Viren nicht als freie Partikel sondern nur durch infizierte Zellen übertragen werden. Weitere Krankheitsbilder, die im Zusammenhang mit einer HTLV Infektion auftreten, sind Myelopathien wie die tropische spastische Paraparese (TSP) auch HTLV-1-assoziierte Myelopathie (HAM) genannt, die in tropischen Ländern wie auch in Teilen Japans vorkommt.

HTLV gehört zu den komplexen Retroviren und infiziert in vivo ausschließlich CD4-positive Zellen. In vitro konnte aber auch bei B- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Cokultivierung mit HTLV positiven CD4<sup>+</sup>-Zellen eine Infektion festgestellt werden. Untersucht man ATL-Zellen eines Patienten, so findet man, daß die virale Sequenz immer an der gleichen Stelle im Wirtsgenom lokalisiert ist, was auf eine gemeinsame Vorläuferzelle der Krebszellen hinweist. In Zellkultur fand man, daß nahezu das gesamte Wirtszellgenom für eine Integration des HTLV in Frage kommt. Bevorzugt werden dabei A/T-reiche Regionen mit einer schwachen Konsensussequenz hinter dem sechs Nukleotide langen integrationsbedingten Repeat. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen zellulären repetitiven Elementen oder transkriptionell aktiven Regionen im Wirtsgenom und dem Integrationslokus (Leclercq et al. 2000).

HTLV codiert nicht selbst für ein zelluläres Onkogen, besitzt aber mit dem regulatorischen Protein Tax einen starken viralen und zellulären Transaktivator. Das Tax Protein stimuliert die NF $\kappa$ B- und CREB-abhängigen und andere zelluläre Promotoren und verstärkt so die Expression des  $\alpha$ -Rezeptors für Interleukin-2, Interleukin-2, Interleukin-1 $\beta$ , sowie GM-CSF u.a.. Die Cytokine binden dann an die verstärkt exprimierten Rezeptoren auf die Zelloberfläche und veranlassen die so infizierten Zellen zur Teilung. Für die Erhaltung des transformierten Zustandes ist das Tax Protein nicht mehr nötig; es wird, wie auch die anderen Virusprodukte nur zu Beginn der Immortalisierung exprimiert.

1995 gelang es D. Derse, einen infektiösen Klon des gesamt Genoms von HTLV-1 zu konstruieren, mit welchem er Zellen transfizieren und mit Hilfe von RT-PCR infektiöse Viruspartikel nachweisen konnte (Derse et al. 1995, 1996).

## **1.4. Integration**

Die Integration ist ein essentieller Schritt im Lebenszyklus von Retroviren. Bei diesem Schritt wird die virale DNA stabil ins Wirtsgenom inseriert. Dadurch wird sichergestellt, daß das Virusgenom bei jeder Zellteilung an beide Tochterzellen weitergegeben wird. Die Infektion wird dadurch chronisch und das Virus in Latenzphasen unerreichbar für das Immunsystem. Außerdem stellt die Integration einen Schutz vor Degradation des Virusgenoms dar. Nichtintegrierte lineare DNA Moleküle werden innerhalb der Zelle in wenigen Stunden abgebaut (Pauza et al. 1994).

### **1.4.1. Integrationsprozess**

Nach dem Eintritt des Virus in das Cytoplasma der Zelle wird zunächst die virale RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Zusammen mit ca. 50-100 Integrase Molekülen (Aspante-Appiah and Skalka 1997) wird die provirale DNA in einen großen Nukleoproteinkomplex eingebunden, den Präintegrationskomplex. Dieser Komplex beinhaltet sowohl virale Proteine wie das Matrix Protein, die reverse Transkriptase (Miller et al. 1997), das Nukleokapsid Protein (Carteau et al. 1999) und bei HIV Vpr/Vpx (Popov et al. 1998, Hansen and Bushman 1997), als auch zelluläre

Proteine. Dazu gehört z.B. HMGI(Y) (Li et al. 1998, 2000, Farnet and Bushman 1997).

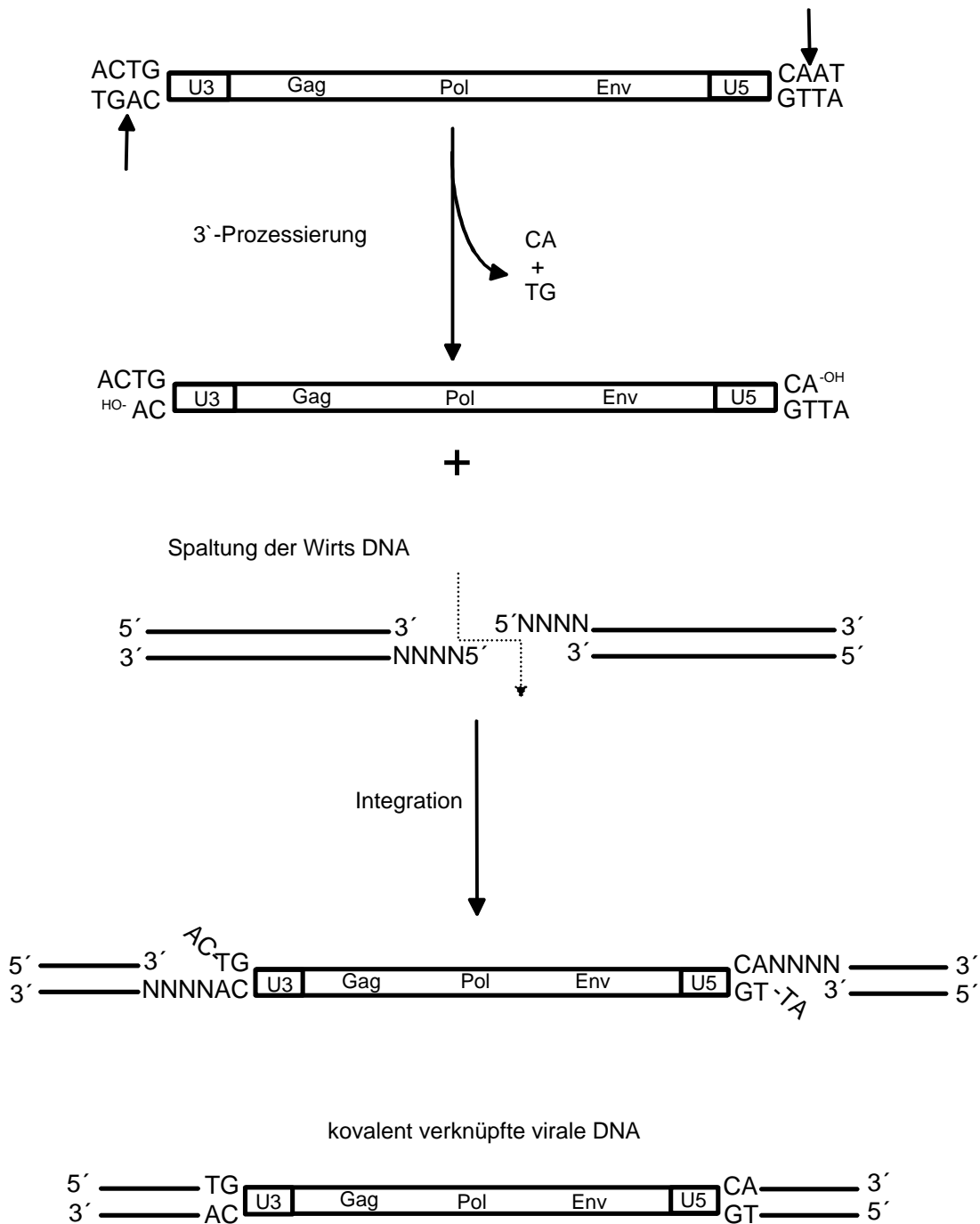


Fig. 2: Endonuklease- und Integrationsreaktion bei Retroviren

Die Basen an den Enden des proviralen Genoms entsprechen der HSRV Nukleotidsequenz.

Dieser Komplex gelangt bei Lentiviren und Spumaviren über weitgehend ungeklärte Mechanismen aktiv in den Zellkern, möglicherweise spielt Vpr (bei HIV) (Sherman et al. 2001, Haffar et al. 2000, Popov et al. 1998) oder ein NLS im NC-Teil des Gag-Proteins (bei HSRV) (Schliephake and Rethwilm 1994) dabei eine Rolle. Andere Retroviren sind auf die Zellteilung und die damit verbundene Degradation der Kernmembran angewiesen, um zu der zellulären DNA vorzudringen.

Um die virale DNA ins Wirtsgenom zu integrieren, sind zwei enzymatische Reaktionen notwendig, die von der Integrase katalysiert werden. Dabei spielen die LTR-Enden bei der Erkennung der viralen DNA durch die Integrase eine große Rolle. Der erste Schritt, die Prozessierung der viralen Enden erfolgt noch im Cytoplasma der infizierten Zelle (Roth et al. 1989). Dabei werden jeweils zwei Nukleotide an den 3'-Enden entfernt, indem die kovalenten Phosphodiesterbindungen hydrolysiert werden, wobei ein Wassermolekül als Nukleophil fungiert. Dieser Prozeß, der auch als Endonukleasereaktion bezeichnet wird, erfolgt immer spezifisch nach zwei konservierten Basen (CA) (Katzman et al. 1989), und es entsteht dabei ein Überhang von jeweils zwei Nukleotiden am gegenüberliegenden 5'-Ende, und eine freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende (Engelmann et al. 1991).

Die zweite Reaktion ist die eigentliche Integration. Hier wird zunächst die Wirtszell-DNA gespalten, so daß ein wenige Nukleotide langer Überhang entsteht, welcher später die integrierte provirale DNA als kurze direkte Wiederholung flankiert. Die Länge der duplizierten Region ist virusspezifisch und liegt meist zwischen vier und sechs Basen. Bei HSRV sind es vier (Neves et al. 1998), bei HTLV-1 sechs Basenpaare (Leclercq et al. 2000).

Die durch die Endonukleasereaktion entstandenen freien Hydroxylgruppen der viralen DNA ligieren nun über einen nukleophilen Angriff an die Phosphodiesterbindungen des Zielgenoms, unter Bildung kovalenter Phosphodiesterbrücken (Majors et al. 1981). Dabei werden die beiden Enden der 3'- und 5'-LTR durch die Integrase so angeordnet, daß ihr Abstand einer halben Windung der Doppelhelix entspricht. Dieser Abstand korreliert mit der Lücke, die in der Ziel DNA erzeugt worden ist. Aufgrund dieser sterischen Anordnung ist es notwendig, daß die Integrase als Dimer vorliegt. Diese Reaktion läuft ohne externen Energieverbrauch ab, es werden lediglich  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Ionen für die Dimerisierung der Integrase benötigt. Nach dieser Reaktion, die eine in einem Schritt



ablaufende Transesterifizierungsreaktion darstellt, wird das Provirus von zwei Lücken in der Länge des zellulären Repeats flankiert und besitzt am 5'-Ende zwei überhängende ungepaarte Basen. Für das Auffüllen der Lücken und das Entfernen der ungepaarten Nukleotide der beiden proviralen LTR-Enden werden zelluläre Enzyme verantwortlich gemacht (Fujiwara et al. 1988, Brown et al. 1989, Brin et al. 2000). Das integrierte Provirus ist damit um zwei Basen auf jeder Seite verkürzt verglichen mit freier viraler DNA. Innerhalb einer Zelle kann dieser Vorgang mehrmals ablaufen. In chronisch mit HFV infizierten humanen Erythroleukemia-Zellen wurden bis zu 20 integrierte provirale Genome gefunden (Meiering et al. 2000).

In vitro konnte noch eine weitere enzymatische Aktivität der Integrase nachgewiesen werden, die Disintegrationsreaktion, die eine teilweise Umkehr der Transferreaktion darstellt (Chow et al. 1992). Allerdings konnte bis jetzt noch kein Nachweis dafür erbracht werden, daß diese Reaktion auch in vivo abläuft.

#### 1.4.2. Integrase

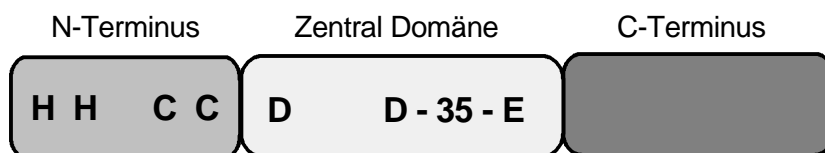


Fig. 3:

Strukturelle Organisation der funktionellen Domänen retroviraler Integrasen.

Integrasen sind 30 bis 40 kDa große Moleküle, die vor allem im Zellkern akkumuliert anzutreffen sind (Depienne et al. 2000). Im viralen Genom ist die Integrase am Ende von *pol* lokalisiert. Die strukturelle Organisation der Integrase beinhaltet zunächst eine N-terminale Domäne mit einem HHCC Zink-Finger ähnlichen Motiv (Johnson et al. 1986), dann eine zentrale katalytische Domäne mit einem hochkonservierten DD(35)E Motiv das für Prozessierung und Transfer verantwortlich ist, sowie eine C-terminale sehr schwach konservierte Domäne.

Die N-terminale Domäne ist durch zwei Histidin- und zwei Cysteinreste gekennzeichnet deren Motiv folgendermaßen angeordnet ist:

H-X<sub>(3-7)</sub>-H-X<sub>(23-32)</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (Johnson et al. 1986). Eine Ausnahme bildet BFV (bovine foamy virus), dessen Cysteinreste durch mehr als zwei Aminosäuren von einander getrennt sind.

Diese Anordnung ähnelt einem klassischen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zink-Finger Motiv, und ist wie dieses durch die Bindung von Metallionen (Zn<sup>2+</sup>) gekennzeichnet. Durch diese Zn<sup>2+</sup> Bindung wird die Konformation der Domäne stabilisiert, was sie in die Lage versetzt, sich eigenständig zu falten (Burke et al. 1992). Die katalytische Aktivität wird dadurch ebenfalls verstärkt (Zheng et al. 1996). Bei der HIV-1 und HIV-2 Integrase besteht die N-Terminale Domäne aus vier  $\alpha$ -Helices wobei drei davon ein durch die Zink-Bindung stabilisiertes Bündel bilden (Eijkelenboom et al. 1997, 2000). Auch an der Multimerisierung von Integrasemolekülen durch Protein-Protein Interaktionen ist die Zink-Finger Domäne beteiligt. Mutationsexperimente bei HIV zeigten außerdem, daß diese Domäne bei der 3'- Prozessierung möglicherweise eine DNA bindende Rolle übernimmt (Hazuda et al. 1994). Andere Arbeiten gehen nicht von einer direkten DNA-Bindung, sondern von einer wichtigen Rolle bei der spezifischen Erkennung der LTR-Enden aus (Kahn et al. 1990). Eine Deletion dieser Domäne führte bei HFV zu einem völligen Verlust jeglicher enzymatischer Aktivität (Pahl et al. 1993), bei HIV konnten noch 10-50% Disintegraseaktivität nachgewiesen werden (Vink et al. 1993).

Die katalytische DD(35)E Domäne ist die für alle retroviralen Integrasen charakteristische zentrale Domäne. Sie besteht aus zwei Asparaginsäureresten deren Abstand in bestimmten Grenzen variabel ist und einem Glutaminsäurerest, der durch genau 35 Aminosäuren von dem zweiten Asparaginsäurerest getrennt ist. Die Substitution einer dieser drei Aminosäuren führt bei HIV (Khan et al. 1991, Kulkosky et al. 1992) und auch bei HFV (Enssle et al. 1999) zu einer signifikanten Reduktion aller katalytischen Aktivitäten (Endonuklease- Integrations- und Disintegrationsaktivität) der Integrase. Isoliert man die DD(35)E Domäne, so kann in vitro bei HIV-1 (Bushman et al. 1993, Vink et al. 1993), ASV (Bushman et al. 1994, Kulkosky et al. 1995) und HFV (Pahl et al. 1995) zwar eine Disintegrationsaktivität nachgewiesen werden; 3'-Prozessierung und Integration finden jedoch nicht statt.

Röntgenstrukturanalysen der HIV Integrase haben gezeigt, daß die räumliche Anordnung der Carboxylatreste so beschaffen ist, daß sie in der Lage ist, die essentiellen Cofaktoren  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  zu binden (Dyda et al. 1994). Bei diesen Strukturanalysen zeigte sich, daß bei HIV und ASV die Domäne als Dimer kristallisiert, was eine Rolle bei der Multimerisierung der Integrase wahrscheinlich macht (Andrake and Skalka 1996).

Die C-terminale Domäne ist die am stärksten divergierende innerhalb der Integrasen. Mutationsanalysen der Integrase von ASV und HIV zeigten eine unspezifische DNA-bindende Funktion dieser Domäne (Engelmann et al. 1994). Möglicherweise ist diese Domäne an der Bindung der Enden viraler DNA oder an der Bindung der Ziel-DNA Sequenzen in welche das Provirus integriert, beteiligt. Zwei konservierte Sequenzmotive konnten mittels Sequenzanalysen verschiedener retroviraler Integrasen im carboxyterminalen Bereich identifiziert werden. Ein weiteres Motiv wurde ausschließlich im C-Terminus von Lentiviren nachgewiesen. Es stellt eine Schleifenstruktur dar, die von zwei Helices flankiert wird (Cannon et al. 1996). Daß auch die C-terminale Domäne an der Multimerisierung beteiligt ist, legt die Tatsache nahe, daß ein isoliertes C-terminales Fragment zur Selbstassoziation befähigt ist. Zusätzlich führt eine Mutation des Serins an Position 85 der ASV Integrase zu einer stark verminderten Multimerisierung des Proteins (Andrake et al. 1995).

## 1.5. Zielsetzung

Um Retroviren als Vektoren zum Gentransfer nutzen zu können, wäre es vorteilhaft, wenn man bestimmte Eigenschaften der Retroviren kombinieren könnte. HSRV ist nach bisherigen Erkenntnissen apathogen, und in der menschlichen Bevölkerung kaum verbreitet. Die Integrationsrate von HSRV ins Wirtsgenom ist allerdings sehr niedrig, was seine Tauglichkeit als Vektor stark einschränkt. Im Gegensatz dazu liegt die Integrationsrate von HTLV-1 bei über 90%. Sowohl die Integrase des HSRV als auch die Integrase des HTLV-1 sind in vitro als enzymatisch aktiv charakterisiert. Die Effizienz der Virusexpression insgesamt hängt in erster Linie von der effektiven Transkription des jeweilig integrierten Virusgenoms ab.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Integrase im infektiösen HSRV-Klon pHSRV13 ganz bzw. teilweise gegen die Integrase des HTLV-1 auszutauschen. Es sollte untersucht werden, ob das so veränderte HSRV-DNA Provirus replikationsfähig ist und ob mit der HTLV-1 Integrase eine Integration in die Wirts-DNA stattfindet.

Da die Integrasen virus-spezifisch die ersten 6 bis 15 Nukleotide der zugehörigen LTR benötigen, um erfolgreich zu integrieren, mußten daher bei weiteren rekombinanten HSRV-Klonen zusätzlich zur Integrase die ersten 15 Nukleotide der U3 und U5 Region in die entsprechende Sequenz des HTLV-1-Genoms umgewandelt werden.

Es sollten Infektiosität, RNA-, Proteinexpression und die Integration der neuen Konstrukte untersucht werden.

Die Einklonierung eines Resistenzgens, Zeocin, in das HSRV-Genom und die unterschiedlichen chimären Viruskonstrukte sollte durch Selektion infizierter Zellen einen genaueren Aufschluß über die Integration geben.

Insgesamt sollten Integrationsmechanismen und limitierende Faktoren näher beleuchtet werden, sowie wichtige virale Elemente, die bei der Integration eine zusätzliche Rolle spielen, untersucht werden.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Zelllinien

**BHK21-Zellen** (Baby-Hamster-Kidney-Zellen) wurden genutzt, um das Virus nach Elektrotransfektion zu propagieren.

**293T-Zellen** (humane Embryo Nierenzelllinie transformiert mit Adenovirus E1a und einem Temperatur sensitiven T-Antigen co-selektioniert mit Neomycin) (DuBridg e et al. 1987) dienten zum propagieren des Virus nach CaCl<sub>2</sub>-Transfektion.

**HFAB-Zellen** sind genetisch veränderte Derivate von BHK21-Zellen, die das β-Galaktosidase-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des HFV-LTR-Promotors tragen und die eine schnelle und effiziente Titration von HFV-haltigen Kulturüberständen erlauben (Yu and Linial 1993).

#### 2.1.2. Bakterienstämme

**JM109** (Novagen, Bad Soden) (Stamm: *Escherichia coli*) diente der Vermehrung und Präparation von Plasmid-DNA.

**XL1blue** (Novagen, Bad Soden) (Stamm: *Escherichia coli*) wurde ebenfalls zur Vermehrung und Präparation von Plasmid-DNA verwendet.

**TOP10F<sup>+</sup>** (Invitrogen, Leek, Holland) (Stamm: *Escherichia coli*) in diesem Stamm wurden die Produkte des Topo Vektors zwischenkloniert.

#### 2.1.3. Antikörper

Kaninchen Anti-HFV-MA Antiserum	H. Bannert, persönliche Mitteilung
Kaninchen Anti-HFV-RT Antiserum	H. Bannert, persönliche Mitteilung
Kaninchen Anti-HFV-SU Antiserum	H. Bannert, persönliche Mitteilung
Kaninchen Anti-HFV-Prot. Antiserum	Warnat Dias
Kaninchen Anti-HFV-Bel 1 Antiserum	Löchelt <i>et al.</i> 1991
Kaninchen Anti-HFV- <i>Stul/Sspl</i> Antiserum	Löchelt <i>et al.</i> 1993
Kaninchen Anti-HFV-Bel 2 Antiserum	Löchelt <i>et al.</i> 1991

Kaninchen Anti-Sh ble Antiserum	Cayla Frankreich
Guinea Pig Anti-HTLV-1-Int. Antiserum	H. Bannert, persönliche Mitteilung
Kaninchen Anti-HFV-Int. Antiserum	H. Bannert, persönliche Mitteilung

#### 2.1.4. Enzyme

T4 DNA Ligase	Roche MB (Mannheim)
Shrimp Alkalische Phosphatase	Roche MB (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt), MBI Fermentas (St.Leon-Roth) , Stratagene (Heidelberg)
DNA Polymerase Pfu	Stratagene (Heidelberg)
DNA Polymerase Taq/Pwo Mix	Hybaid (Heidelberg)
Protein A-Peroxidase	Roche MB (Mannheim)
RNase A	Roche MB (Mannheim)
Proteinase K	Roche MB (Mannheim)

#### 2.1.5. Vektoren

**pUC 18** (Yanisch-Perron *et al.* 1985) fand als negatives Kontrollplasmid bei Transfektionen Verwendung.

**pCMV $\beta$ -Gal** wurde parallel zu anderen Plasmiden in die Zellen transfiziert um die Transfektionseffizienz zu testen.

**pAT 153** diente der Zwischenklonierung von PCR-Produkten.

**pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO-Vektor** diente ebenfalls der Zwischenklonierung von PCR-Produkten.

**pSV40/Zeo** aus diesem Vektor stammte das Zeocinresistenzgen welches in weitere Klonierungen einging.

**pHSRV13** (Löchelt *et al.* 1991) war der infektiöse Ausgangsklon für alle während meiner Arbeit entstandenen viralen Klone.

**pCS-HTLV** (D.Derse *et al.* 1995) ein infektiöser HTLV-1 Klon.

**pBC12-CMV** Vektor um Proteine in eukaryonten Zellen zu exprimieren.

### 2.1.6. Reagenzienzusammenstellung (Kits)

Megaprime DNA labelling Kit	Amersham-Buchler (Braunschweig)
TOPO-cloning-Kit	Invitrogen (Leek, Holland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
DC Protein Assay	Bio Rad (München)
Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
C-type-RT Activity Assay	Cavidi Tech (Uppsala, Schweden)
ECL-Westernblot-Kit	Amersham-Buchler (Braunschweig)

### 2.1.7. Molekulargewichtsmarker

#### DNA-Molekulargewichtsmarker:

1 kb DNA Leiter von NEB (Frankfurt):

Banden in Basenpaaren: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500

100bp DANN Leiter von NEB (Frankfurt):

Banden in Basenpaaren: 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

#### Protein-Molekulargewichtsmarker:

Vorgefärbter Protein-Marker von NEB (Frankfurt): Proteine	Größe
MBP- $\beta$ -Galaktosidase	175 kDa
MBP-Paramyosin	83 kDa
Glutamindehydrogenase	62 kDa
Aldolase	47 kDa
Triosephosphatisomerase	32 kDa
$\beta$ -Lactoglobulin A	25 kDa
Lysozym	16 kDa
Aprotinin	6 kDa

Das Laufverhalten der vorgefärbten Marker-Proteine wich zum Teil stark von den hier aufgelisteten Größen ab.





### 2.1.9. Häufig verwendete Puffer

TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
TAE	40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA
PBS	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 140 mM NaCl; 2,6 mM KCl; pH 7,4
20xSSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
Denharts Lösung	1% Rinderserumalbumin; 1% Ficoll 400; 1% Polyvinylpyrrolidon
4xProteinprobenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 40% Glycerol; 8% SDS; 2% β-Mercaptoethanol; 10 µg/ml Bromphenolblau
Transferpuffer	(25 mM Tris; 150 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol; pH 8,3)
SDS Gelelektrophorese Laufpuffer	(54 mM Tris/HCl pH 8,5; 380 mM Glycin; 0,1% SDS)
DNA-Probenpuffer	40% Saccharose; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol

### 2.1.10. Radiochemikalien

<b>α-[<sup>35</sup>S]-dATP:</b>	10,0 µCi/µl	Amersham (Braunschweig)
diente zur Markierung bei Sequenzierungen.		
<b>Pro-Mix([<sup>35</sup>S]-Cys und [<sup>35</sup>S]-Met):</b>	14,3 µCi/µl	Amersham (Braunschweig)
wurde bei RIPA in die Proteine eingebaut.		
<b>γ-[<sup>32</sup>P]-dATP:</b>	10,0 µCi/µl	Amersham (Braunschweig)
hiermit wurden Sonden für DNA und RNA Hybridisierungen markiert.		

## 2.1.11. Primer

Name	Komplementäre Bereiche	Sequenz	Besonderheiten
HSRV5' INT →	HSRV 5456 S	ATACCCGGGAAACCAAACCTGGATGCAG AGTTGGATC	Xma I Schnittstelle eingeführt
HSRV INT 3'α	HSRV 6583 S	CCGCTCGAGTTCATTTTTTCCAAATGAT CCATTGTTGCAGTGCATTGGTGGTGGC CTTCTGATGA	Xho I Schnittstelle eingeführt
Pacl sense	HSRV 4712 S	GCCTTAATTAAGGCTATGGAT	
HSRV INT←	HSRV 5425 A	ATACCCGGGTTTGGTATTACAATTAACCA CATAACTTCC	Xma I Schnittstelle eingeführt
BspEI anti	HSRV 7029 A	TTCACCACTATGGGTTCCGG	
Int 3'α	HSRV 6532 S	TCCCCGGGGGTCCCTCGAGTAAAGCG TCGACTGTAAGTATAGATAATTTAAACCC T	Xma I, Xho I, Sall Schnittstellen eingeführt
HTLV-I-5'	HTLV I Integrase S	CCCGGGGCCCTACTAATCACCCCT	Xma I Schnittstelle eingeführt
HTLV Integrase 3'	HTLV I Integrase A	CCGCTCGAGCGGGCTCTAGAACCCATG GTGTTGGTGGTCTTT	Xho I, XbaI Schnittstellen eingeführt
IS SEQ	HSRV 5354 S	GGCATCAGCCTACAAATACC	
IAS SEQ	HSRV 6572 A	GCAGTGTTCATTGGTGGTGC	
A HTIN Seq	HTLV Int. A	GTCCGGAGCTGGTTGGATTGT	Sequenzierprimer
S HTIN Seq	HTLV Int. S	CTTGTAGAACGCTCTAATGGC	Sequenzierprimer
Zeo 1	HSRV 10497 S	TCAGTCTCTGATGTTTGG	
Zeo 2	HSRV A	GATCCGCGGAATATGCGGCCGCCTAAC CATGAGCAAGATGTCCTACTC	
Zeo 3	HSRV 10856 S	TATCCGCGGCAAGCAGCTATGGAAGCTT ATGG	
Zeo 4	HSRV 12175 A	TTGTTTCGGCGTGGGTATGGT	
Zeo 5	PSV40zeo S	TTTTGCTCACATGTGTGCTGGG	
Zeo 6	PSV40zeo A	ATAGAAGGCCGCGGTGGAAT	
S bet Exo.	HSRV 9736 S	ACTGCAGGATTGGATCCCCA	
S bet Intr.	HSRV 9870 S	CAGATACTGACCCTGACTG	
AS bet Exo.	HSRV 10259A	CTGATAGTAGCGGTCCAGGA	
BHK18site S	Zeo18 10833 S	CATCTTGCTCATGGTTAGGCG	5'- Phosphorylierung
BHK18siteA	Zeo18 107 u. 11774 A	TTCCCTGTAATACTCTCCTCC	5'- Phosphorylierung
SupF S	Zeo18 500 u. 12166 S	CTCAGTAGCTGTTTACAATC	
Zeo 10638 S	Zeo 18 S	GGTAGATCTGTATGCAATGAGACA	
Zeo 11374 AS	Zeo 18 A	GAAGTCGTCCTCCACGAAGTC	
Zeo 9821 S	Zeo 18 S	GTGCAGAAAAGGCCTCAGAG	
BHK 2	Zeo18 1180 A	GTTGGGCGCCAATTGTCATGG	
BHK 3	Zeo 18 1280 S	CTTCCTGAAGCCATTGTCTATTGGC	5'- Phosphorylierung
Zeo 12770 S	Zeo18 12770 S		
12689 ZeoS		CCGACTTGATTGAGAAACCA	
274 Zeo A		TTCCGCTTTTCGGTGACCACT	
Seq. Zeo1	Zeo18	GCAGACTTCACCAATCCTAGG	Sequenzierprimer
Seq. Zeo2	Zeo18	GTTACTTCCTCTCTGAGGTCC	Sequenzierprimer
HT/U3	HSRV A	TGACAATGACCATGAAGAACTAGGGAA	

		AACTAGGAGG	
HT/U5	HSRV S	TGTAATAAATTTCTCTATATTGATTATCCT AAGGAGTTAC	
U3VbbAS	HSRV A	CACGTCTTCTCAAGGATTTTTAAATAGT CCAGC	
U5VbbS	HSRV S	ATTGGCGCCCAACGTGGGGCTCG	
Eag I S	HSRV S	GTCGGCCGCTCTAGAAGTACTAGT	
Eag I A	HSRV A	CCTAGTTTTCCCTAGTTTCTAGTCATGGT CATTGTCA	
Swal S	HSRV 43 S	GGACTATTTAAAAATCCTTGAGGAAGAC GTGACAATGACCATGA	
Swal A	HSRV 2907A	GAGGTTGGTAAGTACGGGGTCAAGA	
U3VbbII A	HSRV 40 u. 4034 A	CGTCTTCTCAAGGATTTTTAAATAGTCC AGC	
U5VbbII S	HSRV 1195 S	TGGCGCCCAACGTGGGGCTCGAATATAA AAGC	
Eagl A II	HSRV 4032 A	TCATGGTCATTGTCACGTCTTCTCAAG GATTTTTAAATAGTCC	
Swal S II	HSRV 86 S	TGACAATGACCATGACTAGAACTAGGG AAAAGTGGAGGAGAG	
HS/HT/U3 S	HSRV 86 S	GGTGACAATGACCATGACTAGAACTAG GGAAAAGTGGAGGAGG	5'- Phosphorylierung
HS/HT/U5A	HSRV 1150 A	ATTGTGTAATAAATTTCTATATTGATTATC CTAAGGAGTTACATC	5'- Phosphorylierung
HT/HT/U3 S	HSRV 86 S	GATGACAATGACCATGACTAGAACTAG GGAAAAGTGGAGGAGG	5'- Phosphorylierung
HT/HT/U5 A	HSRV 1150 A	ACTGTGTAATAAATTTCTATATTGATTATC CTAAGGAGTTACATC	5'- Phosphorylierung
IIVbb S	HSRV 12024 S	CAATTGGCGATACCGTCGAC	
IIVbb A	HSRV 10883 A	CCCTCTCCTCGTTACTTCTCT	
MEagl S	HSRV 86 S	CCTTGGCGCCGACGTGACAATGACCATG ACTAGAACTAGGGAAAAGTGGAGGAG AG	
LTR U5 S	HSRV 1190 S	GAAATTTAGTACACAATTGGCGCCCAAC GTGGGGCTCGA	
LTR U5 A	HSRV 11986 u. 1153 A	TGTGTAATAAATTTCTATATTGATTATCCT AAGGAGTTAC	
SgrAI A	HSRV	GCATCACCGGCGCCTGTGTAATAAATTT CTATATTGATTATCCTAAGG	
BsmBI S	HSRV	AGGCACGATCCTGTCCTTCGATGT	
LTR U3HT A	HSRV	TCATGGTCATTGTCACCCTCTCCTCGTTA CTTCTCT	
Seq. 1261 A	HSRV	TATGCTCGGAGGTCCCAT	Sequenzierprimer
Seq. 2940 A	HSRV	TTCGTCCACGTCCTCCTC	Sequenzierprimer
Seq. 15340 S	HSRV	AAGAATCATAATGGGGAA	Sequenzierprimer
Seq. 10830 S	HSRV	GACATCTTGCTCATGGTT	Sequenzierprimer
Seq. 12360 A	HSRV	CACTATCGACTACGCGAT	Sequenzierprimer
Swal S neu	HSRV	TGACAATGACCATGACTAGAAACCAGGG AAAACAAGGAGGAGAG	
SgrAI S lang	HSRV 10931 S	GAGGAGAGGGTGACAATGACCATGACTA GAAACCAGGGAAAACAAGGAGGAGAG	
CHIMHS S		ATTCTTAAACGACTTTTAACTAAACTG	
CHIMHT A		TAAAAGTCGTTTAAAGAATGCCATTAGA	
Seq. CHIM		TACTACCCATGTCCCTTAC	Sequenzierprimer

RT1S	HSRV 1020 S	CGACTTGATTGAGAACCTACTCA	
RT2A	HSRV 11790 A	GAAAGCATTGCAATCACCTTACA	
3180S	HSRV	CTGGGATTCAGGGGCAACAA	
6550S	HSRV	AGCGCATGAGGCACTTCAA	
850S	HSRV	CGAGAGTGTACGAGACTCTCC	
12428S	HSRV	GGTGCGCATAGAAATTGCATC	
15340AS	HSRV	GCCTTCCCCATTATGATTCTT	
5281S	HSRV	GGCATCAGCCTACAAATACC	
6550A	HSRV	TTGAAGTGCCTCATGCGCTT	

### 2.1.12. Fotografisches Material

Bio-Max-MR (Autoradiographiefilm)	Kodak (Stuttgart)
NEF-496 (Autoradiographiefilm)	NEN (Boston, MA, USA)
ISO 3000/36 (Instantfilm)	Polaroid (St. Albans, UK)
Rodinal (Entwickler)	Agfa-Gevaert (Leverkusen)
Hypam (Fixierer)	Ilford (Neu-Isenburg)

### 2.1.13. Verbrauchsmaterial

Einmalkanülen	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Einmalspritzen	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Elektroporationsküvetten	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Filterpapier	Schleicher&Schuell (Dassel)
Haushaltsfolie	Melitta (Minden)
Hybridisierungsröhren	Saur Laborbedarf (Reutlingen)
Kunststoffküvetten	Greiner (Nürtingen)
Nitrozellulose-Membranen	Schleicher&Schuell (Dassel)
Nylonmembranen Hybond N+	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Parafilm	American National Can (Greenwich, CT, USA)
Pasteur-Pipetten	WU (Mainz)
Petrischalen	Greiner (Nürtingen)
Quarzglasküvetten	Migge (Heidelberg)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifugenbecher	Beckmann (Palo Alto, CA, USA)
Whatman 3MM Papier	Schleicher&Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen	Greiner (Nürtingen)
Zellkulturschalen	Greiner (Nürtingen)

**2.1.14. Geräte**

Begasungsbrutschrank	Forma Scientific (Ohio, USA)
Begasungsbrutschrank	Heraeus Christ (Hanau)
Biofuge A-Tischzentrifuge	Heraeus Christ (Hanau)
Drehschüttler Reax 2	Heidolph (Rust)
Durchflußzytometer FACS	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Bio-Rad (München)
Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage Modell P1210	Mettler (Gießen)
Filmkassetten	BTS (St. Leon-Rot)
Gelapparaturen	Renner GmbH (Dannstadt)
Handzähler Beta Gamma Monitor	Berthold (Pforzheim)
Hämozytometer	Migge (Heidelberg)
„Neubauer Zählkammer“	
Horizontale Agarosegelapparaturen	Renner GmbH (Dannstadt)
Hybridisierungsöfen	Bachhofer (Reutlingen)
Immunoblot-Transfer-Apparatur	Renner GmbH (Dannstadt)
Lichtmikroskop Diavert	Zeiss (Wetzlar)
Magnetrührer	Heidolph (Rust)
Mikrowellenherd	Bosch (Stuttgart)
Minifuge	Heraeus Christ (Hanau)
Minicycler	Biozym (Oldendorf)
Pipettierhilfe Pipettus Akku	Hirschmann (Eberstadt)
Phosphoimager	Molecular Dynamics/Pharmacia (Freiburg)
Reinraumwerkbank Sterilgard Hood	Baker Company (Sanford, Maine, USA)
Schüttler SM25	Edmund Bühle (Tübingen)
Scintillationszähler	Becton (Erlangen)
Sequenzgelapparaturen Base Ace, Base Ace Jr.	Stratagene GmbH (Heidelberg)
Sofortbildkamera MP-4 Land Camera	Polaroid (Cambridge, MA, USA)
Sorvall F 28/50, Titan-Festwinkelrotor	DuPont de Nemours (Bad Homburg)

---

Sorvall GSA, Alu-Festwinkel-Rotor	DuPont de Nemours (Bad Homburg)
Sorvall-Superspeed-Zentrifuge RC5C	DuPont de Nemours (Bad Homburg)
Sorvall-Ultrazentrifuge OTD75B	DuPont de Nemours (Bad Homburg)
Spannungsgeräte	RennerGmbH (Dannstadt), Bio-Rad (München), Biotech-Fischer (Heidelberg)
Spannungsgerät Macrodrive 5	LKB (Cambridge, GB)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
UV-Handlampe	Ultra Violet Products (San Gabriel, CA, USA)
UV-Transilluminator N90	Konrad Benda (Wiesloch)
Vacuum Concentrator	Bachhofer Laborgeräte (Reutlingen)
Vakuumgeltrockner Modell 483	Bio-Rad (München)
Vortex VF2	Janke & Kunkel (Staufen)
Wasserbäder	GFL (Burgwedel)
Wippschüttler WS5	Edmund Bühler (Tübingen)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Arbeiten mit Bakterien

#### 2.2.1.1. Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien durch DMSO

200ml SOB-Medium wurden mit Bakterien angeimpft. Bei 18°C wuchsen die Bakterien bis zu einer OD von 0,6 bei 700 nm. Anschließend standen sie 15-30 min auf Eis, bevor sie bei 4000xg 10 min abzentrifugiert wurden. Das Sediment wurde in 80 ml TB-Puffer aufgenommen und vor dem erneuten Abzentrifugieren 10min auf Eis inkubiert.

Die Bakterien wurden in 20 ml TB-Puffer + 1,47 ml DMSO resuspendiert, und nach weiteren 10 min auf Eis aliquotiert (je 500 µl).

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 90µl Bakteriensuspension mit bis zu 10 µl Ligationsansatz gemischt und 15 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde dann für 45-60 sec im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Vor dem Ausplattieren kamen die transformierten Bakterien in 1ml Medium und schüttelten 1h bei 37°C.

#### 2.2.1.2. Herstellung und Transformation von Bakterien zur Elektroporation

Eine frische Übernachtskultur der Bakterien wurde 1:100 in einem Liter LB-Medium verdünnt. Auf dem Schüttler wuchsen die Bakterien bei 37°C bis zu einer OD von 0,6. Um die Bakterien zu ernten wurden sie für 15-30 min auf Eis gestellt. Danach wurden sie bei 4000xg für 15 min abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in einem Liter eiskaltem sterilem Aqua bidest resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Erneut wurde dann das Pellet in 0,5 Liter eiskaltem Aqua bidest resuspendiert und zentrifugiert. Diesmal wurden die Bakterien in 20ml 10% Glycerol (4°C) aufgenommen und ein letztes Mal zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10% Glycerol auf ein Endvolumen von 3ml gebracht und in Portionen von 50µl aliquotiert.

Die Aliquots wurden sofort schockgefroren in mit Trockeneis gekühltem Ethanol.

Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Der Ligationsansatz wurde gefällt und in aq.bidest aufgenommen. Bis zu 2 µl Ligationsansatz wurden mit 40 µl kompetenten Bakterien in einer Elektroporationsküvette (2 mm Spalt) gemischt und sofort elektroporiert



(Einstellungen: 200  $\Omega$ ; 2,5 kV; 25  $\mu$ F). Die kompetenten Bakterien sollten dabei auf Eis auftauen und die Küvette ebenfalls gekühlt sein. Durch den Elektroschock bilden sich winzige Löcher in der Zellwand der Bakterien, durch welche die Plasmide in die Zelle gelangen können. Um den Bakterien Zeit zu geben sich zu erholen und mit der Synthese der auf dem Plasmid vorhandenen Resistenzgene zu beginnen wurden sie vor dem Ausplattieren in 1 ml SOC-Medium 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden sie auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **2.2.2. Arbeiten mit DNA**

### **2.2.2.1. Plasmidpräparation zur Analyse**

Die Bakterien wurden über Nacht in 3ml LB-Medium (37°C) auf dem Schüttler kultiviert. Von dieser Kultur wurde 1 ml steril abgenommen und in Eppendorf Reaktionsgefäßen (ERG) 30 sec bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100  $\mu$ l abgenommen und die Bakterien darin resuspendiert. In 300  $\mu$ l TENS-Puffer wurden sie lysiert. Durch Zugabe von 150  $\mu$ l 3 M NaAc pH5,2 wurden die Proteine ausgefällt. Nach abzentrifugieren 2 min bei 14000 rpm wurde der Überstand in ein neues ERG gebracht und die DNA mit 900  $\mu$ l -20 °C kaltem Ethanol gefällt. Die DNA wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nun wurde sie in 25  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen und stand für analytische Restriktionsverdauung zur Verfügung.

### **2.2.2.2. Plasmidpräparation im großen Maßstab (Quiagen-Kit)**

Eine bakterielle Über-Nachtkultur (ca. 200 ml) wurde abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 (Lysepuffer) stand die Probe 5 min bei Raumtemperatur. Nun wurden weitere 10 ml Puffer P3 zugegeben und die Suspension 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde sie abzentrifugiert (30 min 4000 rpm) und der Überstand durch einen Filter auf eine equilibrierte Qiagen tip500 (Maxi) Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Nun konnte die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert werden. Mit 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt, anschließend abzentrifugiert (30 min

4700 rpm), mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert um schließlich in 200 µl TE aufgenommen zu werden. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ist die DNA nun über viele Monate haltbar.

### **2.2.2.3. Plasmidpräparation im großen Maßstab (CsCl-Methode)**

200-500 ml bakterielle Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und das Sediment in 10 ml IHB1-Puffer resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 20 ml IHB II-Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden 15 ml IHB III-Puffer zupipettiert und erneut gemischt. Das Gemisch mußte weitere 10 min auf Eis stehen und wurde dann abzentrifugiert (6000 rpm 30 min). Der Überstand wurde filtriert, mit 36 ml Isopropanol gefällt und nach 30 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet trocknete invertiert 10 min. Nun wurde es in 5 ml TE-Puffer gelöst und durch Zugabe von 5 ml 5 M LiCl die RNA ausgefällt. Die RNA fällte 30 min auf Eis und wurde dann 30 min bei 5000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals mit 9 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert. Die ausgefällte DNA wurde 10 min im Vakuum getrocknet, dann in 9 ml TE gelöst. Nach Zugabe von 9,43 g CsCl und 257 µl 10 µg/ml EtBr wurde der Refraktionsindex auf 1,39 eingestellt.

Bei 48000 rpm wurde die Lösung nun mindestens 16 h zentrifugiert. Dann konnte die DNA, als leuchtende Ethidiumbromidbande erkennbar, mittels einer Spritze aus dem Zentrifugenröhrchen abgesaugt werden. Um das EtBr zu entfernen, wurde 5x mit wassergesättigtem 2-Butanol ausgeschüttelt. Anschließend wurde die DNA 2x gefällt und in TE aufgenommen.

### **2.2.2.4. DNA Mengenbestimmung**

Zur photometrischen Quantifizierung wurden die DNA-Lösungen verdünnt und die Extinktion bei 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) gegen Lösungsmittel (TE) gemessen. Eine Extinktionseinheit von 1 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA oder 33 µg Oligodesoxynukleotid pro ml (Sambrook *et al.* 1989).

### **2.2.2.5. DNA Sequenzierung**

DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe des Sequenase Kit 2.0 (USB) unter Nutzung der Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Dazu wurden 10 µg DNA gefällt, mit 2 µl

Primer (2,5 pmol), 3,5 µl H<sub>2</sub>O und 4,5 µl NaOH (2 M) versetzt, die Mischung wurde 5 min bei RT inkubiert und das DNA-Primer-Gemisch danach mit 3 µl Ammoniumacetatlösung (3 M, pH 4,8) und 40 µl Ethanol (-20°C) gefällt. Die pelletierte und getrocknete DNA wurde in 10 µl „Sequenase“-Puffer gelöst und 2 min im Wasserbad bei 65°C erhitzt. Nach langsamem Abkühlen unter 40°C wurden 1 µl DTT, 2 µl „Lab-Mix“, (1:5 in H<sub>2</sub>O verdünnt), 1 µl α<sup>[35S]</sup>dATP (1 µCi) und 2 µl „Sequenase“, (1:8 in „Sequenase dilution buffer“, verdünnt) zugegeben und die Mischung 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden jeweils 3,3 µl des Reaktionsmixes zu vorbereiteten Aliquots (jeweils 2,5 µl) der Didesoxynukleotide ddGTP, ddATP; ddTTP und ddCTP gegeben und die Mischungen 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 4 µl „Stoplösung“, beendet und die Sequenzierungsprodukte nach 2 min Erhitzen auf 92°C und sofortigem Abkühlen auf Eis im Polyacrylamidgel (12,5 ml 40% Acrylamid/2% Bisacrylamidlösung; 20 ml 5× TBE; 50g Harnstoff; 0,5 ml 10% Ammoniumperoxodisulfat, 30µl TEMED, auf 100ml mit H<sub>2</sub>O) mit TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Das Gel wurde 2 h bei 80°C in einem Geltrockner unter Vakuum getrocknet und die Banden autoradiografisch sichtbar gemacht.

#### 2.2.2.6. PCR

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation von DNA; entweder zur Analyse oder um diese für Klonierungen zu verwenden. Dabei fungieren zwei spezifische Oligodesoxynukleotide als Primer. Mit geringen Veränderungen in den Primern kann die ursprüngliche DNA Sequenz an den Enden variiert werden. Dient die PCR der Analyse, so muß unbedingt sehr sauber gearbeitet werden, da PCR eine äußerst sensitive Methode ist. Die PCR Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert und eventuell nach Aufreinigung im Topovektor zwischenkloniert.

Ansatz (50 µl):	10×Pfu-Puffer	5 µl
	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2,5 Units
	Primer	0,1 µM
	dNTPs	2 µM
	Template-DNA	ca. 10 ng

Vor Beginn des ersten Zyklus stand ein Denaturierungsschritt von 10 min bei 94°C. Die Anzahl der Zyklen lag zwischen 20 und 45. Nach Beendigung des letzten Zyklus schloß sich ein finaler Syntheseschritt an, der mindestens dreimal so lang dauerte wie die Synthese während der Zyklen. Die Syntheseleistung der Polymerase liegt bei ungefähr 1000 bp pro Minute.

#### **2.2.2.7. Aufreinigung von PCR-Produkten**

Ist die PCR sehr sauber, dh. es ist nur die gewünschte Bande ohne Nebenbanden amplifiziert worden, so konnte das PCR Produkt direkt aufgereinigt werden. Zur Reinigung der DNA diente das „QIAquick PCR-Purification Kit“ (Qiagen). Das Prinzip dieser DNA Aufreinigung beruht auf der Eigenschaft der DNA bei hohen Konzentrationen von chaotrophischem Salz an eine Silicagelsäule (Anionenaustauscher) zu binden. Diese Bindung ist bei pH 7,5 maximiert. Bei dieser Methode werden freie Nukleotide sowie überschüssige Oligodesoxynukleotide entfernt. Das PCR Produkt wurde dazu mit der fünffachen Menge PB Puffer gemischt, auf eine Quiaquicksäule aufgetragen und eine Minute bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Säule wurde dann zwei mal mit je 0,75 ml Waschpuffer erneut zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wurden 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 oder H<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben.

#### **2.2.2.8. Agarosegelelektrophorese**

Durch Aufkochen im Mikrowellenherd wurden 0,8% oder 1% Agarose in TAE Puffer gelöst. Nachdem diese Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Ethidiumbromid intercaliert in der DNA und leuchtet unter UV-Licht orange, wodurch die DNA-Banden sichtbar gemacht werden können. Das Gel wurde in einen Gelschlitten gegossen, dabei wurden durch einen Kamm die Taschen für die Proben ausgespart. In einer TAE gefüllten Gelkammer wurden die mit Probenpuffer versetzten DNA Proben auf das Gel aufgetragen. An eine Spannungsquelle angeschlossen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 50-150 Volt. Danach konnte die DNA unter UV-Licht (254 nm bzw. 312 nm) visualisiert und das Gel fotografiert werden.

#### **2.2.2.9. Elution von DNA aus Agarosegelen**

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) benutzt. Dieses beruht auf dem gleichen Prinzip wie der „QIAquick PCR-Purification Kit“ (Qiagen). Die zu eluierende Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in 3 Volumen Puffer QG1 auf ein Volumen Gel bei 50°C gelöst. War das Gel vollständig gelöst wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben. Diese Lösung wurde auf eine Quiaquicksäule geladen und eine Minute bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Waschschriffe und die Elution erfolgten wie bei der PCR-Aufreinigung.

#### **2.2.2.10. DNA-Restriktionsendonukleaseverdau**

Zum analytischen und präparativen Verdau von DNA wurde die DNA in dem vom Hersteller des Restriktionsenzym gelieferten Puffer und unter den angegebenen Bedingungen mit dem Enzym inkubiert. Zum analytischen Verdau von 1 µg DNA wurde etwa 1Unit Enzym verwendet und eine Inkubationszeit von 1 h gewählt. Bei präparativen Verdaus wurde die Enzymmenge erhöht bzw. die Inkubationszeit auf bis zu 16 h verlängert.

#### **2.2.2.11. Ligation**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase genutzt und die DNA vorher im vom Hersteller mitgelieferten Puffer gelöst. Die Ligation wurde mit 5U Enzym während 16 h bei 15°C in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde ein molares Verhältnis von etwa 3:1 (DNA-Fragment versus Vektor) gewählt.

#### **2.2.2.12. TOPO-Klonierung**

Bei der Topoklonierungstechnik wird ein PCR Produkt welches A-Überhänge besitzt direkt in einen Vektor inkloniert. Das PCR Produkt kann dadurch vor weiteren Klonierungsschritten zusätzlich angereichert werden. PCR Produkte, die mit Pfu Polymerase hergestellt wurden müssen vorher noch 30 min mit Taq Polymerase inkubiert werden um die Adenine anzuhängen. Von diesem PCR Ansatz werden 4µl mit 1 µl Topovektormix 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Davon wurde 1 µl zu den auf Eis aufgetauten Topobakterien gegeben und 30 min auf Eis stehen

gelassen. Danach wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C ausgesetzt und sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Vor dem Ausplattieren auf ampicillinhaltige Agarplatten schüttelten die Bakterien 30 min in SOC Medium.

#### **2.2.2.13. Ernten eukaryontischer Zellen zur Gewinnung von DNA**

Von einer 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale das Medium abgießen und mit PBS + 2 mM EDTA waschen. Die Schale gut abtropfen lassen und 3 ml Lysepuffer auf die Zellen geben. Die Schale so lange vorsichtig schwenken bis sich ein zähes Lysat gebildet hat. Dieses wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und über Nacht (55°C) mit 60 µl (10 mg/ml) Proteinase K verdaut. Das Lysat wurde zwei mal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Es kam dazu 30 min auf einen Drehmischer und wurde anschließend 10min bei 2000 rpm zentrifugiert. Haben sich die Phasen getrennt, wurde die obere wäßrige abgenommen und 3x gegen TE (4°C) dialysiert.

#### **2.2.2.14. DNA-Hybridisierung (Southernblotting)**

Die aufgereinigte genomische DNA wurde eventuell mit einem Restriktionsenzym verdaut (über Nacht). Der Reaktionsansatz für die Spaltung genomischer DNA enthält 400 µl DNA-Lösung, 47 µl H<sub>2</sub>O, 50 µl 10 x Puffer und 30 Units Enzym.

Die DNA wurde dann gefällt und in 20 µl TE + 5 µl DNA Probenpuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen. Das Gel lief über Nacht bei 40 V. Nach dem Lauf wurde das Gel fotografiert und die Größenmarkerbanden mit einem Skalpell eingekerbt. Um das Zucker-Phosphat-Rückrat der DNA an den depurinierten Positionen zu spalten wurde das Gel 10 min in 0,25 M HCl inkubiert und anschließend zwei mal 20 min in Denaturierungspuffer (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) gelegt. Danach erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>). Es wurde die Methode des Kappillartransfers oder Diffusionsblottings verwendet, bei der die DNA-Fragmente durch Heraussaugen der Flüssigkeit aus dem Agarosegel auf die Membran übertragen werden. Zunächst benötigt man dazu eine Packung Papierwischtücher auf welche zwei Lagen 3 MM-Papier gelegt wurden die kleiner als die Wischtücher aber größer als die Nylonmembran sein sollen. Darauf folgten zwei weitere in Denaturierungspuffer eingelegte Lagen 3 MM-Papier worauf zunächst die ebenfalls in Denaturierungspuffer eingelegte Nylonmembran und dann das Gel

gelegt wurden. Vor dem Blotten wurde die Membran 10min in Aqua bidest und 15 min in Denaturierungspuffer eingelegt. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Beim Abbau der Transferanordnung wurde zunächst der DNA-Größenmarker und die Probestaschen auf der Membran eingezeichnet. Die Membran wurde dann für 15min in Neutralisationspuffer eingelegt und später 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Danach kann die Membran zur Hybridisierung eingesetzt werden.

#### **2.2.2.15. Radioaktive Markierung der Sonde**

Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte mit dem Megaprime Kit von Amersham. Dieses enthält Markierungspuffer, Primer und Klenow Enzym. Die Sonde wurde mit  $^{32}\text{p}$  dCTP markiert. 1  $\mu\text{l}$  DNA (Sonde), 27  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 5  $\mu\text{l}$  Primer wurden zusammengegeben und 10 min bei 95-100°C denaturiert. Danach kühlte die Probe kurz ab, dann wurden 10  $\mu\text{l}$  Markierungspuffer, 5  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{p}$  dCTP und 2  $\mu\text{l}$  Klenow Enzym zugegeben. Nun schloß sich eine 10minütige Inkubation bei 37°C an. Die Reaktion wurde mit 5  $\mu\text{l}$  0,2M EDTA gestoppt.

Um überflüssige Nukleotide zu entfernen wurde die Sonde über eine Sephadex G75 Säule gereinigt.

Hierzu wurde eine 1 ml Tuberkulinspritze mit einem Glaswattepfropfen abgedichtet und mit dem Säulenmaterial (Sephadex G75) befüllt. Die Säule wurde noch zwei mal mit TE gewaschen, anschließend wurde die Sonde aufgetragen. Die Säule wurde nun in einem 15 ml Falcon Röhrchen stehend zentrifugiert (10-15 min 13000 rpm). Das Eluat enthielt die gereinigte Sonde. Bevor diese in die Hybridisierung eingehen konnte, mußte sie durch Kochen oder Zugabe von 5 M NaOH (Endkonz. 0,2M) denaturiert werden.

#### **2.2.2.16. Filterhybridisierung**

Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert. Zur Hybridisierung wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre ( $\varnothing$  3 cm bzw. 4 cm, Länge ca. 25 cm) kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit 10ml Hybridisierungslösung (50mM Natriumphosphat; 1% SDS; 1xDenhartslösung; 5xSSC; 0,1 mg/ml tRNA) mindestens 1 h bei 68°C im Hybridisierungsofen rotierend inkubiert („Prähybridisierung“). Die radioaktiv markierte Sonde wurde durch Zugabe von NaOH denaturiert, direkt zur

Prähybridisierungslösung gegeben und die Röhre mindestens 20 h im Hybridisierungssofen inkubiert (68°C, rotierend). Danach wurde die Hybridisierungslösung verworfen, die Membran in der Röhre mit Waschpuffer (2×SSC; 0,1% SDS; 68°C) gespült und im Wasserbad bei 68°C in 500ml Waschpuffer gewaschen. Dabei wurde mit Hilfe des Handzählers die Radioaktivität des Hintergrunds und der Banden überprüft und der Waschpuffer gewechselt. War der Hintergrund minimal, so wurde die feuchte Membran in Haushaltsfolie verpackt, in einer Autoradiographiekassette fixiert und exponiert.

### **2.2.3. Arbeiten mit RNA**

#### **2.2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde die saure Phenol-Chloroform-Guanidinthiocyanat-Methode verwendet (Chomczynski and Sacchi 1987).

Adhärente Zellen in 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturplatten wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 2 ml Lsg. D (4 M Guanidinthiocyanat; 25 mM Na-Citrat, pH 7,0; 0,5% Sarkosyl; 0,1 M β-Mercaptoethanol) pro Platte lysiert und die viskose Flüssigkeit in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Lysat konnte bei -20°C (oder -70°C) gelagert und bei Bedarf langsam aufgetaut werden. Es wurden 1/10 Volumen 2 M Na-Acetat (pH 4,0) und 1 Volumen Phenol, sowie 2/10 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und das Röhrchen 10 sec kräftig geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (Minifuge, 3000 U/min, 4°C, mindestens 30 min) wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 Volumen Isopropanol mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (Minifuge, 4000 U/min, 4°C, 30 min) wurde das RNA-Präzipitat in 600 µl Lsg. D resuspendiert, in ein ERG überführt und mit 600 µl Isopropanol mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 12000 U/min, 4°C, 30min) sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. In sterilem ddH<sub>2</sub>O oder TE resuspendiert, konnte die RNA bei -70°C gelagert werden.



### 2.2.3.2. Poly(A)<sup>+</sup>-Selektion von RNA

Für die Selektion von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA wurden mit oligo(dT)<sub>25</sub> beschichtete Magnetpartikel (Dynabeads<sup>®</sup>, DYNAL, Hamburg) verwendet. Dabei wurde die denaturierte mRNA zunächst an die oligo(dT)-Bereiche der Partikel gebunden. Durch Waschen wurde die nicht adenylierte RNA entfernt und anschließend die mRNA durch Veränderung der Ionenstärke eluiert.

50 µg Gesamt-RNA wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl gebracht und 3 min bei 65°C denaturiert. Parallel wurden 200 µl Dynabeads<sup>®</sup> in ein ERG überführt, mit Hilfe eines Magneten wurden die Partikel sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Partikel wurden mit 100 µl 2×Bindepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1,0 M LiCl; 2 mM EDTA) gewaschen, indem sie in Puffer resuspendiert und mit dem Magneten sedimentiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Die Dynabeads<sup>®</sup> wurden in 100 µl 2×Bindepuffer resuspendiert, mit der denaturierten RNA-Lösung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Partikel wurden mit Hilfe des Magneten sedimentiert und zweimal mit 200µl Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,15 M LiCl; 1 mM EDTA) gewaschen. Die mRNA wurde mit 10 µl Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 7,5) 5 min bei 70°C eluiert. Mit Hilfe des Magneten wurden die Partikel abgetrennt. Der Überstand enthielt etwa 1 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA.

### 2.2.3.3. RNA-Mengenbestimmung

Die Konzentration von RNA-Lösungen wurde analog zu DNA-Lösungen bestimmt (2.2.2.4.). Eine Extinktionseinheit von 1 bei 260 nm entspricht 40 µg RNA pro ml (Sambrook *et al.* 1989).

### 2.2.3.4. Horizontale RNA-Elektrophorese

RNA wurde in Agarosegelen im MOPS-Puffersystem aufgetrennt. Das Agarosegel wurde wie in 2.2.2.5. beschrieben, jedoch mit MOPS-Puffer, zubereitet und gegossen. Die RNA-Lösungen wurden mit mindestens dem gleichen Volumen RNA-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 70°C denaturiert, bevor sie direkt auf das Gel aufgetragen und bei 30 bis 50 V aufgetrennt wurden.

## **2.2.4. Arbeiten mit Proteinen**

### **2.2.4.1. Ernten eukaryontischer Zellen zur Gewinnung von Protein**

Zur Gewinnung von Protein aus eukaryontischen Zellen wurde das Medium abgegossen und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Nach kurzem Abtropfen des PBS wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Schale (10 cmØ) in ca. 150 µl 4x Proteinprobenpuffer, geerntet. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen im Puffer von der Schale gekratzt und in eine Qiaschreddersäule überführt. Durch die Qiaschreddersäule wurde die in der Proteinprobe enthaltene DNA gescheert, so daß die Probe flüssiger wurde und sich besser pipettieren ließ. Die Proteinprobe wurde dazu 1 min bei 13000 rpm durch die Säule zentrifugiert.

Für den Fall, daß die Proben zur quantitativen Proteinbestimmung eingesetzt werden sollten, wurden sie in 1% SDS geerntet und nicht in Probenpuffer, da dieser die Messung stört.

### **2.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „DC Protein Assay“ Kit (Bio-Rad) unter Nutzung der Methode von Lowry et al. 1951 verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden 20 µl Reagenz S pro ml zu Reagenz A zugegeben. Nun wurden 20 µl einer entsprechenden Verdünnung des Proteins in 1% SDS mit 100 µl Reagenz A+S und 800 µl Reagenz B gut vermischt und die Extinktion nach 15 min gegen einen Blindwert ohne Proteinzusatz bei 750 nm spektralphotometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichkurve von Rinderserumalbumin als Standardprotein unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

### **2.2.4.3. SDS Gelelektrophorese**

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden 5 min in SDS-Probenpuffer gekocht und unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Kornberg aufgetrennt. Hierbei erhalten die Proteine durch längeneinheitsspezifische Anlagerung von SDS eine einheitliche negative elektrische Ladung, so daß ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld im wesentlichen nur von ihrem Molekulargewicht abhängt. Ausserdem werden

Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört, so dass diese nicht das Laufverhalten beeinflussen. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel kommt es durch einen pH-Sprung zu einer Fokussierung der Proteine, was die Auflösung deutlich steigert. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erhalten, wurden meist 15%ige Gele verwendet.

Für das Trenngel wurde eine der angestrebten Acrylamidkonzentration in % entsprechende Menge an Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30% / 0,15%) in ml, d.h. 15 ml für ein 15%iges Gel, mit 7,5 ml Puffer (1,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 0,4% SDS) vermischt, auf 30 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und 300 µl 10% Ammoniumperoxodisulfatlösung sowie 20 µl TEMED zugegeben. Nach Giessen des Trenngels zwischen zwei durch Abstandshalter (1 mm) getrennte abgedichtete Glasplatten wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol mit Papier abgesaugt, ein Kamm eingesetzt und das Sammelgel (6% Acrylamid) gegossen. Die Sammelgellösung wurde aus 6 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30% / 0,8%), 7,5 ml Puffer (0,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 0,4% SDS); 16,5 ml H<sub>2</sub>O, 300 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10%) und 20 µl TEMED hergestellt. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Puffer gespült, das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Pufferreservoirs mit Laufpuffer gefüllt. Anschliessend wurden die Proben in die Taschen gefüllt, zusätzlich ein gefärbter Marker aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 80-100 Volt durchgeführt. Nachdem die Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet, das Sammelgel entfernt und das Gel entweder zum Elektrotransfer vorbereitet oder gefärbt. Zum Färben wurde das Gel für 5 bis 15 min in einer Färbelösung (0,25% Coomassie Brilliant Blue R250; 5% Essigsäure; 6% Methanol) geschüttelt und nach Entfernen der Färbelösung mit Wasser gewaschen. Danach wurde es in Entfärbelösung (5% Essigsäure; 6% Methanol) bis zum vollständigen Entfärben des Hintergrundes unter Schütteln inkubiert.

#### **2.2.4.4. Proteinimmundetektion (Western-Blot)**

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf Nitrozellulose Membranen transferiert und damit irreversibel an die Membran gebunden. Dort

können die Proteine mit Hilfe spezifischer Antiseren und einem gegen diese gerichteten, enzymgekoppelten Sekundärantikörper oder Protein A nachgewiesen werden (Towbin et al. 1979).

Der Elektrotransfer erfolgte im „Semidry“-Verfahren. Dabei wurde das Gel auf die Membran gelegt und beide gemeinsam zwischen jeweils vierlagige Schichten Whatman-3MM-Papier. Alle Komponenten wurden vorher in Transferpuffer getaucht. In einer Transferkammer wurden die Proteine anschliessend 1,5 h im elektrischen Feld bei  $1,5 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche auf die Membran transferiert.

Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran nach Beendigung des Transfers zunächst 1 h bei RT im Blockpuffer (PBS, 0,1% Tween-20; 1% Magermilchpulver) unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Im Anschluss wurde das spezifische Antiserum in entsprechenden, empirisch ermittelten Verdünnungen zugesetzt und 1h bei RT leicht geschüttelt. Nach 3 maligem (je 5 min) Waschen mit Blockpuffer wurde als Sekundärantikörper peroxidasekonjugiertes Protein A in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockpuffer der Membran zugegeben und unter leichtem Schütteln 1h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran 5x mit PBS (je 5 min) gewaschen.

Zur Detektion wurden verschiedene Methoden angewandt: Es wurden Färbungen mit 4-Chlor-1-naphthol oder ECL (*Enhanced Chemo*luminescence) durchgeführt.

Bei den Färbemethoden dehydriert die Peroxidase die zugesetzten Substrate zu Farbstoffen. Zum Färben der Membran wurde diese mit der entsprechenden Färbelösung (1:50 in PBS verdünntes 0,3%iges 4-Chlor-1-naphthol bzw. 1:50 in PBS verdünntes 1,5%iges Diaminobenzidin) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) in einer 1:1000 Verdünnung zugesetzt. Nach Erreichen einer ausreichenden Färbung wurde die Membran aus der Färbelösung entfernt, mehrmals in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und getrocknet.

Um schwächere Banden zu detektieren, wurde das ECL-Detektionsverfahren (ECL-Kit, Amersham) angewandt. Dabei oxidiert Peroxidase zyklisches Diacylhydrazid unter alkalischen Bedingungen, was zu Chemolumineszenz führt. Dabei wird die Membran in eine Mischung aus gleichen Teilen der ECL-Lösungen 1 und 2 getaucht und 1 min inkubiert. Die Chemolumineszenz wird autoradiographisch sichtbar gemacht

#### 2.2.4.5. Radioimmunpräzipitation

Die Radioimmunpräzipitation dient der Detektion von Proteinen, die sich im Westernblot nur schwer nachweisen lassen. Dabei wird radioaktiv markiertes Methionin und Cystein in das Zellkulturmedium gegeben, das dann von den Zellen in die Proteine eingebaut wird. Die gewünschten Proteine werden dann durch spezifische Antikörper gebunden und von den restlichen Proteinen getrennt. Dieses Protein wird dann auf ein SDS-Gel aufgetragen welches später getrocknet wird. Mittels eines Röntgenfilms kann die Proteinbande sichtbar gemacht werden.

Die Zellen wurden transfiziert und nach 24 h konnte mit der radioaktiven Markierung begonnen werden. Das alte Medium wurde verworfen, und 4 ml RIPA-Medium (4 ml Met/Cys freies Medium + 175 µl dialysierte FCS + 36 µl Pen/Strep + 19 µl 200 mM Glutamin) auf die Zellen gegeben. Eine Stunde später wurden pro Schale 20 µl <sup>35</sup>S Met/Cys zugegeben. Nach 5 h wurden die Zellen in 500 µl PBS + 1% Triton X100 geerntet. Vor der Ernte wurde das radioaktive Medium entsorgt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zellkerne wurden in der Tischzentrifuge 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und die Überstände in ein neues ERG überführt. Die Proben wurden mit 55 µl 10x RIPA-Puffer (1%SDS, 10% Na-deoxycholate) und 20 µl 25x Proteaseinhibitormischung (Boehringer) versetzt.

Für die Vorfällung wurden 50 µl ProteinA-Sepharose (gequollen und 1:1 mit RIPA-Puffer gemischt) und 10 µl Präimmunsereum des entsprechenden spezifischen Antikörpers zur Probe gegeben und 5 h auf dem Drehmischer inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden damit aus dem Ansatz herausgefällt. Die ProteinA-Sepharose wurde dann 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und die Überstände für die Hauptfällung in ein neues ERG überführt. Zu jeder Probe wurden 50 µl frische ProteinA-Sepharose und 10 µl des spezifischen Antiserums pipettiert. Die Hauptfällung blieb über Nacht auf dem Drehmischer. Wieder wurde dann die ProteinA-Sepharose abzentrifugiert, diesmal aber der Überstand verworfen. Die ProteinA-Sepharose wurde noch dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Nachdem der Waschpuffer vollständig entfernt war konnte die Probe mit 30 µl 2x Proteinprobenpuffer versetzt und anschließend aufgeköcht werden. Die gefällten Proteine lösen sich dadurch von der Sepharose und konnten anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen werden. Das SDS-Gel wurde nachfolgend getrocknet und durch Auflegen eines Röntgenfilms die Proteinbande(n) sichtbar gemacht.

## **2.2.5. Zellkulturarbeiten und Virusnachweis**

### **2.2.5.1. Transfektion eukariotischer Zellen durch Elektroporation**

Bei dieser Methode kann Plasmid DNA in eukaryontische Zellen eingebracht werden. Durch einen elektrischen Impuls bilden sich für Sekundenbruchteile Löcher in der Zellmembran, durch welche die DNA in die Zelle eindringen kann. Die Elektrotransfektion wurde ausschließlich mit BHK-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dafür zunächst wie beim Teilen abtrypsiniert, danach in PBS aufgenommen und bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen in frischem PBS entsprechend der Anzahl der Transfektionen aufgenommen. Pro Transfektion benötigt man 90 µl Zellsuspension und 10 µg DNA. Die DNA wurde zuvor gefällt und in 10 µl PBS aufgenommen. Zellsuspension und DNA wurden gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Einstellungen am Elektroporationsgerät waren folgende: 975 µFD und 0,16 kV. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen ausgesät wobei darauf zu achten war Zellklumpen zu verwerfen. Nach 3-5 h erfolgte ein Mediumwechsel.

### **2.2.5.2. Stabile Transfektion eukariotischer Zellen**

Die Transfektion erfolgt wie unter Punkt 2.2.5.1., das transfizierte Plasmid ist mit einer Antibiotikaresistenz ausgestattet durch welche erfolgreich transfizierte Zellen selektioniert werden können. In diesem Fall wurde, ein für ein Retrovirus codierendes Plasmid transfiziert, wobei das Virus selbst das Resistenzgen enthielt. Durch die Autointegration des Retrovirus konnte eine stabile Transformation einiger Wirtszellen erreicht werden. Gibt man nun das entsprechende Antibiotikum, für welches die Resistenz eingeführt wurde, zu den Zellen, so sterben diejenigen Zellen nach einiger Zeit ab, welche das Resistenzgen nicht stabil ins Genom integriert haben.

### **2.2.5.3. Einzelzellklone von stabil transfizierten eukariotischen Zellen**

Für einige Analysen war es erforderlich, Zellen mit identischem Erbgut zu haben. Stabil transfizierte Zellen bilden nach ca. 10 Tagen unter Antibiotika Suppression kleine Kolonien am Boden der Platte. Jede dieser Kolonien ist höchstwahrscheinlich

aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen. Um diese Kolonien zu picken wurden 1 mm<sup>2</sup> große sterile Stückchen Wortmanpapier in Trypsin eingeweicht und dann vorsichtig 5 min auf jede Kolonie gelegt. Anschließend wurden die Papierstückchen in 24 Lochplatten ausgelegt und die gepickten Zellen vermehrt. Die so gepickten Klone wurden in 96 Lochplatten erneut verdünnt. Ausgehend von ca. 50 Zellen pro Vertiefung wurde immer um die Hälfte verdünnt, bis davon ausgegangen werden konnte, pro Kultur nur eine einzige Zelle zu haben. Davon wurden dann die Einzel-Zell-Klone propagiert.

#### **2.2.5.4. Transfektion eukariontischer Zellen (chemisch)**

Die Kopräzipitationsmethode nach Chen and Okayama (1987) erlaubt eine schonende Transfektion von Zellen mit Plasmiden.

Am Tag vor der Transfektion wurden Zellen auf (10 cm<sup>2</sup> Ø) Zellkulturplatten so ausgesät, daß sie am nächsten Tag 50 bis 80% des Gefäßbodens bedeckten. 10 µg Plasmid-DNA wurden auf 450 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Dann wurden 500 µl 2xHBS-Puffer (50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,13) in 15 ml Röhrchen vorgelegt. Die 450 µl DNA wurden nun mit jeweils 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> gemischt und unter Schütteln zu den bereits vorgelegten 500 µl HBS-Puffer getropft. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde dann das Transfektionsgemisch langsam auf die Zellen geträufelt und mit dem Medium gemischt. Die Zellen wurden für 4 bis 6 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen weiter kultiviert wurden.

#### **2.2.5.5. β-Galaktosidase Assay**

Um den Virustiter in HSRV-haltigen Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurden HFAB-Zellen verwendet. HFAB-Zellen sind genetisch so verändert, daß sie das β-Galaktosidasegen unter der transkriptionellen Kontrolle des HSRV-LTR-Promotors stabil ins Genom integriert tragen. In HFAB-Zellen wird die Expression der β-Galactosidase durch den viruseigenen Transaktivator Bel1 stimuliert, was nach Zugabe von, unter anderem Galactopyranosid (X-Gal) zur Blaufärbung der Zellen führt, wenn Bel1 vorhanden ist.

Die FAB-Zellen wurden dazu in 24 Lochplatten ausgesät. Der zu untersuchende Zellkulturüberstand wurde als Verdünnungsreihe in Zehnerschritten auf die FAB-Zellen gegeben und die Zellen zwei Tage im Inkubator wachsen gelassen.

Für die eigentliche Färbung wurden die Zellen dann zunächst mit PBS 1 mM  $MgCl_2$  gewaschen und anschließend 5 min lang fixiert. Dazu diente eine Formaldehydlösung (PBS 1% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd).

Durch dreimaliges waschen mit PBS wurde die Fixierlösung von den Zellen entfernt. Nun wurden 300  $\mu$ l Färbelösung pro Vertiefung zugegeben (PBS,  $MgCl_2$  2 mM,  $KFe(CN)_4$  II 4 mM,  $KFe(CN)_6$  III 4 mM, X-Gal 4 mg/ml). Die Färbelösung verblieb nun mindestens 1 h auf den Zellen, bis sich das Auszählen der blauen Zellen anschloß.

#### **2.2.5.6. Nachweis reverser Transkriptase**

Mit Hilfe des C-type-RT Aktivitäts Assays läßt sich die Aktivität der reversen Transkriptase in einer Probe bestimmen. Die RT synthetisiert einen DNA Strang an ein immobilisiertes Template-Primer-Konstrukt. Hierbei wird Bromodeoxyuridinetriphosphat (BrdUTP) in den Strang incooperiert. Durch einen BrdUTP bindenden Antikörper, welcher mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, kann das Produkt der RT-Reaktion sichtbar gemacht werden und in einem Elisaesegerät quantifiziert werden. Vor Beginn der Reaktion wurden die Puffer B1, B2, C1 und C2 den Angaben des Herstellers gemäß präpariert. Dann wurde die 96 Lochplatte welche schon mit dem Template der RT Reaktion beschichtet ist aufgetaut und in jede Vertiefung 200  $\mu$ l Reaktionsmix pipettiert. Anschließend stand die Platte abgedeckt 30min auf dem Schüttler bei 33°C. Pro Well wurden nun 10  $\mu$ l Probe, geerntet in Puffer B, zugegeben. Die RT Reaktion konnte nun bei 33°C ablaufen. Nach 1 bis 24 h wurde die Reaktion durch Waschen der Platte mit dem mitgelieferten Waschpuffer gestoppt. Nach kurzem Trocknen (invertiert ca. 10min) konnte die Platte nun gleich weiterbearbeitet oder bei -20°C eingefroren werden. Im nächsten Schritt wurden 100  $\mu$ l des BrdUTP bindenden AP-gekoppelten Antikörpers (Lösung O) in die Vertiefungen getropft. Nach 90min bei 33°C wurden überschüssige Antikörper abgewaschen und die Alkalische-Phosphatase-Reaktion gestartet. Dazu wurden 125  $\mu$ l AP-Substrat zugegeben und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1-3 h wurde die Absorption der Proben bei 405 nm gemessen.



### **2.2.6. Computeranalysen**

Computeranalysen von DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des HUSAR (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*)-Programmpakets auf Convex SSP-1000 durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Austausch der HSRV-Integrase gegen die HTLV-1-Integrase in pHSRV13

Die Integrase des infektiösen HSRV-Klons **pHSRV13** sollte gegen die Integrase des HTLV-1 ausgetauscht werden, um die Integrationsfrequenz zu steigern. Das Plasmid **pHSRV13** enthält das gesamte provirale HSRV-Genom im Kontext des Vektors **pAT153** und kann nach Transfektion in eukaryotische Zellen eine lytische Infektion induzieren. Es sollte nun untersucht werden, ob HSRV mit der HTLV-1-Integrase ebenfalls replikationsfähig ist und ob eine erhöhte Integrationsfrequenz in die Wirtszell-DNA stattfindet.

Drei neue provirale Klone wurden ausgehend von **pHSRV13** kloniert. Zunächst das Plasmid **p13ΔIN15**, dessen Provirus Integrase defizient ist, und den Ausgangsklon zu **p13HTIN5** darstellt. In diesem viralen Konstrukt (**p13HTIN5**) wurde die HSRV Integrase gegen die HTLV-1-Integrase ausgetauscht. Als Kontrolle diente das Plasmid **p13HSIN11** mit wieder neu inserierter HSRV-Integrase.

Die Schnittstelle der viralen Protease, welche im HSRV-Genom bei Nukleotid 5370 liegt, und die die Integrase vom Pol-Vorläufer Protein trennt, wurde bei den chimären Klonen erhalten, um eine korrekte Prozessierung zu gewährleisten. Sechs Aminosäuren hinter dieser Spaltstelle beginnt die HTLV-1-Integrase im Klon **p13HTIN5**. Da der Start von *env* mit dem Ende der Integrase überlappt, wurde beim Klonieren darauf geachtet, daß der Beginn von *env* sowie der Spleißakzeptor von *env* voll erhalten blieben. Dadurch entstand in dem Klon **p13HSIN11** eine Sequenzwiederholung von ca. 70 bp, die ihn von **pHSRV13** unterschied.

Zum Austausch der Integrase war eine Dreikomponentenligation mit mehreren Zwischenschritten erforderlich. Mittels PCR wurden die HTLV-1-Integrase und jeweils ein Fragment direkt oberhalb der HSRV-Integrase (F1) und eines direkt unterhalb der HSRV-Integrase (F2) amplifiziert. Mit Hilfe der Primer wurden neue Restriktionsschnittstellen in diese Fragmente eingeführt. F1 wurde mit den Primern *PacI sense* und *HSRV Int<sup>-</sup>* amplifiziert; F2 mit den Primern *BspEI anti* und *Int3`a*;

die HTLV-1-Integrase mit den Primern *HTLV1-5'* und *HTLV Integrase 3'*. Als Matrize für die Amplifikation der HTLV-1-Integrase diente der infektiöse Klon **pCS-HTLV** (Derse et al. 1995). Die Matrize für die Amplifikation der DNA-Teilstücke F1 und F2 war **pHSRV13**.

In das Fragment F1 wurde am 3' Ende eine XmaI-Schnittstelle eingeführt. In das Fragment F2 wurde am 5' Ende eine multiple Klonierungsstelle eingefügt, welche von 5' nach 3' die Restriktionsschnittstellen XmaI, XhoI und Sall enthielt. Zusätzlich befand sich zwischen der XhoI- und der Sall-Schnittstelle ein Stop-Codon im Leseraster der Integrase.

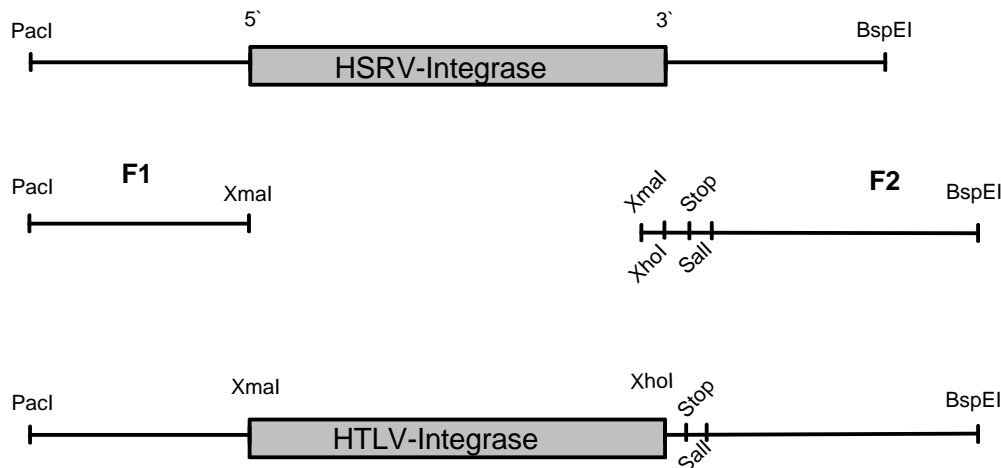


Abb.1:  
Schematische Darstellung der Klonierung zum Austausch der Integrase.

Zunächst wurde nun der Vektor **pHSRV13** mit Pacl und BspEI geschnitten und aufgereinigt. Dann wurde F1 mit Pacl und XmaI und F2 mit XmaI und BspEI geschnitten (Abb.1). In einer Dreikomponentenligation wurden die DNA-Fragmente F1 und F2 mit dem Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid **p13ΔIN15** entsprach **pHSRV13** mit deletierter Integrase, an deren Platz nun die multiple Klonierungsstelle gerückt war. Mit Hilfe dieser Klonierungsstelle konnte nun die HTLV-1-Integrase eingesetzt werden. Der Vektor **p13ΔIN15** und die Integrase wurden mit XmaI und XhoI verdaut und die beiden Teile ligiert. Dieses Konstrukt **p13HTIN5** enthielt nun statt der HSRV-Integrase die HTLV-1-Integrase. Als Kontrolle wurde die HSRV Integrase nach der gleichen Klonierungsmethode in **p13ΔIN15** rekloniert, wodurch **p13HSIN11** entstand.

Überprüft wurden die Konstrukte durch DNA-Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, daß die HTLV-1-Integrase korrekt inseriert worden war.

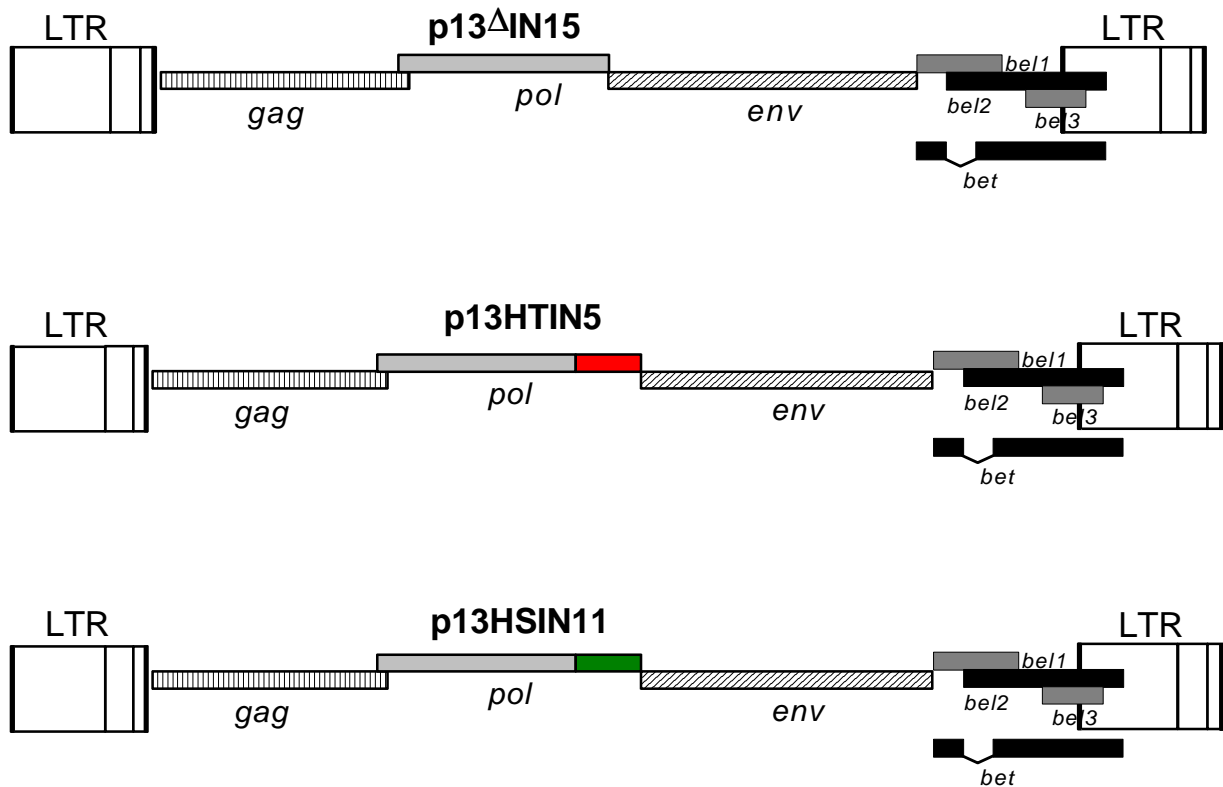


Abb.2:

Genomkarte der Plasmide **p13 $\Delta$ IN15**, **p13HTIN5** und **p13HSIN11**. Die Anteile von HTLV-1 sind rot dargestellt. Die wiedereingesetzte HSRV-Integrase in Plasmid **p13HSIN11** ist grün dargestellt.

### 3.1.1. Nachweis viraler Proteine in transfizierten eukaryotischen Zellen

Die Analyse der viralen Proteine wurde ausgeführt, um zu bestimmen, ob die viralen Proteine exprimiert werden und ob die Prozessierung korrekt erfolgt. Dies gab jedoch noch keinen Aufschluß über Integration oder die Bildung von infektiösen Viruspartikeln, da die Transkription auch von dem transfizierten Plasmid ohne Integration stattfinden kann. Für die Transfektionen der Klone **p13 $\Delta$ IN15**, **p13HTIN5** und **p13HSIN11** wurden zwei unterschiedliche Zelltypen benutzt, um zellspezifische Charakteristika zu erkennen.

### Transfektion in BHK-Zellen:

BHK-Zellen sind schnell proliferierende immortalisierte Hamster-Nieren-Zellen. Sie haben eine hohe Transfektionseffizienz (30%) und lassen sich gut mit HSRV infizieren. Eine Transfektion mit **pHSRV13** oder eine Infektion mit HSRV-Partikeln ist durch eine deutliche Syncytienbildung, die Freisetzung infektiöser Viruspartikel und die Expression viraler Proteine gekennzeichnet.

Die BHK-Zellen wurden mittels Elektroporation mit je 10 µg DNA transfiziert und 24 oder 48 h nach der Transfektion geerntet. Die Zellen wurden direkt in Proteinprobenpuffer aufgenommen und im Immunoblot (Westernblot) mit anschließender ECL-Detektion analysiert. Das Zellysat aus **pUC18**-transfizierten Zellen diente als Negativkontrolle, das Zellysat aus **pHSRV13**-transfizierten Zellen als Positivkontrolle für die HSRV Proteine.

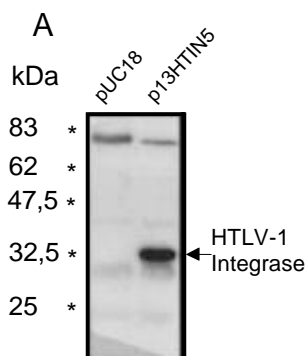


Abb.3:

Nachweis der HTLV-1-Integrase in mit **p13HTIN5** transfizierten BHK-Zellen, einen Tag nach der Transfektion. Die Detektion erfolgte mit Anti-HTLV-1-Integrase-Antiserum. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben.

Der Nachweis der HTLV-1-Integrase, exprimiert von dem Plasmid **p13HTIN5**, ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Integrase ist im Westernblot als 34 kDa großes Protein detektierbar. Der Nachweis gelang in BHK-Zellen 24 h nach der Transfektion, 48 h nach der Transfektion war die HTLV-1-Integrase nicht mehr nachweisbar.

Die akzessorischen Proteine Bet und Bel1 waren nach der Transfektion mit **p13ΔIN15**, **p13HTIN5** und **p13HSIN11** mit einem Bel1/Bet spezifischen Antiserum gut detektierbar (Abb. 4, B). Die Transaktivierung durch Bel1 sollte demnach bei diesen Klonen korrekt erfolgt sein.

Das 127 kDa Pol-Vorläuferprotein war bei dem Klon **p13HSIN11** als auch bei **p13HTIN5** nur schwach zu detektieren. Das Plasmid ohne Integrase (**p13ΔIN15**) zeigt ein um die 44 kDa der HSRV-Integrase verkürztes Pol-Protein. Bei **p13HSIN11**

und **p13HTIN5** erkennt man mit dem Anti-Protease-Serum die prozessierte Pol-Bande, von welcher die Integrase bereits abgespalten war (Abb. 4, C). Klon **p13ΔIN15** zeigte eine Doppelbande bei p80-Pol, da der ca. 4,5 kDa große Teil der Integrase, welcher mit *env* überlappt, bei der Klonierung erhalten wurde. Da auch die Protease-Schnittstelle, welche die Integrase vom Pol-Vorläuferprotein trennt, intakt sein sollte, wurde dieser C-terminale Bereich der Integrase normal prozessiert. Die beiden Gag-Banden (pr71 und p68) ließen sich bei Klon **p13HTIN5** und **p13HSIN11** nachweisen. Bei **p13ΔIN15** wurde Gag nicht prozessiert, nur die obere Bande (pr71) war detektierbar (Abb. 4, A).

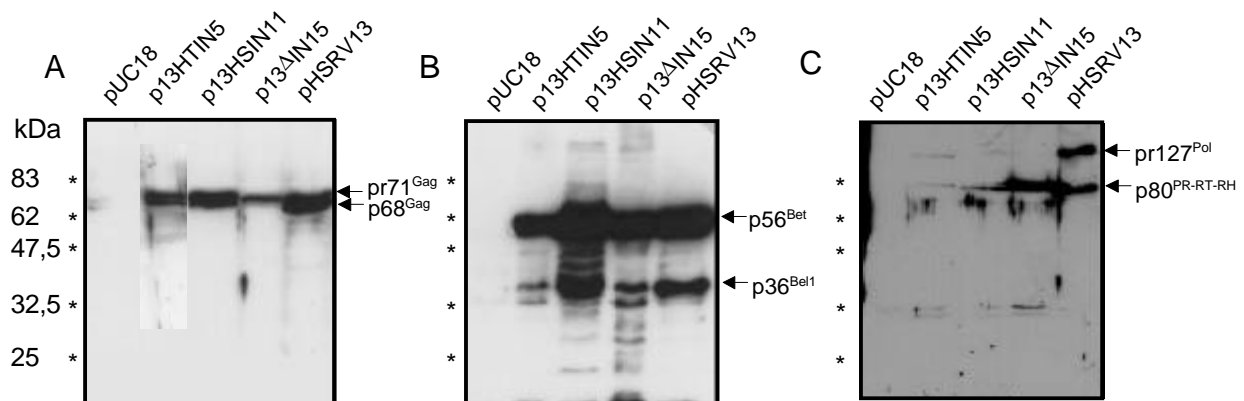


Abb.4:

Analyse der viralen Proteine von **p13HTIN5**, **p13HSIN11** und **p13ΔIN15** in BHK-Zellen zwei Tage nach der Transfektion. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HSRV-Matrix-Serum **A**, mit Anti-HSRV-Bel1/Bet-Serum **B**, und einem Anti-HSRV-Protease-Serum **C**. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten.

### Transfektion in 293T-Zellen:

293T-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) proliferieren etwas langsamer als BHK-Zellen und können mit einer Effizienz von bis zu 60% transfiziert werden. Sie lassen sich jedoch schwer infizieren und zeigen dann keine Syncytien. Der Virustiter ist geringer als bei BHK-Zellen, virale Genexpression findet jedoch statt.

293T-Zellen wurden nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode mit 10 µg DNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mittels Westernblot und anschließender ECL-Detektion untersucht. Zellysate aus **pUC18**- und **pHSRV13**-transfizierten Zellen dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

Die akzessorischen Proteine Bel1 und Bet wurden von allen drei Klonen (**p13ΔIN15**, **p13HSIN11**, **p13HTIN5**) auch in 293T-Zellen gut exprimiert (Abb.5, B). Die beiden

Gag-Banden (pr71 und p68) ließen sich nur bei Klon **p13HSIN11** nachweisen. Sowohl **p13ΔIN15** als auch **p13HTIN5** zeigten nur die unprozessierte pr71-Gag-Bande. Bei **p13HTIN5** war diese sogar nur schwach angedeutet (Abb. 5, A).

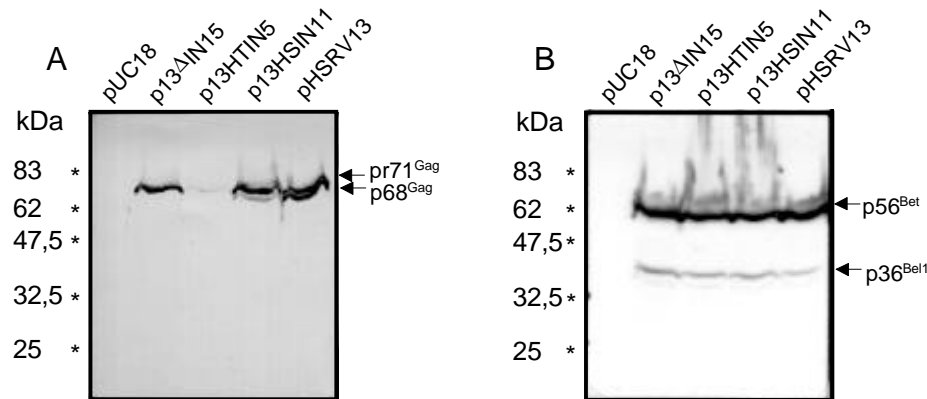


Abb.5:

Analyse der viralen Proteine von **p13HTIN5**, **p13HSIN11** und **p13ΔIN15** in 293T-Zellen zwei Tage nach der Transfektion. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HSRV-Matrix-Serum **A**, mit Anti-HSRV-Bel1/Bet-Serum **B**. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten.

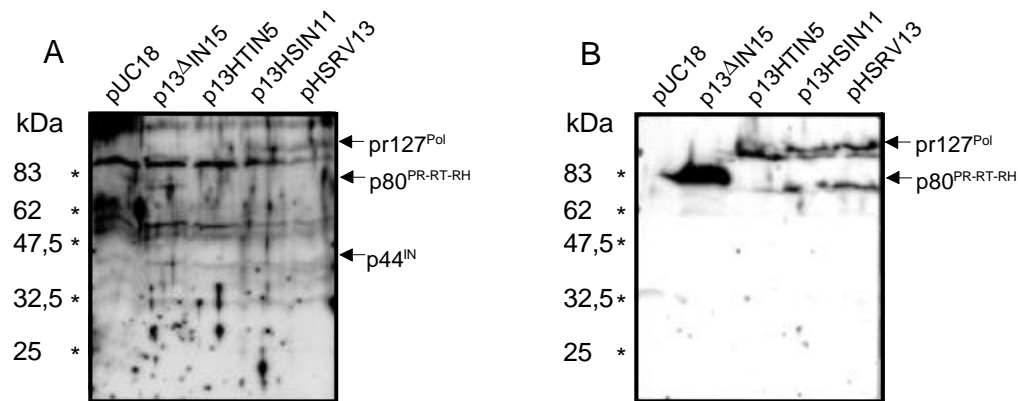


Abb.6:

Analyse der viralen Proteine von **p13HTIN5**, **p13HSIN11** und **p13ΔIN15** in 293T-Zellen zwei Tage nach der Transfektion. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HSRV-IN-Serum **A**, und mit einem Anti-HSRV-Prot.-Serum **B**. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten.

Das 127 kDa Pol-Vorläuferprotein war bei Klon **p13HSIN11** gut detektierbar, auch bei Klon **p13HTIN5** war es, leicht nach unten versetzt, zu erkennen. Dieser Effekt kam zustande, weil die HTLV-1-Integrase ca. 10 kDa kleiner ist als die HSRV-Integrase. Der Klon ohne Integrase (**p13ΔIN15**) zeigte ein um die 44 kDa der HSRV-Integrase verkürztes Pol-Protein. Die Stärke der Bande war ein Indiz dafür, daß es sich auch

hier um eine Doppelbande handelt, die durch den mit *env* überlappenden Teil der Integrase zu erklären war. Bei **p13HSIN11** und **p13HTIN5** erkannte man analog zu BHK-Zellen die prozessierte Pol-Bande, von welcher die Integrase abgespalten wurde (Abb. 6, B). Die HSRV-Integrase ließ sich bei **p13HSIN11** schwach detektieren (Abb. 6, A). Die Detektion von Pol (PR-RT-RH) mit dem Anti-HSRV-Integrase-Serum bei Klon bei **p13ΔIN15** kam ebenfalls nur durch den kurzen Env-überschneidenden Teil der Integrase zustande.

Die Expression aller viraler Proteine wurde über die Zeit schwächer und nach ca. einer Woche waren keine viralen Proteine im Zellysat von BHK- oder 293T-Zellen nachweisbar. Dieser Befund deutet darauf hin, daß keine Integration und/oder Bildung infektiöser Viruspartikel stattgefunden hat. Während das transfizierte Plasmid über mehrere Zellpassagen verloren ging, hörte die Produktion viraler Proteine ebenfalls auf. Der virale Klon **pHSRV13** dagegen kann immer wieder neue Zellen infizieren, wodurch das Virus sich vermehrt, bis alle Zellen infiziert sind.

### 3.1.2. Infektiösitätstest der Plasmide **p13ΔIN5**, **p13HTIN15** und **p13HSIN11** mittels FAB-Zell-Assay

Dieser Titrationsassay ist der einzige bestehende Nachweis für infektiöse Viruspartikel in HSRV.

Um den Virustiter in HSRV-haltigen Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurden FAB-Zellen verwendet. FAB-Zellen sind genetisch so verändert, daß sie das  $\beta$ -Galaktosidasegen unter der transkriptionellen Kontrolle des HSRV-LTR-Promotors stabil ins Genom integriert tragen. Die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase wird nach einer Infektion dieser Zelle durch den viruseigenen Transaktivator Bel1 stimuliert. Nach Fixation der Zellen und Zugabe von Galactopyranosid (X-Gal) entsteht eine Blaufärbung der Zellkerne, wenn Bel1 durch Infektion der Zelle mit HSRV vorhanden ist. Dadurch kann die Anzahl infektiöser Viruspartikel im Zellkultur-Überstand gemessen werden.

Zunächst wurden BHK-Zellen und 293T-Zellen mit den Plasmiden **p13ΔIN5**, **p13HTIN15**, **p13HSIN11** sowie als Positivkontrolle mit Klon **pHSRV13** und als Negativkontrolle mit dem Vektor **pUC18** transfiziert. Nach 48 h wurde jeweils 1 ml der Zellkultur-Überstände (ZKÜ) auf FAB-Zellen gegeben und damit eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten angelegt. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert



und mit X-Gal behandelt, nach 1 h bei 37°C wurden sie dann anhand der blau gewordenen Zellen ausgewertet (siehe 2.2.5.5.). Jede gefärbte Zelle kann theoretisch mit mindestens einem infektiösen Viruspartikel gleichgesetzt werden. Dadurch wurde die Menge freigesetzter infektiöser Viruspartikel pro ml Zellkulturüberstand (IU/ml) bestimmt, die im  $\beta$ -Galaktosidase-Test als „blue focus forming unit per milliliter“ (BFFU/ml) ausgedrückt wird. Mit **pUC18** transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle, da sie keine Viruspartikel bilden. Positivkontrolle waren mit **pHSRV13** transfizierte Zellen, der Virustiter liegt zwischen  $10^4$  und  $10^5$  auf BHK-Zellen, und ca.  $10^3$  infektiöse Partikel auf 293T-Zellen pro ml Medium 48 h nach der Transfektion.

Der Kontrollklon **p13HSIN11** wies auf BHK-Zellen noch ungefähr 10% des Wildtyp-Virustiters auf, in 293T-Zellen ging die Infektiösität fast auf null zurück (Tab. 1). Die beiden Klone **p13 $\Delta$ IN15** und **p13HTIN5** konnten in 293T-Zellen keine infektiösen Partikel bilden, in BHK-Zellen zeigte zumindest der provirale Klon ohne Integrase (**p13 $\Delta$ IN15**) noch eine geringe Restinfektiösität von 10 BFFU/ml. Viruspartikel wurden also gebildet. Möglicherweise war aber ohne Integration die Bel1 Expression in den HFAB-Zellen stark eingeschränkt. Der Klon **p13HTIN5** war auch auf BHK-Zellen nicht infektiös. Die Titrationsergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Syncytienbildung wurde bei BHK.Zellen nach der Transfektion mit Klon **p13HSIN11** beobachtet, Klon **p13HTIN5** dagegen zeigte fast keine Syncytien.

	BFFU/ml	
	BHK-Zellen	293T-Zellen
<b>p13<math>\Delta</math>IN15</b>	10	0
<b>p13HTIN5</b>	0	0
<b>p13HSIN11</b>	$1 \times 10^3$	2

Tabelle 1:

Titer der infektiösen Partikel pro ml Zellkulturüberstand 48 h nach der Transfektion von **p13 $\Delta$ IN15**, **p13HTIN5** oder **p13HSIN11** DNA in BHK- und 293T- Zellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Austausch der Integrase von HSRV gegen die Integrase von HTLV-1 keine Steigerung der Integration zur Folge hatte. Es war ein Rückgang der Infektiösität auf null, bei **p13HTIN5** zu beobachten, während das Plasmid ohne Integrase **p13 $\Delta$ IN15** noch eine geringe Restinfektiosität aufwies.

Auch der Kontrollklon **p13HSIN11** war in seiner Replikationsfähigkeit stark eingeschränkt.

### 3.2. Reklonierung der ersten 15 Nukleotide der U3 und U5 Sequenzen des HTLV-1-Genoms in das chimäre p13HTIN5 Provirus

Jede Integrase erkennt spezifische Sequenzen an den Enden der LTR des jeweiligen Virus (Kahn et al. 1990, LaFemina et al. 1991, Balakrishnan and Johnsson 1997, Esposito und Craigie 1998, McCord et al. 1999). Es besteht daher die Möglichkeit, daß die HTLV-1-Integrase die HSRV-LTR-Enden für die Integration nicht als Substrat nutzen kann. Dieser Umstand könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum **p13HTIN5** wahrscheinlich nicht integriert und auch keine infektiösen Viruspartikel bildete. Daher wurden bei den Klonen **p13HTIN5**, als auch zur Kontrolle bei **pHSRV13**-DNA jeweils die ersten 15 Nukleotide am 5´ und am 3´ Ende beider HSRV-LTR durch die entsprechende Sequenz von HTLV-1 ersetzt. Zu diesem Zweck wurden zwei Fusions-PCR´s durchgeführt wobei an der Fusionsstelle die 15 HTLV-1-Nukleotide am 3´-Ende der 5´-LTR eingeführt wurden (Abb. 7).

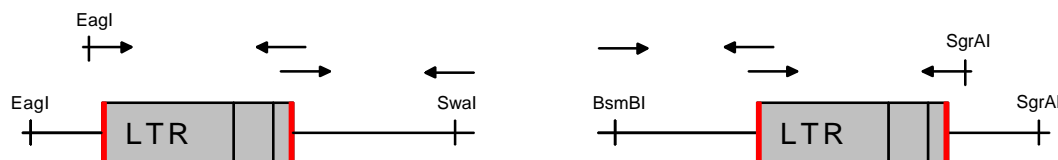


Abb.7:

Schematische Darstellung der Fusions-PCR zum Austausch der ersten 15 Nukleotide in die Sequenz des HTLV-1 am 5´ und am 3´ Ende der LTR. Primer sind als Pfeile dargestellt. Die Anteile von HTLV-1 sind rot markiert.

Die Veränderung am 5´-Ende der beiden LTR erfolgte jeweils durch einen der äußeren Primer, welche gleichzeitig eine Restriktionsschnittstelle für EagI bzw. für SgrAI enthielten (Abb. 7).

Zur Veränderung der 5´-LTR wurden also zwei PCR-Fragmente fusioniert. Das erste Fragment entstand mit den Primern *MEagIS* und *LTRU5A* das zweite mit den Primern *LTRU5S* und *SwaIA*. In einer weiteren Ligations-PCR wurden die Fragmente

fusioniert und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EagI* und *SwaI* in den Vektor **pHSRV13** und in das chimäre Konstrukt **p13HTIN5** einkloniert.

Die Veränderung der 3' LTR erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Auch hier wurden zwei PCR Fragmente fusioniert. Die beiden Fragmente wurden mit den Primern *BsmBIS* und *LTRU3HTA* sowie *SwaISII* und *SgrAISlang* amplifiziert. Das Fusionsprodukt wurde an den Restriktionsschnittstellen *BsmBI* und *SgrAI* ebenfalls in **pHSRV13** und in das Konstrukt **p13HTIN5** einkloniert. Die erhaltenen Plasmide besitzen die LTR-Enden von HTLV-1, **p13HTU3U5**, bzw. die LTR-Enden und die Integrase von HTLV-1 **pHTINHTU3U5**.

Die Klone wurden durch DNA-Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode in ihrer Sequenz bestätigt.

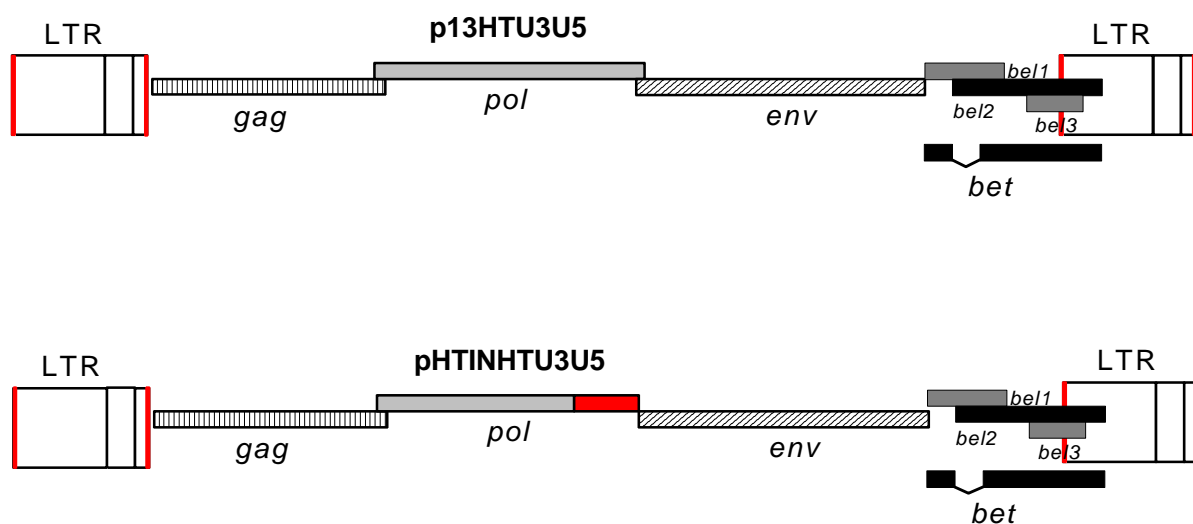


Abb.8:  
Genomkarte der Plasmide **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5**. Die Anteile von HTLV-1 sind rot dargestellt.

### 3.2.1. Nachweis viraler Proteine in transfizierten eukaryotischen Zellen

Transfektion in BHK-Zellen:

Die Transfektion der Plasmide **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** in BHK-Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Die Zellen wurden 24 oder 48 h nach der Transfektion geerntet und im Westernblot mit anschließender ECL-Detektion analysiert. Die Plasmide **pUC18** und **pHSRV13** dienen wieder als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

Auch in dem HTLV-1-Integrase-Klon **pHTINHTU3U5** war die HTLV-1-Integrase nachweisbar (Abb. 9), allerdings nur in BHK-Zellen und auch nur 24 h nach der

Transfektion. Während die HTLV-1-Integrase 48 h nach der Transfektion nicht mehr nachzuweisen war, war das Pol-Vorläuferprotein sowie die Prozessierungsprodukte ohne Integrase (80 kDa) bzw. ohne Integrase und ohne RNaseH (66 kDa) gut detektierbar (Abb.10, C).

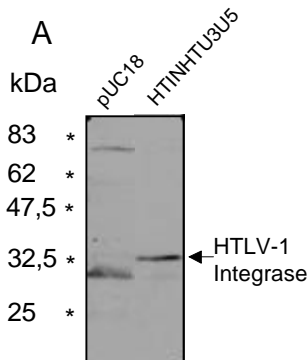


Abb.9:  
Nachweis der HTLV-1 Integrase in mit **pHTINHTU3U5** transfizierten BHK-Zellen, einen Tag nach der Transfektion. Die Detektion erfolgte mit Anti-HTLV-1 Integrase Antiserum. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben.

Das Pol-Vorläuferprotein von **pHTINHTU3U5** lief wieder um die 10 kDa der kürzeren HTLV-1-Integrase erwartungsgemäß schneller. Abbildung 10 A zeigt die, bei den Klonen **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** gut sichtbare Gag-Proteindoppelbande (pr71 und p68). Auch die akzessorischen Proteine Bel1 und Bet waren im Westernblot deutlich nachweisbar (Abb. 10, B).

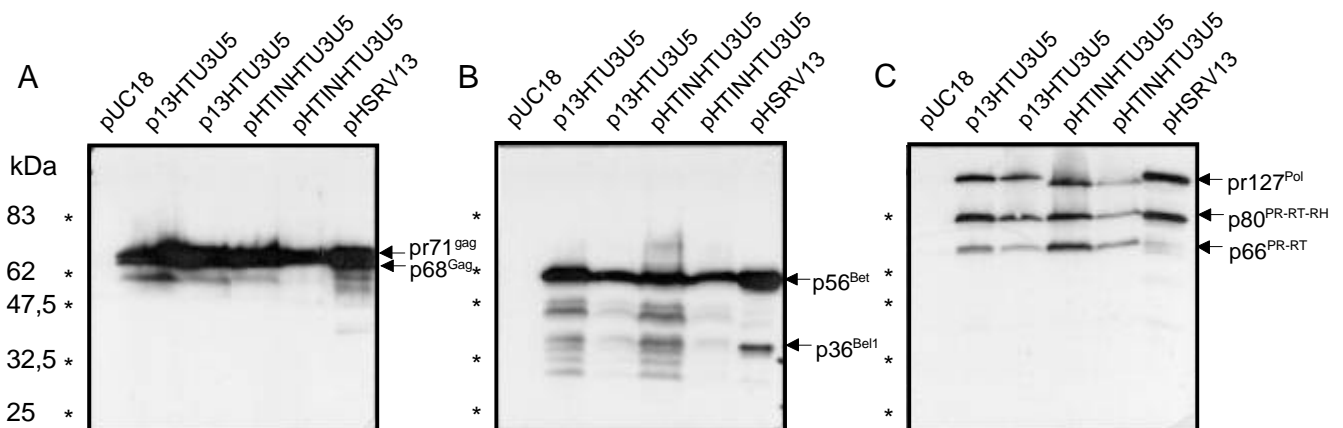


Abb.10:  
Analyse der viralen Proteine von **p13HTU3U5**, und **pHTINHTU3U5** in BHK-Zellen zwei Tage nach der Transfektion (jeweils doppelt aufgetragen). Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HSRV-Matrix-Serum **A**, mit Anti-HSRV-Bel1/Bet-Serum **B**, und einem Anti-HSRV-Protease-Serum **C**. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten.

Die Env-Proteine ließen sich nur in der Radioimmunpräzipitation darstellen. Für den Einsatz im Westernblot waren die unspezifischen Bindungen des Env (SU)-

Antiserums zu stark. Abbildung 11 zeigt eine Transfektion mit den Plasmiden **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** sowie eine Kotransfektion beider Plasmide. Durch die Kotransfektion sollte ein möglicher transkomplementierender Effekt der beiden Plasmide getestet werden. Da sich im Bereich der HSRV-Integrase RNA-Verpackungssignale befinden (Erlwein et al. 1998), welche in der HTLV-1-Integrase fehlen, wäre ein solcher Effekt nicht auszuschließen. Da beide Plasmide die HTLV-LTR-Enden besitzen, war nicht zu erwarten, daß sie durch die HSRV-Integrase ins Wirtsgenom integriert werden können.

In der Radioimmunpräzipitation erkennt man klar das Env/Bet-Fusionsprotein (Giron et al. 1998), das Env-Vorläuferprotein und Bet.

Obwohl die Hauptfällung mit einem Anti-HSRV-Env (SU)-Serum durchgeführt wurde, wurde das Bet-Protein aus unbekanntem Gründen ebenfalls detektiert. Möglicherweise kam die Detektion von Bet durch Komplexbildung mit Env zustande. Durch eine zweite Fällung mit dem Anti-Bet-Serum, bei welcher Bet auf der gleichen Höhe lief konnte das Bet-Protein sicher identifiziert werden (hier nicht dargestellt).

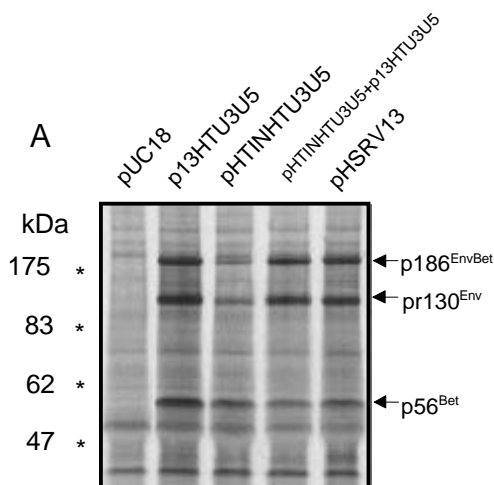


Abb.11:

Die Abbildung zeigt eine Radioimmunpräzipitation mit Proteinextrakten aus BHK-Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion mit den Plasmiden **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5**, geerntet. Die Hauptfällung erfolgte mit einem Anti-HSRV-Env (SU)-Serum, die Vorfällung mit dem zugehörigen Präimmenserum.

### Transfektion in 293T-Zellen:

Zur weiteren Analyse der Plasmide **pHTINHTU3U5** und **p13HTU3U5** wurden 293T-Zellen mit 10 µg DNA nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und im Westernblot mit anschließender ECL-Detektion untersucht.

In 293T-Zellen war im Gegensatz zu BHK-Zellen das Gag-Protein von Klon **pHTINHTU3U5** nur als unprozessierte Bande (pr71) zu detektieren, die prozessierte Form trat nicht auf. Bei Klon **p13HTU3U5** waren dagegen beide Banden zu erkennen

(Abb. 12, A). Das Bet-Protein wurde in 293T-Zellen sehr stark exprimiert, Bel1 dagegen nur schwach (Abb. 12, B). Die Pol-Proteine waren als Pol-Vorläuferprotein und als prozessiertes Pol-Protein mit fehlender Integrase (Abbildung 12, C) nachzuweisen.

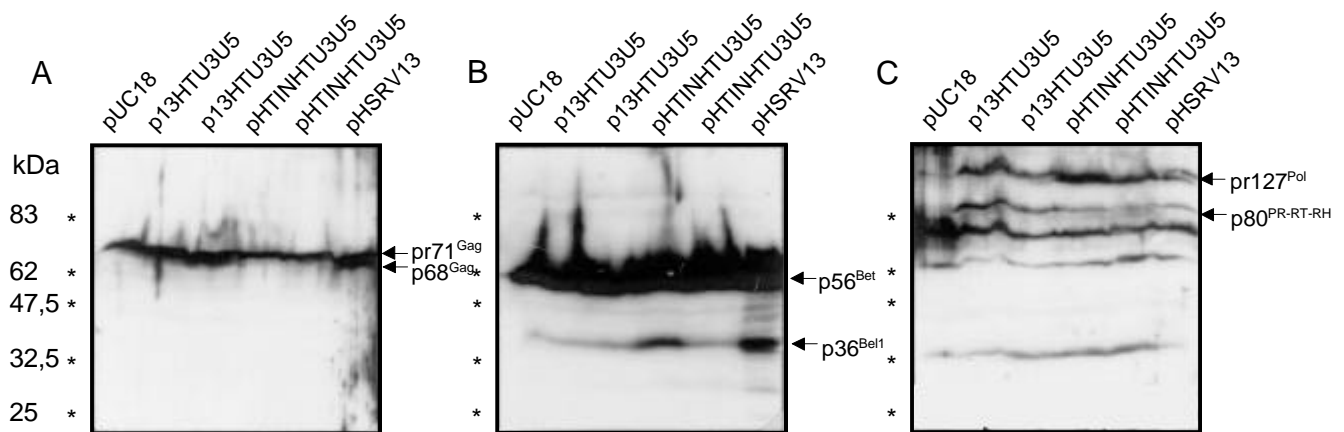


Abb.12:

Diese Abbildung zeigt eine Analyse der viralen Proteine von **p13HTU3U5**, und **pHTINHTU3U5** in 293T-Zellen zwei Tage nach der Transfektion (jeweils doppelt aufgetragen). Die Detektion erfolgte mit einem Anti-BSMV-Matrix-Serum **A**, mit Anti-BSMV-Bel1/Bet-Serum **B**, und einem Anti-BSMV-Protease-Serum **C**. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten.

### 3.2.2. Infektiösitätstest der Plasmide **pHTINHTU3U5** und **p13HTU3U5** mittels FAB-Zell Assay

Der FAB-Zell Titrationsassay wurde genutzt um die Infektiösität der Mutanten zu bestimmen.

Die beiden Klone **pHTINHTU3U5** und **p13HTU3U5** waren nicht oder nur minimal infektiös, wie die Titerangaben in Tabelle 2 zeigen. Ein bis zwei BFFU/ml sind so gering, daß sie keinen Beweis für Infektiösität darstellen können. Ein Unterschied zwischen BHK- und 293T-Zellen war nicht zu erkennen. In beiden Zelltypen wurden keine infektiöser Viruspartikel produziert.

Auch die Kotransfektion beider Plasmide führte nicht zur Bildung von infektiösen Viruspartikeln, eine Transkomplementation der beiden Plasmide **pHTINHTU3U5** und **p13HTU3U5** fand demnach nicht statt.

Schwache Syncytienbildung war mit beiden viralen Konstrukten in BHK-Zellen zu erkennen, was auf die Expression von Env schließen läßt.

	BFFU/ml	
	BHK-Zellen	293T-Zellen
<b>pHTINHTU3U5</b>	1	2
<b>p13HTU3U5</b>	2	2
<b>pHTINHTU3U5/ p13HTU3U5</b>	2	2

Tabelle 2:

Titer der infektiösen Partikel pro ml Zellkulturüberstand 48 h nach der Transfektion mit den Plasmiden **pHTINHTU3U5** und **p13HTU3U5** in BHK- und 293T-Zellen.

Man kann an diesen Ergebnissen erkennen, daß auch die Reklonierung der LTR-Enden der proviralen Klone in die Sequenz von HTLV-1 die Infektiösität nicht wieder herstellen bzw. steigern konnte. Die Replikations- und Integrationsunfähigkeit der Klone mußte daher andere Ursachen haben.

### 3.2.3. Aktivitätstest der reversen Transkriptase in den Klonen **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5**

Mit Hilfe des C-type-RT Aktivitäts Assays ließ sich die Aktivität der reversen Transkriptase (RT) in retroviral infizierten Zellen messen (siehe 2.2.5.6.). Dabei wurden die gemessenen Werte nicht absolut, sondern nur in Relation zu einer Positiv- bzw. Negativkontrolle betrachtet. Zwei Tage nach der Transfektion mit den proviralen Klonen wurden Zellkultur-Überstand (ZKÜ), Zellysat (ZS) und gereinigte Viruspartikel (VP) auf reverse Transkriptaseaktivität untersucht. Jeweils 10 µl des geklärten ZKÜ wurden direkt in die RT-Assays eingesetzt. Für das ZS wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm Ø Kulturschale in 1 ml Puffer geerntet und 10 µl davon untersucht. Viruspartikel wurden aus 30 ml ZKÜ extrahiert und in 20 µl Puffer aufgenommen. Getestet wurden die Plasmide **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** sowie **pUC18** als Negativkontrolle und **pHSRV13** als Positivkontrolle. Der Assay wurde mit BHK- und 293T-Zellen durchgeführt. Die RT-Reaktion wurde nach 120 min gestoppt (Abb. 13).

In Zellysat war der Meßwert auch bei **pUC18** nicht null, da endogene Retroviren in der Zelle vorhanden sind und geringfügig RT exprimieren.

Die RT-Aktivität der transfizierten proviralen Klone war in 293T-Zellen sehr gering, Positiv- und Negativkontrolle unterschieden sich kaum voneinander (Abb. 13). Das Wildtypvirus (wt) replizierte hier nur schlecht, nur wenige Zellen wurden neu infiziert. Nur in ZS hatte **pHTINHTU3U5** eine doppelt so hohe RT Aktivität wie **pHSRV13**, der ZS-Wert für **p13HTU3U5** lag sogar um das Vierfache höher. Für Viruspartikel und

Kultur-Überstand waren die Meßwerte für die beiden Viruskonstrukte nicht höher als die der Negativkontrolle.

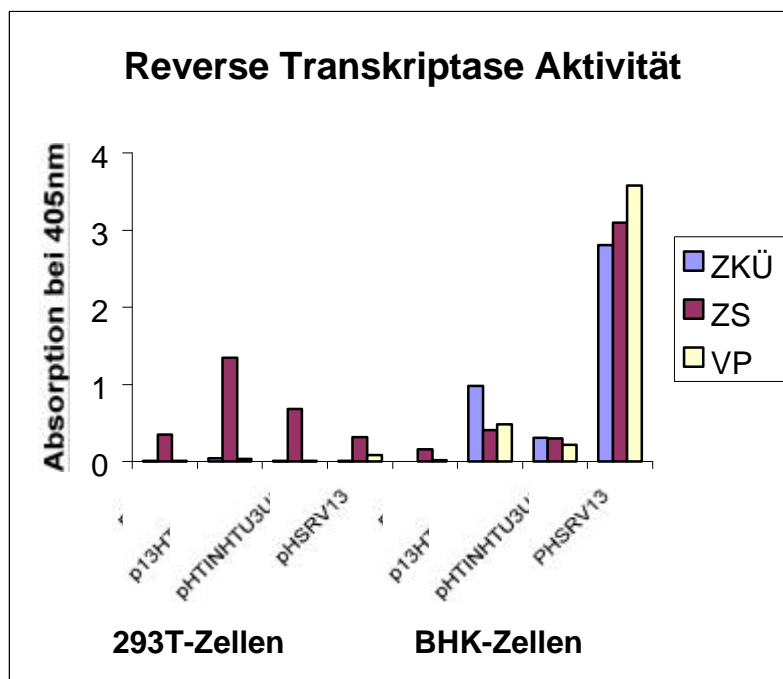


Abb.13: Die grafische Darstellung zeigt die reverse Transkriptase-Aktivität im Zellkultur Überstand (ZKÜ), Zellysat (ZS) und in Viruspartikeln (VP) in transfizierten BHK- und 293T-Zellen. Die RT-Reaktion wurde nach 120min gestoppt.

In BHK-Zellen ließ sich eine stärkere RT-Aktivität messen. Während die Werte für **pUC18** um 0 bis 0,2 lagen, lag die Positivkontrolle bei Werten um 3. Die RT Aktivität der beiden Klone war um ein Vielfaches geringer als die der Positivkontrolle (Abb. 13). Außerdem war auffällig, wie hoch die Meßwerte für den ZKÜ waren, obwohl nur ein Bruchteil des Gesamtüberstandes eingesetzt wurde. In der Partikelfraktion der Klone **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** wurde eine reverse Transkriptaseaktivität gemessen, die deutlich über der der Negativkontrolle lag. Obwohl die Werte nur ein Siebtel bzw. ein Sechzehntel des Wildtyps betragen waren sie ein Indiz dafür, daß die Klone **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** in BHK-Zellen Viruspartikel bildeten. Diese Viruspartikel waren allerdings wie die HFAB-Titration gezeigt hat, nicht infektiös.

Um eine Kinetik für die Aktivität der reversen Transkriptase zu erstellen und um die gemessenen Werte besser zueinander in Relation setzen zu können, wurde die RT-Reaktion nach unterschiedlichen Zeitpunkten (30, 60, 120 min und 16 h) abgestoppt.



Getestet wurden Zellysat und Viruspartikel von, mit **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** transfizierten BHK- und 293T-Zellen. Die Extraktion von ZS und VP erfolgte wie oben. Nach 30, 60, 120 min und ca. 16 h wurde die Menge an von RT umgesetztem Substrat gemessen (Tabelle 4, Abb. 14, 15). Dabei zeigte sich, daß nach 60 bis 120 min die höchste RT-Aktivität gemessen werden konnte. Nach 16 h waren die Reaktionsprodukte offenbar teilweise schon wieder abgebaut. In BHK-Zellysat war das Verhältnis der beiden Klone **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** zueinander mit fortlaufender Zeit gleich. Die Werte lagen nur geringfügig über dem der Negativkontrolle. Die Wildtyp (wt) RT-Aktivität war ca. 10x höher als die der Klone **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** und erreichte schon nach 30 min eine Sättigung. Mit längerer Reaktionszeit steigerte sich die Produktmenge nicht mehr.

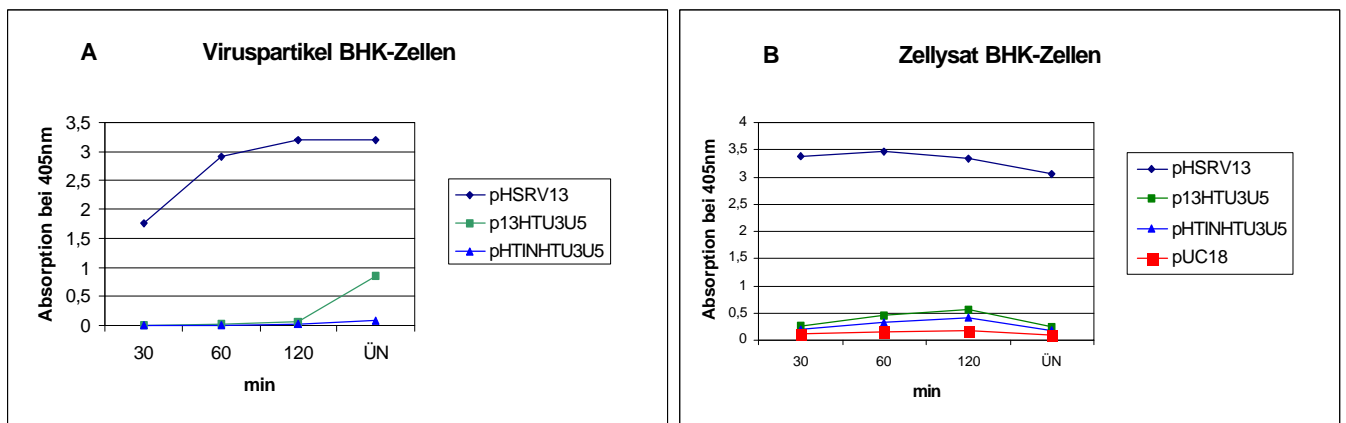


Abb.14:

Die grafische Darstellung zeigt die reverse Transkriptase-Aktivität in transfizierten BHK-Zellen über die Zeit, in Viruspartikeln (A) und Zellysat (B).

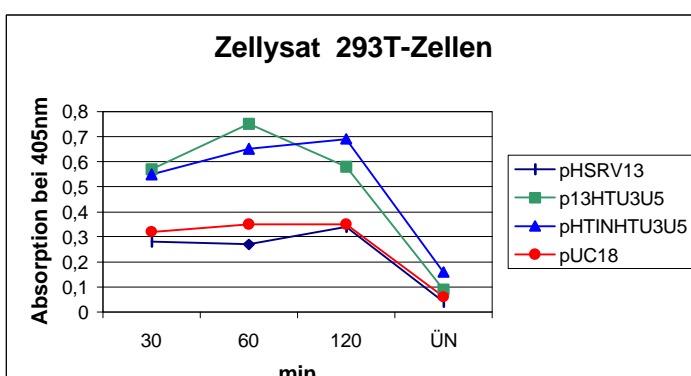


Abb.15:

Die grafische Darstellung zeigt die reverse Transkriptase-Aktivität in transfizierten 293T-Zellen über die Zeit.

Die RT-Aktivität der Viruspartikel erreichte beim wt erst nach 120 min Reaktionszeit ein Maximum. Fast keine RT-Aktivität zeigte die Analyse der Klone **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5**.

In dem Zellysat transfizierter 293T-Zellen ließ sich beim Vergleich mit der Negativkontrolle für wt keine erhöhte RT-Aktivität nachweisen. Auch die beiden Klone **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** lagen nur wenig über den Meßwerten der Negativkontrolle **pUC18**.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die proviralen Klone auf BHK-Zellen besser replizieren können als auf 293T-Zellen, wenn man annimmt, daß die RT-Aktivität mit der Vermehrung des Virus korreliert. Die beiden Plasmide **p13HTU3U5** und **pHTINHTU3U5** bilden, wenn auch in geringerer Menge als wt, Viruspartikel. Ob diese Viruspartikel komplett ausgestattet sind, und ob sie infektiös sind, wurde durch den RT-Assay nicht nachgewiesen.

### 3.3. Klonierung einer HTLV-1- und HSRV-chimären Integrase in **p13 $\Delta$ IN15** und **pHTINHTU3U5**

Da die bisherigen Mutanten offensichtlich eine nicht funktionelle Integrase enthielten, wurde eine definierte C-terminale Sequenz der HTLV-1-Integrase durch die entsprechende Sequenz der HSRV-Integrase ausgetauscht, denn wichtige, für die Replikation und Bildung von intakten Viruspartikeln notwendige Sequenzen liegen am C-Terminus der HSRV-Integrase. Hier ist z.B. eine wichtige RNA-Verpackungssequenz lokalisiert. Dieser Teil der HSRV-Integrase sollte teilweise in der chimären Integrase erhalten bleiben.

Bei der Klonierung der chimären Integrase wurde der N-terminale Teil der HTLV-1-Integrase, welcher das konservierte HH-CC Zink-Finger-Motiv, und das konservierte katalytische Zentrum (D,D(35)E Motiv) umfasst, mit dem unspezifisch DNA bindenden C-terminalen Bereich der HSRV-Integrase fusioniert. Dieses Fusionsprotein wurde dann in den integraselosen Klon **p13 $\Delta$ IN15** und in **p13HTINHTU3U5** an die Stelle der vorher einklonierten HTLV-1-Integrase inseriert. Dies erfolgte mit Hilfe einer Fusions-PCR. Hierfür wurden zunächst die beiden Teile der jeweiligen Integrase einzeln amplifiziert, wobei eine 20 Nukleotide umfassende

Homologie an der Fusionsstelle erzeugt wurde. Für den Teil der HTLV-1-Integrase wurden die Primer *CHIMHT A* und *HTLV-1-5'* benutzt, für den Teil der HSRV-Integrase die Primer *BspEI anti* sowie *CHIMHS S*.

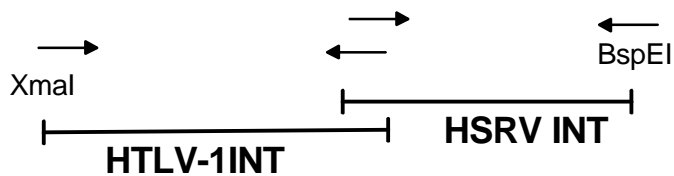


Abb.16:  
Schematische Darstellung der Fusions-PCR zur Klonierung der chimären Integrase. Die Primer sind als Pfeile dargestellt.

Die beiden Amplifikate dienten als Matrize für die anschließende Fusions-PCR mit den Primern *HTLV-1-5'* und *BspEI anti*. Die beiden Vektoren **p13 $\Delta$ IN15** und **pHTINHTU3U5** wurden mit den Restriktionsendonukleasen Xmal und BspEI aufgeschnitten. Das Produkt der Fusions-PCR, die chimäre Integrase, wurde ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten und in die Vektoren einkloniert (Abb. 16). Die entstandenen Plasmide **pcip13** (mit chimärer Integrase) und **pciHTU3U5** (mit chimärer Integrase und den HTLV-1-LTR-Enden) wurden mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung überprüft.

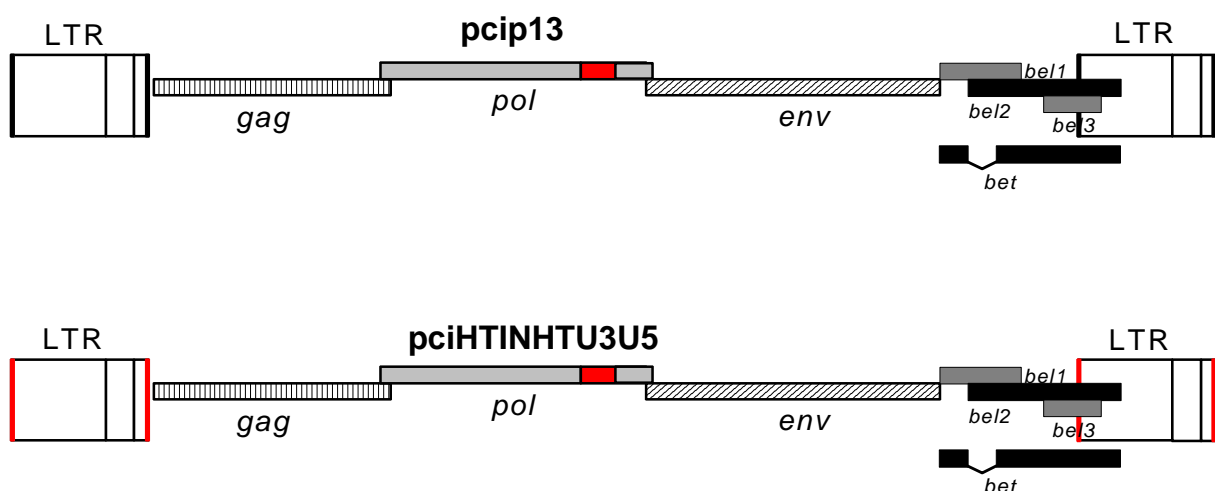


Abb.17:  
Genomkarten der Plasmide **pcip13** und **pciHTU3U5**. Die Anteile von HTLV-1 sind rot dargestellt.

### 3.3.1. Transfektion der chimären Integrase-Konstrukte in eukaryotische Zellen und Nachweis viraler Proteine

### Transfektion in BHK-Zellen:

Die Transfektion der Plasmide **pcip13** und **pciHTU3U5** erfolgte mittels Elektroporation mit 10 µg DNA. Die Zellen wurden 24 oder 48 h nach der Transfektion geerntet und im Westernblot mit anschließender ECL analysiert. Die Plasmide **pUC18** und **pHSRV13** dienten wieder als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

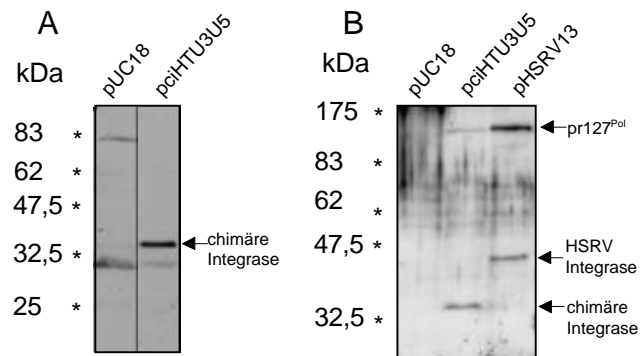


Abb.18: Nachweis der HTLV-1/HSRV chimären Integrase im Westernblot. Mit Proteinextrakten aus, mit **pciHTU3U5** transfizierten BHK-Zellen. **A:** Einen Tag nach der Transfektion, detektiert mit Anti-HTLV-1-Integrase-Serum. **B:** Zwei Tage nach der Transfektion, detektiert mit Anti-HSRV-Integrase-Serum. Der Marker ist am linken Bildrand dargestellt.

In **pciHTU3U5** transfizierten BHK-Zellen war die chimäre Integrase 48 h nach der Transfektion mit dem Antiserum gegen die HTLV-1-Integrase sowie dem HSRV-Integrase spezifischem Antiserum nachweisbar (Abb. 18, A, B). Die chimäre Integrase ist mit 38 kDa 6 kDa kleiner als die HSRV-Integrase.

Das 127 kDa Pol-Vorläuferprotein war bei den Klonen **pcip13** und **pciHTU3U5** gut nachweisbar. Da die mit diesen Klonen transfizierten Zellen schon 24 h nach der Transfektion geerntet wurden, war das prozessierte Pol-Protein (ohne Integrase) noch nicht vorhanden (Abb. 19, A).

Die akzessorischen Proteine Bet und Bel1 waren nach Transfektion mit **pcip13** und **pciHTU3U5** DNA gut detektierbar (Abb. 19, B). Die Transaktivierung durch Bel1 hat demnach stattgefunden. Das Gag-Protein wurde von beiden Klonen exprimiert und war wie in Abb. 19, C zu erkennen ist, auch prozessiert (pr71 und p68).

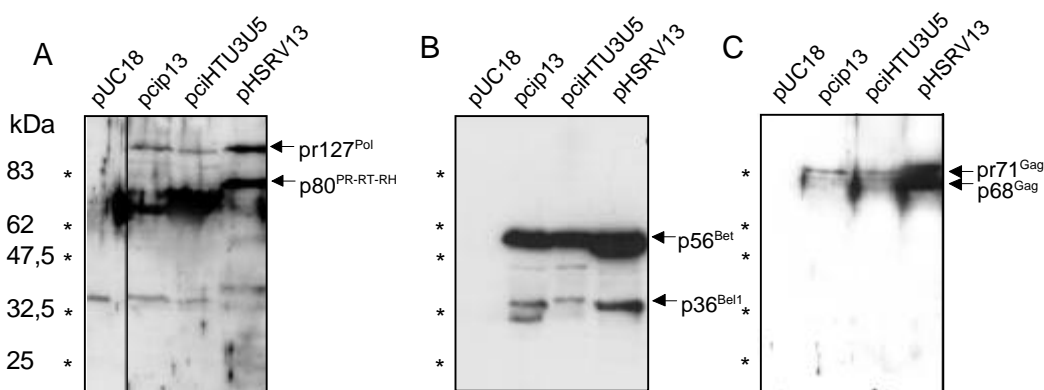


Abb.19:

Analyse der viralen Proteine von **pcip13** und **pciHTU3U5** in BHK-Zellen zwei Tage nach der Transfektion. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HSRV-Protease-Serum **A**, mit Anti-HSRV-Bel1/Bet-Serum **B**, und einem Anti-HSRV-Matrix-Serum **C**. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten.

### Transfektion in 293T-Zellen:

Auch die Klone **pcip13** und **pciHTU3U5** wurden in 293T-Zellen untersucht. Die 293T-Zellen wurden mit 10 µg DNA nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und im Westernblot mit anschließender ECL-Detektion untersucht.

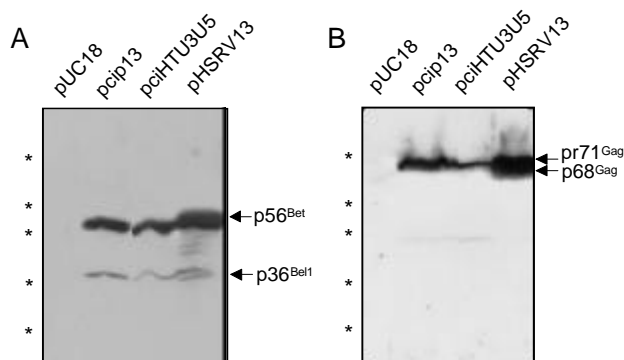


Abb.20:

Analyse der viralen Proteine von **pci13**, und **pciHTU3U5** in 293T-Zellen zwei Tage nach der Transfektion. Die Detektion erfolgte mit einem Anti HSRV-Bel1/Bet-Serum **A**, und einem Anti-HSRV-Matrix-Serum **B**. Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten.

Auch in 293T-Zellen wurden Bel1 und Bet korrekt exprimiert, was die Transaktivierung durch Bel1 sicherstellte (Abb. 20, B). Gag wurde von beiden Klonen (**pcip13** und **pciHTU3U5**) exprimiert, aber nicht prozessiert wie an der fehlenden p68 Bande zu sehen war (Abb. 20, C). Pol wurde nur sehr schwach und mit sehr viel Hintergrund detektiert (nicht dargestellt).

### 3.3.2. Infektiösitätstest der Klone pciHTU3U5 und pcip13 mittels

#### FAB-Zell Assay

Um die Infektiösität der viralen Partikel zu messen, wurden Titrationen der Zellkultur-Überstände durchgeführt (s. 2.2.5.5.). Zunächst wurden BHK- und 293T-Zellen mit den Plasmiden **pciHTU3U5** und **pcip13** sowie als Positivkontrolle mit **pHSRV13** und als Negativkontrolle mit **pUC18** transfiziert. Nach 48 h wurde jeweils 1 ml der Zellkultur-Überstände auf FAB-Zellen austitriert. Das Ergebnis dieser Titration zeigte, daß auch die beiden Klone mit der chimären Integrase **pciHTU3U5** und **pcip13** keine infektiösen Partikel bildeten (Tabelle 3). Die Anzahl der BFFU/ml waren so gering, daß man sie vernachlässigen konnte. Ein Unterschied zwischen BHK- und 293T-

Zellen war nicht zu erkennen. In beiden Zelltypen fand gleichermaßen keine oder eine vernachlässigbare Produktion infektiöser Viruspartikel statt.

	BFFU/ml	
	BHK-Zellen	293T-Zellen
<b>pciHTU3U5</b>	3	3
<b>pcip13</b>	3	2

Tabelle 3:

Titer der infektiösen Partikel pro ml Zellkulturüberstand 48 h nach der Transfektion mit **pcip13** und **pciHTU3U5** in BHK- und 293T- Zellen.

### 3.3.3. Nachweis viraler RNA in transfizierten BHK-Zellen

Um festzustellen, ob von den Klonen **pHTINHTU3U5**, **pcip13** und **pciHTU3U5** alle viralen Transkripte gebildet werden, wurden die Transkripte mittels Northern-Blot-Hybridisierung mit RNA aus transfizierten BHK-Zellen analysiert

BHK-Zellen wurden mit 10 µg Plasmid-DNA elektrotransfiziert. Nach 48h wurde die RNA geerntet und Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aufgereinigt. Je 1 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Hybond N+ Membran transferiert. Diese Membran wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die Präparation der Sonden erfolgte durch einen Restriktionsverdau von Klon **pHSRV13** mit dem Enzym NdeI. Die durch den NdeI-Verdau erhaltene Env-Sonde überspannte den Bereich von NT-Position 8037 bis 8809 im proviralen DNA-HSRV-Genom.

Abbildung 21 A zeigt die mit der Env Sonde detektierbaren Transkripte. Die Positivkontrolle **pHSRV13** läßt deutlich drei spezifische Signale erkennen, das Gag-, das Pol- und das Env-Transkript. Bei den drei chimären Klonen sind diese Banden nur schwach zu erkennen, wobei das Env-Transkript am deutlichsten zu sehen ist.

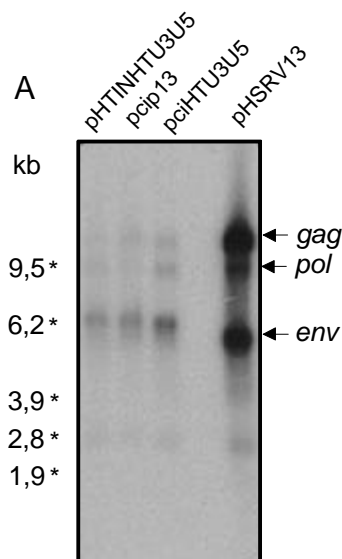


Abb.21:

Northern Blot-Hybridisierung mit RNA aus mit **pHTINHTU3U5**, **pcip13** und **pciHTU3U5** transfizierten BHK-Zellen. Die RNA wurde zwei Tage nach der Transfektion geerntet und Poly(A)<sup>+</sup> selektioniert. Der Blot wurde mit einer Sonde aus *env* hybridisiert. Der Größenmarker ist am linken Bildrand dargestellt, die Transkripte am rechten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß auch die Einklonierung einer chimären Integrase, die Integration nicht verbessert hat. Es erfolgte keine Veränderung des Virustiters. Beide Klone (**pcip13** und **pciHTU3U5**) waren nicht infektiös, obwohl Proteine exprimiert wurden und die Transkription der RNA, wenn auch deutlich schwächer als bei wt erfolgte.

### 3.4. Kotransfektion eines HTLV-1-Gag Expressionsklons mit den rekombinanten, viralen Plasmiden **pcip13**, **p13HTIN15**, **pHTINHTU3U5**, **pciHTU3U5**

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, daß definierte Gag-Proteine im Präintegrationskomplex einiger Retroviren enthalten sind (Gallay et al. 1995, Miller et al. 1997, Carteau et al. 1999). Die Gag-Proteine interagieren dort möglicherweise spezifisch mit der Integrase. Eine funktionelle HTLV-1-Integrase könnte HTLV-1-Gag als Interaktionspartner benötigen, wobei HSRV-Gag eventuell nicht kompatibel wäre. Um diesen Punkt als Möglichkeit für die Replikationsdefizienz der Klone auszuschließen, wurde ein HTLV-1-Gag Expressionsplasmid kloniert. Als Vektor diente hierzu **pBC12/CMV** (Cullen 1986). HTLV-1-Gag wurde mittels PCR amplifiziert, so daß mit Hilfe der Primer (*HTLV GAG S* und *HTLV GAG A2*) am 5'-Ende eine HindIII und am 3'-Ende eine BstEII Schnittstelle eingeführt wurden. Als Matrize diente das Plasmid **pCS-HTLV** (Derse et al. 1995). Der Vektor **pBC12/CMV** und die amplifizierte HTLV-1-Gag-DNA wurden mit den Enzymen HindIII und BstEII geschnitten und ligiert. Mittels Restriktionsverdau wurde die Sequenz des Klons überprüft. Das HTLV-1-Gag-Expressionsplasmid (**pHTGag**) wurde in unterschiedlichen Mengenverhältnissen mit den Plasmiden **pcip13**, **p13HTIN15**, **pHTINHTU3U5** und **pciHTU3U5** kotransfiziert.

#### 3.4.1. Nachweis von HTLV-1-Gag im Immunoblot

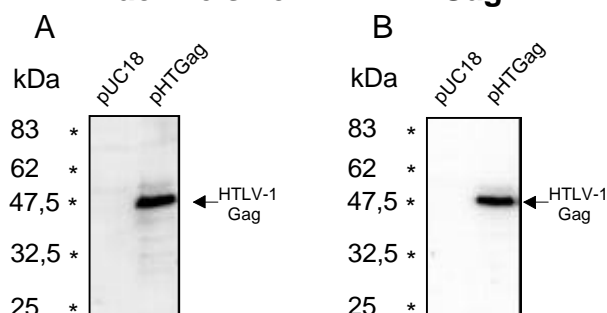


Abb.22:

Nachweis von HTLV-1-Gag in, mit **pHTGag** transfizierten BHK-Zellen (A) und 293T-Zellen (B). Das Antigen wurde zwei Tage nach der Transfektion geerntet. Die Detektion erfolgte mit einem Antiserum eines HTLV-1 infizierten Patienten (mit HTLV-1 assoziierter Myelopathie HAM).

Das HTLV-1-Gag-Expressionsplasmid **pHTGag** wurde zunächst in 293T- und in BHK-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und die Expression von HTLV-1-Gag im Westernblot mit anschließender ECL analysiert. Die Detektion von HTLV-1-Gag erfolgte mit einem Patientenserum von einem HTLV-1 infizierten Patienten mit HTLV-1 assoziierter Myelopathie HAM.

Das ca. 45 kDa große HTLV-1-Gag-Protein wurde in BHK- als auch in 293T-Zellen erfolgreich im Westernblot nachgewiesen (Abb. 22).

### 3.4.2. Infektiösitätstest der kotransfizierten Plasmide mittels FAB-Zell Assay

Die folgenden viralen Konstrukte wurden mit dem Plasmid **pHTGag** kotransfiziert: **p13HTIN5**, **pHTINHTU3U5**, **pcip13** und **pciHTU3U5**. Dazu wurden die Plasmid-DNAs in unterschiedlichen Mengenverhältnissen gemischt und BHK- bzw. 293T-Zellen damit transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen, geklärt und auf FAB-Zellen titriert. Die Analyse der Überstände ergab bei keinem der proviralen Klone eine signifikante Erhöhung der Infektiösität (Tabellen 4 und 5). Die ermittelten BFFU/ml lagen zwischen Null und Fünf. Unterschiede zwischen BHK- und 293T-Zellen waren dabei nicht festzustellen.

#### BHK-Zellen

<b>µg DNA</b>	<b>0+10</b>	<b>0,5+9,5</b>	<b>1+9</b>	<b>2+8</b>	<b>5+5</b>
<b>pHTGag + pciHTU3U5</b>	1	4	3	2	4
<b>pHTGag + pHTINHTU3U5</b>	0	0	4	2	1
<b>pHTGag + pcip13</b>	3	4	2	2	5
<b>pHTGag + p13HTIN5</b>	3	3	1	3	2

Tabelle 4: Titer der infektiösen Partikel pro ml Zellkulturüberstand 48h nach der Kotransfektion von **pHTGag** und den unterschiedlichen proviralen Klonen in BHK-Zellen. Die Zahlen in der ersten Zeile der Tabelle geben die Mengen der transfizierten DNA in µg an.

#### 293T-Zellen

<b>µg DNA</b>	<b>0+10</b>	<b>0,5+9,5</b>	<b>1+9</b>	<b>2+8</b>	<b>5+5</b>
<b>pHTGag + pciHTU3U5</b>	17	23	4	2	3
<b>pHTGag + pHTINHTU3U5</b>	2	2	1	0	0
<b>pHTGag + pcip13</b>	2	7	0	4	0
<b>pHTGag + p13HTIN5</b>	2	0	0	0	0

Tabelle 5: Titer der infektiösen Partikel pro ml Zellkulturüberstand 48h nach der Kotransfektion von **pHTGag** und den unterschiedlichen proviralen Klonen in 293T-Zellen. Die Zahlen in der ersten Zeile der Tabelle geben die Mengen der transfizierten DNA in µg an.



### 3.5. Klonierung eines Zeocinresistenzgens in pHSRV13 und in die Konstrukte pHTINHTU3U5 und pciHTU3U5

Durch die Insertion des Zeocin-Resistenzgens in die viralen Konstrukte sollten gezielt Zellen selektioniert werden, bei welchen provirale DNA ins Wirtsgenom integriert hat. Die Selektion würde die Identifikation und Analyse von Integrationsereignissen, z.B. im Southern Blot, sehr vereinfachen. Durch Einzelzelleselektion kann außerdem die Anzahl der in eine Zelle integrierten proviralen Genome detektiert werden.

Zeocin gehört zur Bleomycin/Phleomycin Familie der Antibiotika. Zeocin ist für Bakterien und eukaryotische Zellen gleichermaßen toxisch. Daher benötigt ein Vektor nur dieses Resistenzgen, um in pro- und eukaryotischen Zellen einen Selektionsvorteil zu vermitteln. Die einklonierte Zeocin Kasette besteht aus den Promotoren EM7 (prokaryotisch) und SV40 (eukaryotisch) sowie dem Zeocinresistenzgen *sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin-resistance). Der Wirkungsmechanismus der Zeocinselektion ist folgender: Zeocin bindet an DNA und schneidet diese, was den Zelltod verursacht. Das Produkt des Zeocinresistenzgens *Sh ble* bindet stöchiometrisch an Zeocin und inhibiert die DNA-zerstörende Wirkung.

Die Zeocinresistenzkasette wurde hinter *bel1* ins virale Genom einkloniert. Dadurch wurde das Bet-Protein auf ein Drittel verkürzt, was die Infektiosität jedoch nicht nachhaltig beeinträchtigte. Mit den neuen viralen Plasmiden, welche das Resistenzgen tragen, wurden BHK-Zellen transfiziert und unter Zeocin selektioniert. Nur die Zellen, welche das virale Genom in ihre eigene DNA integriert haben, können überleben und sich vermehren. So kann Integration nachgewiesen werden, auch wenn nur ein geringer Prozentsatz proviraler DNA integriert.

Zunächst wurde die Resistenzkasette in **pHSRV13** einkloniert. Dieses Plasmid kann Aufschluß darüber geben, ob **pHSRV13** auch mit einem eingebrachten Fremdgen bzw. mit deletiertem Bet-Protein noch infektiös ist.

Zu diesem Zweck wurde über PCR (und mehrere Umklonierungen in **pAT153**) eine NotI und eine SacII Schnittstelle hinter dem *bel1*-Leseraster vor der LTR in **pHSRV13** eingeführt.

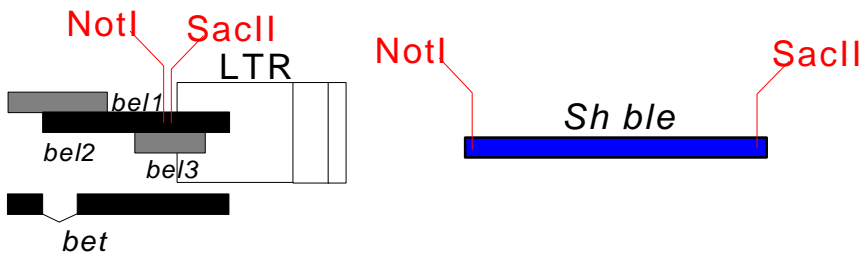


Abb.23:  
Schematische Darstellung der Klonierung zum Einbringen des Zeocin Resistenzgens *sh ble* in pHSRV13.

Das Resistenzgen wurde mittels PCR mit den Primern *Zeo5* und *Zeo6* amplifiziert. Durch den sense-Primer *Zeo6* wurde am 3'-Ende eine *SacII* Schnittstelle eingeführt, die *NotI* Schnittstelle existierte bereits am 5'-Ende. **pHSRV13** wurde nun mit *NotI* und *SacII* geöffnet und die Resistenzgenkassette inkloniert. Davon wurden zwei unabhängige Klone erhalten und transfiziert: **p13zeo14** und **p13zeo18**.

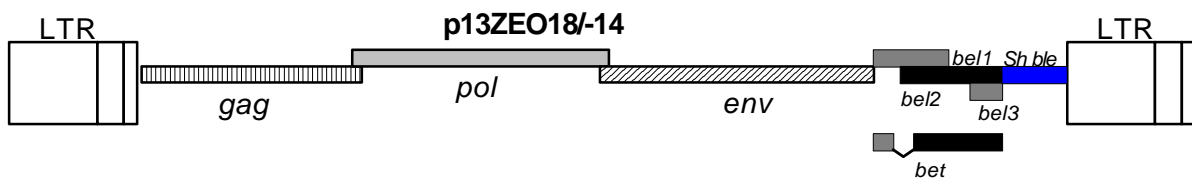


Abb.24:  
Genomkarte des Plasmides **p13zeo18/14**. Das Zeocinresistenzgen *sh ble* ist blau dargestellt.

Durch eine Dreikomponentenligation wurde die Zeocinresistenzkassette in die Klone **pHTINHTU3U5** und **pciHTU3U5** eingebracht. Da diese Klone ohne Zeocinresistenzgen im FAB-Zell Assay keine Infektiösität zeigten, war es von Interesse, ob durch die Selektionsmethode integrierte provirale DNA nachgewiesen werden kann.

Da beide Plasmide keine *NotI* und *SacII* Schnittstellen besitzen, wurde über PCR mit den Primern *SacII S* und *SgrAI A* ein Fragment amplifiziert, welches eine *SacII* Schnittstelle am 5'-Ende besitzt und mit *SgrAI* am 3'-Ende geschnitten werden kann. Dann wurde das Fragment, welches die Zeocinresistenz enthielt mit den Enzymen *BsmBI* und *SacII* aus **p13ZEO18** herausgetrennt.

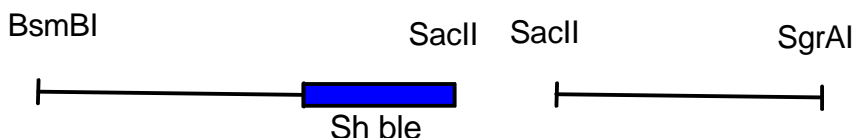


Abb.25:

Schematische Darstellung der Klonierung zum Einbringen des Zeocinresistenzgens *sh ble*. Die beiden Vektoren **pHTINHTU3U5** und **pciHTU3U5** wurden mit BsmBI und SgrAI geöffnet und zusammen mit den beiden Fragmenten in einer Dreikomponentenligation zusammengesetzt. Die entstandenen Plasmide wurden mit **pHTINHTU3U5zeo** und **pciHTU3U5zeo** bezeichnet.

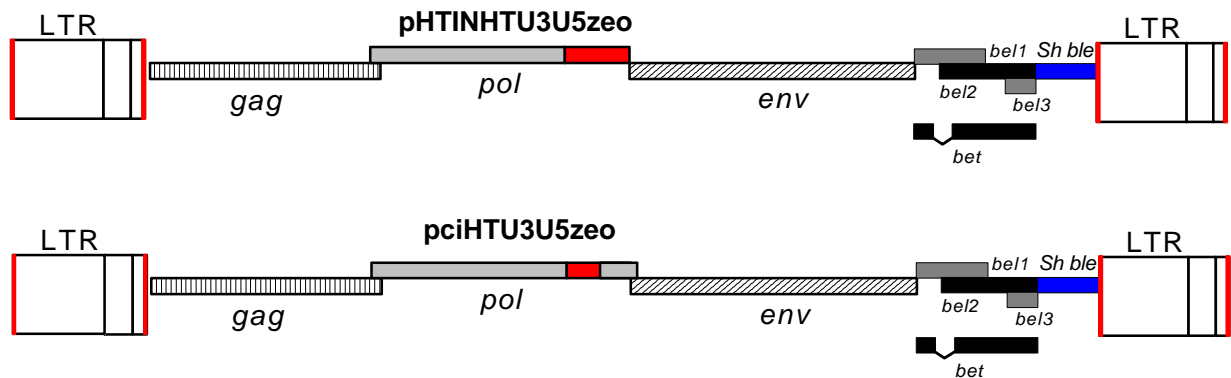


Abb.26: Genomkarten der Plasmide **pHTINHTU3U5zeo** und **pciHTU3U5zeo**. Anteile von HTLV-1 sind rot dargestellt, das Zeocinresistenzgen *sh ble* ist blau dargestellt.

### 3.5.1. Nachweis viraler Proteine nach transienter Transfektion von BHK-Zellen mit p13zeo14/-18, pHTINHTU3U5zeo und pciHTU3U5zeo

Eine transiente Transfektion der Zeocinresistenz tragenden Plasmide sollte zunächst die korrekte Proteinexpression der Konstrukte nachweisen. Dazu wurden BHK-Zellen mit je 10 µg DNA der Klone **p13zeo14/-18**, **pHTINHTU3U5zeo** und **pciHTU3U5zeo** elektrotransfiziert und ohne Zeocinzugabe 48 h kultiviert. Dann wurden die Zellen in Proteinprobenpuffer geerntet und im Westernblot analysiert.

In der Detektion mit Protease Antiserum (Abb. 27, A) war die Pol-Bande pr127 sowie die prozessierte Pol-Bande p80 (ohne Integrase) bei allen drei Zeocinklonen gut zu erkennen. Daraus ist zu ersehen, daß die Pol-Prozessierung normal erfolgte. Bel1 wurde ebenfalls von allen Klonen gut exprimiert. Das Bet-Protein wurde nur in verkürzter Form exprimiert (Stern \*), da die Transkription durch die Zeocinresistenzkassette vorzeitig gestoppt war (Abb. 27, B). Die Detektion mit Anti-Matrix Antiserum (Abb. 27, C) zeigte deutlich die Gag-Doppelbände. Die Gag-Prozessierung war demnach bei den Zeocinkonstrukten intakt.

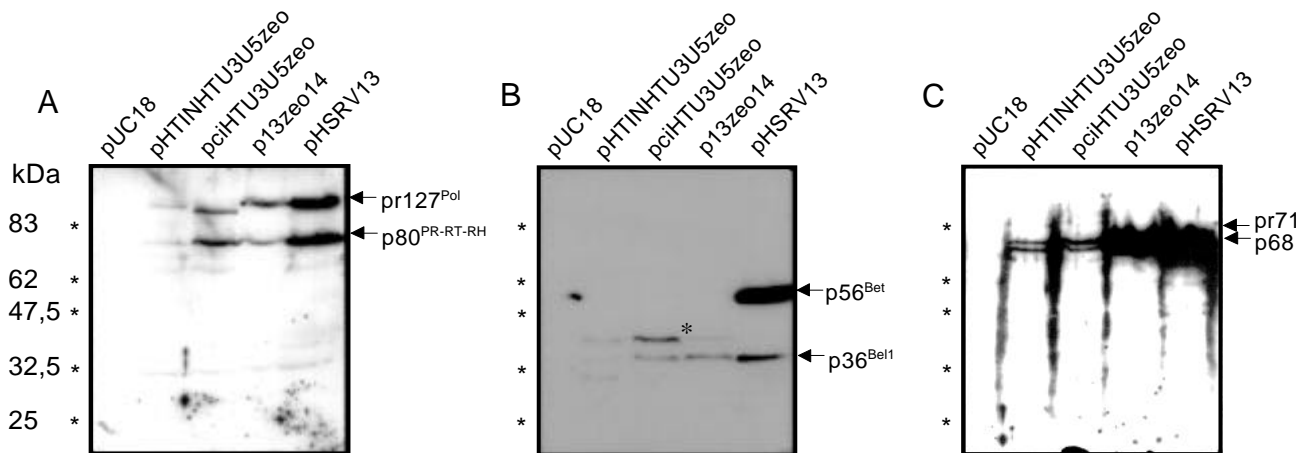


Abb.27:

Westernblot zum Nachweis der viralen Proteine in transient mit **p13zeo14**, **pHTINHTU3U5zeo** und **pciHTU3U5zeo** transfizierten BHK-Zellen. Das Antigen wurde zwei Tage nach der Transfektion geerntet. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HSRV-Protease Serum (**A**), mit Anti-HSRV-Bel1/Bet Serum (**B**), und einem Anti-HSRV-Matrix Serum (**C**). Der Marker ist am linken Bildrand angegeben, die detektierten Proteine am rechten. Der Stern in Blot **B** bezeichnet das verkürzt exprimierte Bet-Protein.

### 3.5.2 . Charakterisierung der Expression viraler Proteine in den stabil transfizierten BHK-Einzelzellklonen

Um stabil transfizierte Zellen zu erhalten, die von einer Ursprungszelle abgeleitet sind, wurden BHK-Zellen mit den zeocinresistenzgentragenden Klonen elektrotransfiziert. Da BHK-Zellen sich gut infizieren lassen und relativ gut virale Integration zulassen, war diese Zelllinie geeignet, um stabile Zellklone herzustellen. Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 h ohne Zeocin kultiviert, dann wurde Zeocin in einer Konzentration von 250 µg/ml Medium zugegeben. Während der folgenden zwei Wochen starb ein Großteil der Zellen ab. Die überlebenden Zellen wurden wie unter 2.2.5.3. beschrieben, gepickt und verdünnt, bis Kulturen zeocinresistenter Einzelzellklone etabliert waren. Diese Zellen wurden ca. zwei Wochen kultiviert, dann wurden davon Zellen in Puffer geerntet und die Proteine im Westernblot analysiert. Es entstanden vier mit dem Plasmid **p13zeo14/18** stabil transfizierte BHK-Zellklone: Zeo14I, Zeo14II, Zeo18I, Zeo18II. Zunächst wurde die Expression des Sh ble Proteins untersucht. Dieses 14 kDa große Protein ist für die

Zeocinresistenz verantwortlich und wurde wie erwartet von allen Zellklonen exprimiert (Abb. 28, A).

Virale Proteine wurden ausschließlich von Zellklon Zeo14I exprimiert. Die Gag-Doppelbande, Bel1 sowie das Pol-Vorläuferprotein und das prozessierte Pol-Protein wurden im Westernblot detektiert (Abb. 28, B, 29, A, B). Bet war nicht nachzuweisen, da es durch die Klonierung vorzeitig gestoppt war. Die drei weiteren Zellklone Zeo14II, Zeo18I und Zeo18II exprimierten keine viralen Proteine.

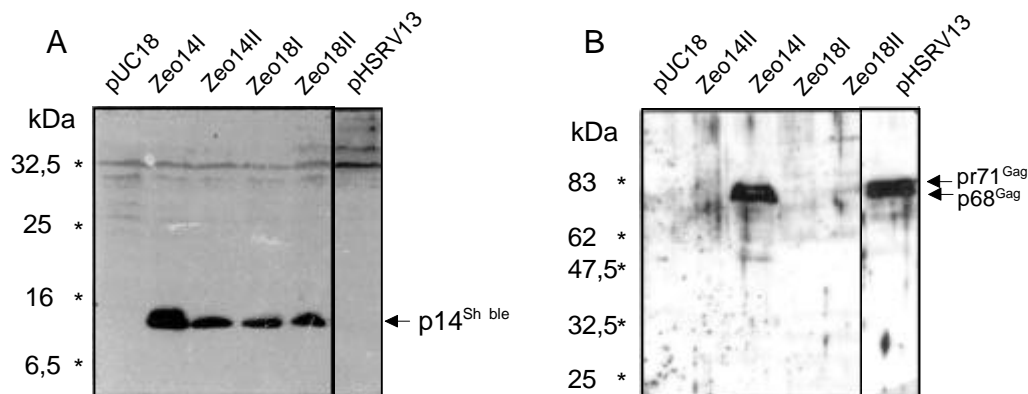


Abb.28: Westernblot mit Proteinextrakten aus stabil mit **p13zeo18/-14** transfizierten BHK-Einzelzellklonen. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Sh ble-Serum (A), und mit einem Anti-HSRV-Matrix Serum (B).

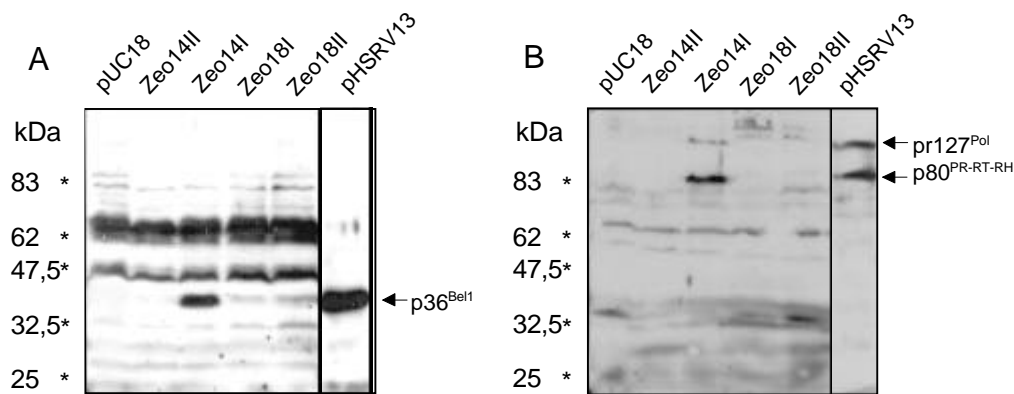


Abb.29: Westernblot mit Proteinextrakten aus stabil mit **p13zeo18/-14** transfizierten BHK-Einzelzellklonen. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HSRV-Bel1-Serum (A), und mit einem Anti-HSRV-Protease-Serum (B).

Mit den Plasmiden **pHTINHTU3U5zeo** und **pciHTU3U5zeo** wurden je fünf stabil transfizierte BHK-Zellklone etabliert. Die mit **pHTINHTU3U5zeo** transfizierten Zellklone wurden mit 6.4zeoA, 6.4zeoB, 6.4zeoC, 6.4zeoD, 6.4zeoF bezeichnet, die

mit **pciHTU3U5zeo** transfizierten Zellklone mit ci6.4zeoB, ci6.4zeoC, ci6.4zeoD, ci6.4zeoE, ci6.4zeoF. Ebenfalls nach ca. zwei Wochen wurden von diesen Zellen Proteinproben genommen und im Westernblot analysiert (Abb. 30).

Sh ble wurde wie erwartet von allen Zellklonen exprimiert (Abb. 30, A), virale Proteine jedoch nur teilweise. Mit Anti Matrix-Antiserum wurde bei den Zellklonen 6.4zeoB und 6.4zeoD die unprozessierte pr71 Gag Bande detektiert (Abb. 30, B). Bei allen anderen Zellklonen ließ sich mit diesem Antiserum keine spezifische Bande detektieren. Das Pol-Vorläuferprotein exprimierten die Zellklone 6.4zeoA, 6.4zeoC, 6.4zeoD, 6.4zeoF (Abb. 30, C). Bel1 wurde von den Zellklonen 6.4zeoA und 6.4zeoC schwach, von 6.4zeoB recht gut exprimiert (Abb. 30, D).

Zellklone, die nach der Transfektion mit Plasmid **pciHTU3U5zeo** erhalten wurden, exprimierten keine viralen Proteine, mit **pHTINHTU3U5zeo** transfizierte Zellen exprimierten teilweise virale Proteine. Man kann davon ausgehen, daß bestimmte virale Proteine einen negativen Selektionsdruck verursachen, was die Selektion von Zellen mit defekten viralen Genomen begünstigte.

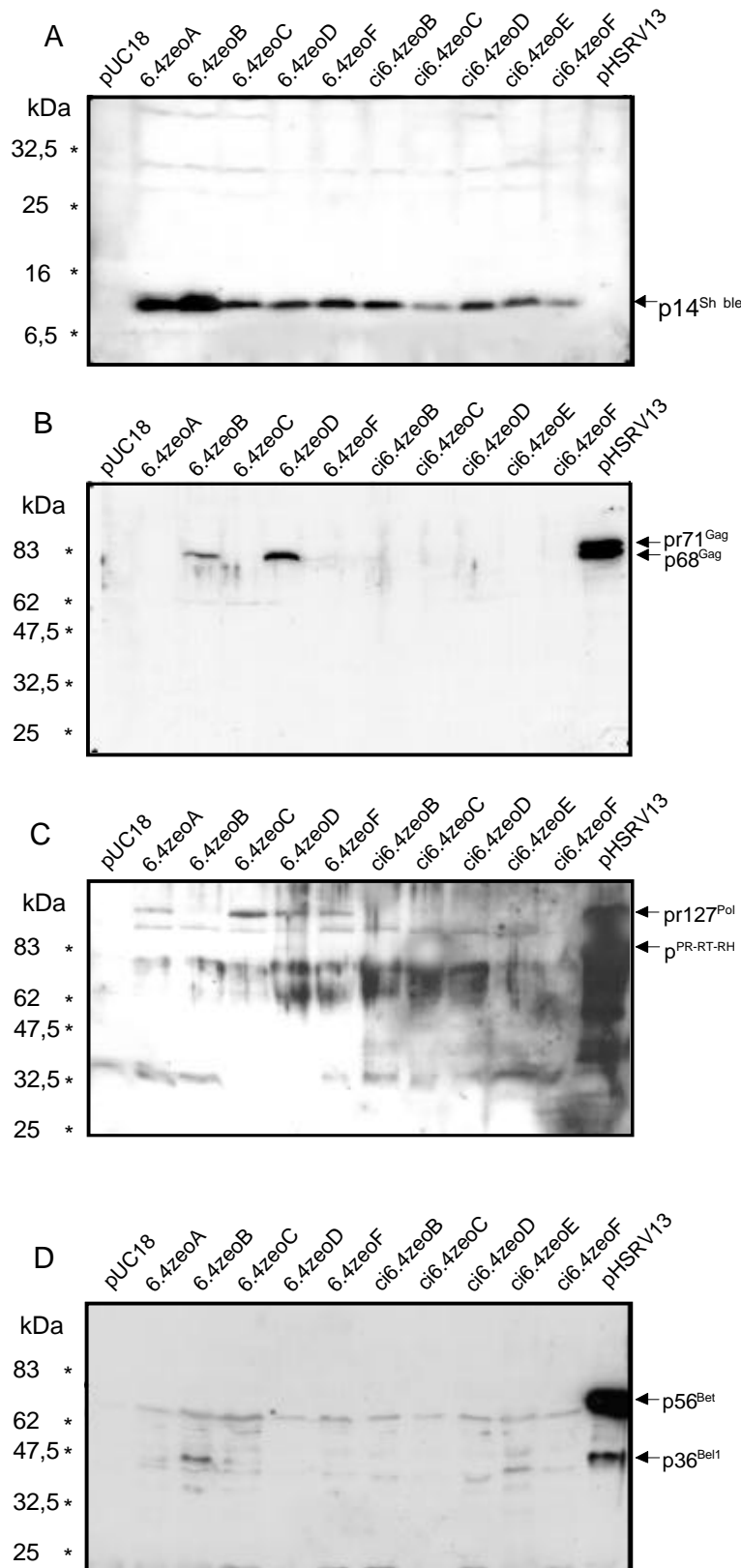


Abb.30: Westernblot mit Proteinextrakten aus stabil mit **pHTINHTU3U5zeo** (6.4zeo) und **pciHTU3U5zeo** (ci6.4zeo) transfizierten BHK-Einzelzellklonen Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Sh ble-Serum **A**, mit einem Anti-HSRV-Matrix Serum **B**, mit Anti-HSRV-Protease-Serum **C** und mit einem Anti-HSRV-Bel1-Serum **D**.

### 3.5.3. Infektiösitätstest der Zeocinkonstrukte mittels FAB-Zell Assay

Das Plasmid **p13zeo14/-18** hatte durch die Einführung des Resistenzgens nach transienter Transfektion nur wenig an viraler Infektiösität gegenüber dem wt verloren. Der Titer lag ungefähr bei  $10^3$  bis  $10^4$  BFFU/ml, das ist ungefähr 10% weniger als beim wt. Die Deletion von Bet hatte demnach wenig Einfluß auf die Replikationsfähigkeit des Virus. Auch die Zellyse durch Syncytienbildung war mit wt identisch.

In den stabilen Zelllinien Zeo14I, Zeo14II, Zeo18I, Zeo18II wurden nur noch von Zeo14I infektiöse im FAB Zell-Assay nachweisbare Viruspartikel gebildet. Der Titer des Zellklons Zeo14I betrug ca.  $5 \times 10^1$ , und war im Vergleich zu transient mit **p13zeo14/-18**-transfizierten Zellen stark reduziert.

Da Syncytienbildung durch intakte virale Partikel die Zelle schädigt, bestand ein Selektionsdruck, der Zellen begünstigte, die keine infektiösen Viruspartikel mehr bildeten. Dies ist eine Erklärung dafür, warum nur einer der vier Zellklone noch infektiöse Partikel produzierte.

Die viralen Klone **pHTINHTU3U5zeo** und **pciHTU3U5zeo** waren schon vor dem Einklonieren des Resistenzgens nicht infektiös und bildeten auch jetzt keine, im FAB-Zell Assay nachweisbare, infektiöse Partikel. Die stabil transfizierten Zellklone 6.4zeoA, 6.4zeoB, 6.4zeoC, 6.4zeoD, 6.4zeoE, ci6.4zeoB, ci6.4zeoC, ci6.4zeoD, und ci6.4zeoE, produzierten ebenfalls keine infektiösen Partikel. Auch Syncytien waren weder in transient noch in stabil transfizierten Zellen nachweisbar.

### 3.5.4. Southern Blot Hybridisierung der stabil transfizierten BHK-Einzelzellklone

Durch Southernblot Hybridisierung kann spezifisch integrierte (oder unspezifisch durch illegitime Rekombination insertierte) provirale DNA im Wirtszellgenom nachgewiesen werden. Da es sich bei den hier verwendeten Zellen um Einzelzellklone handelte, sollte jede Zelle eines Klons das gleiche Bandenmuster nach einem Restriktionsverdau der DNA aufweisen. Durch Restriktionsenzym-Verdau zellulärer DNA sollte es somit möglich sein, die Anzahl der Integrate pro Zellklon zu ermitteln. Dazu wurde zunächst die zelluläre DNA der Klone Zeo14I,



Zeo14II, Zeo18I und Zeo18II extrahiert und aufgereinigt. Nach einem Restriktionsverdau (s. unten) wurde die zelluläre DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Kappillartransfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>) übertragen.

Die Hybridisierung der DNA erfolgte mit einer LTR Sonde, die mit der Restriktionsendonuklease XagI aus dem Plasmid **p13zeo14/-18** geschnitten und im Agarosegel aufgereinigt wurde, sowie einer Zeocin Sonde, welche mit den Enzymen NotI und SacII präpariert wurde. Die LTR Sonde umfasste 1054 Basenpaare, die Zeocin Sonde 835 bp. Beide Sonden wurden vor der Hybridisierung mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP radioaktiv markiert.

Ein Teil der zellulären DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease XagI verdaut. Dieses Enzym schneidet an den Nukleotidpositionen 1100, 11715, 12769, 12902 in das Plasmid **p13zeo14/-18**, d.h. bei einem zirkulären Plasmid entstanden dabei Fragmente der folgenden Größen: 10615 bp, 1054 bp 133 bp und 4441 bp. Geht man aber davon aus, daß nur der virale Anteil des Plasmides, welcher von Nt 70 bis Nt 12860 reicht, in die zelluläre DNA integriert hat, so sollte die 3'-LTR als 1054 bp großes Fragment und die 5'-LTR als 1030 bp + X (flankierende zelluläre DNA unbestimmter Länge) detektiert werden können. Abb. 31, A zeigt das 1054 bp große 3'-LTR Fragment (Pfeil) bei allen Zellklonen, außerdem waren zwischen vier und zehn weitere Banden pro Klon erkennbar, die wahrscheinlich auf die 5'-LTR als 1030 bp + X zurückzuführen waren. Der Zellklon Zeo14I zeigte relativ viele verschmierte DNA-Banden. Dies ist mit der fortlaufenden Produktion infektiöser Partikel des Klons Zeo14I zu erklären. Dadurch entstanden neue Integrationsstellen, welche dann nicht mehr mit der Ursprungszelle identisch waren.

Die gleiche Membran wurde nach Abklingen der Radioaktivität mit der Zeocin-Sonde inkubiert. Diese Sonde sollte mit einem 10615 bp großen viralen Fragment hybridisieren, das keine zelluläre flankierende DNA trägt. Bei allen zellulären Klonen wurde dieses Fragment detektiert (Abb. 30, B), zusätzlich waren einige schwächere, tiefer laufende Banden zu erkennen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

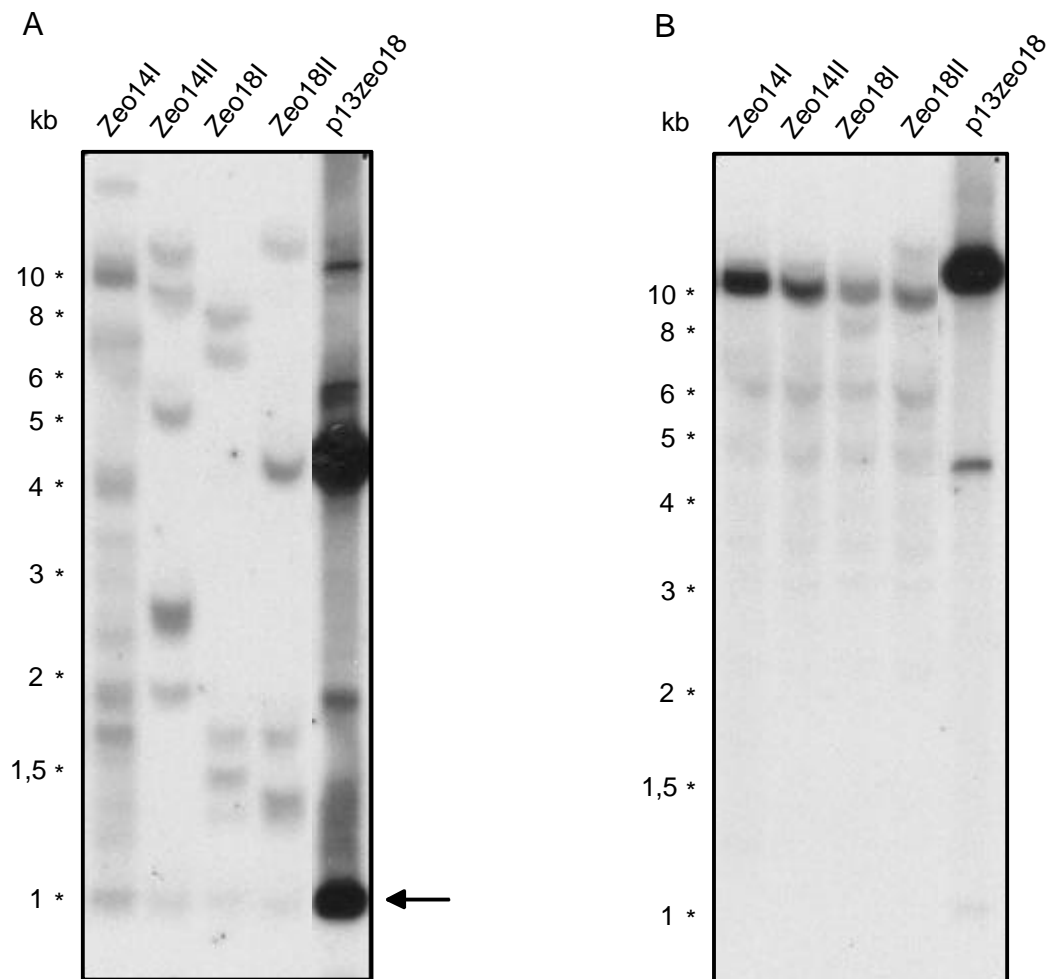


Abb.31: Southern Blot Hybridisierung mit DNA aus stabil mit **p13zeo18/-14** transfizierten BHK-Einzelzellklonen. Die DNA wurde vorher mit XagI geschnitten. Blot **A** wurde mit einer LTR Sonde hybridisiert, Blot **B** mit einer Zeocin Sonde. Die ca. 1kb große LTR-Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der DNA-Größenmarker ist am linken Bildrand markiert.

Ein weiterer Teil der zellulären DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Bpu1102I verdaut. Dieses Enzym schneidet in Plasmid **p13zeo14/-18** nur an Nukleotidposition 9265. Das Plasmid wurde dadurch linarisiert. In integrierter viraler DNA sollten Fragmente der Größen 9195 bp + und 3590 bp + mit flankierender zellulärer DNA entstehen, die bei einer Hybridisierung mit der LTR Sonde auch beide detektiert werden sollten (Abb. 32, A). Da die Größe der zellulären flankierenden DNA nicht definiert ist, konnten die beiden Fragmente im Blot nicht unterschieden werden.

Auch diese Membran wurde nach Abklingen der Radioaktivität mit der Zeocin Sonde hybridisiert. Mit dieser Sonde dürfte nur das Fragment 3590 bp + X, welches das Zeocinresistenzgen trägt, hybridisieren. Das würde bedeuten, daß mit dieser Sonde nur halb so viele Banden detektiert werden könnten, wie mit der LTR Sonde (Abb. 32, B). Das dies nicht der Fall ist, kann unterschiedliche Gründe haben. Die integrierte virale DNA könnte eine LTR verloren haben, was auch das Auftreten zusätzlicher mit der LTR Sonde nicht detektierbarer Banden erklären würde.

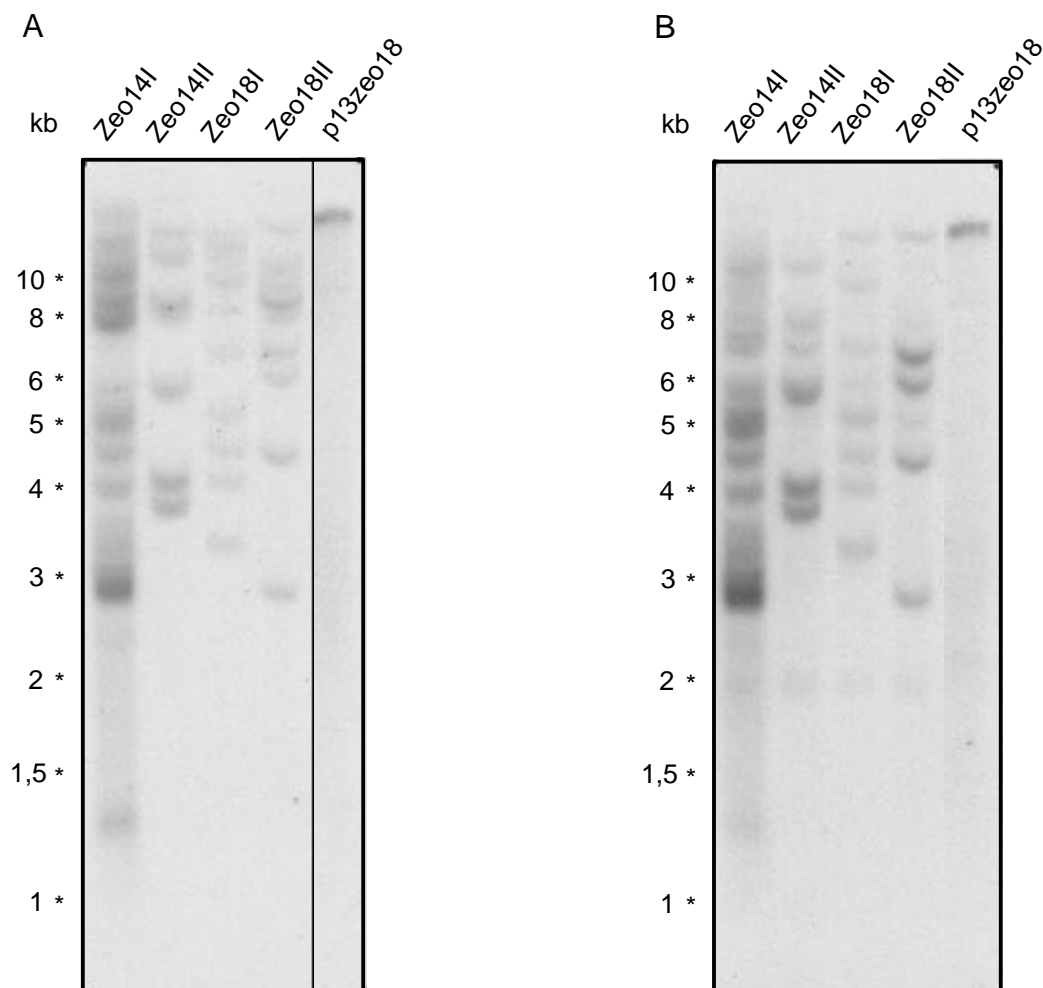


Abb.32: Southern Blot Hybridisierung mit DNA aus stabil mit **p13zeo18/-14** transfizierten BHK-Einzelzellklonen. Die DNA wurde vorher mit Bpu1102I geschnitten. Blot **A** wurde mit einer LTR Sonde hybridisiert, Blot **B** mit einer Zeocin Sonde. Der DNA-Größenmarker ist am linken Bildrand markiert.

Auch die DNA der Zellklone 6.4zeoA, 6.4zeoB, 6.4zeoC, 6.4zeoD, 6.4zeoE, ci6.4zeoB, ci6.4zeoC, ci6.4zeoD, ci6.4zeoE und ci6.4zeoF wurde im Southern Blot mit der LTR Sonde hybridisiert. Dazu wurde ein Teil der DNA wieder mit XagI ein

anderer Teil der DNA mit Bpu1102I verdaut. Die erwarteten Fragmente entsprachen den Fragmenten der Zeo14/-18 Serie.

Die Abbildung 33, A zeigt das Autoradiogramm mit XagI verdauter und mit der LTR Sonde hybridisierter zellulärer DNA. Als Kontrolle diente Plasmid DNA des Klons **pciHTU3U5zeo**. Die 3'-LTR wurde als 1054 großes Fragment im Kontrollplasmid wie auch in allen zellulären Klonen detektiert. Die 5'-LTR sollte im Plasmid bei einer Größe von 4441 bp detektiert werden, bei den Zellklonen als 1030 bp + X. Bei der Hälfte der Zellklone wurde jedoch parallel zur Plasmid DNA eine Bande bei ca. 4441 bp erkannt. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die virale DNA durch Rekombination und nicht durch Integration in das Wirtsgenom inseriert wurde. Außerdem fehlten weitere Banden, die auf Integration hindeuten würden.

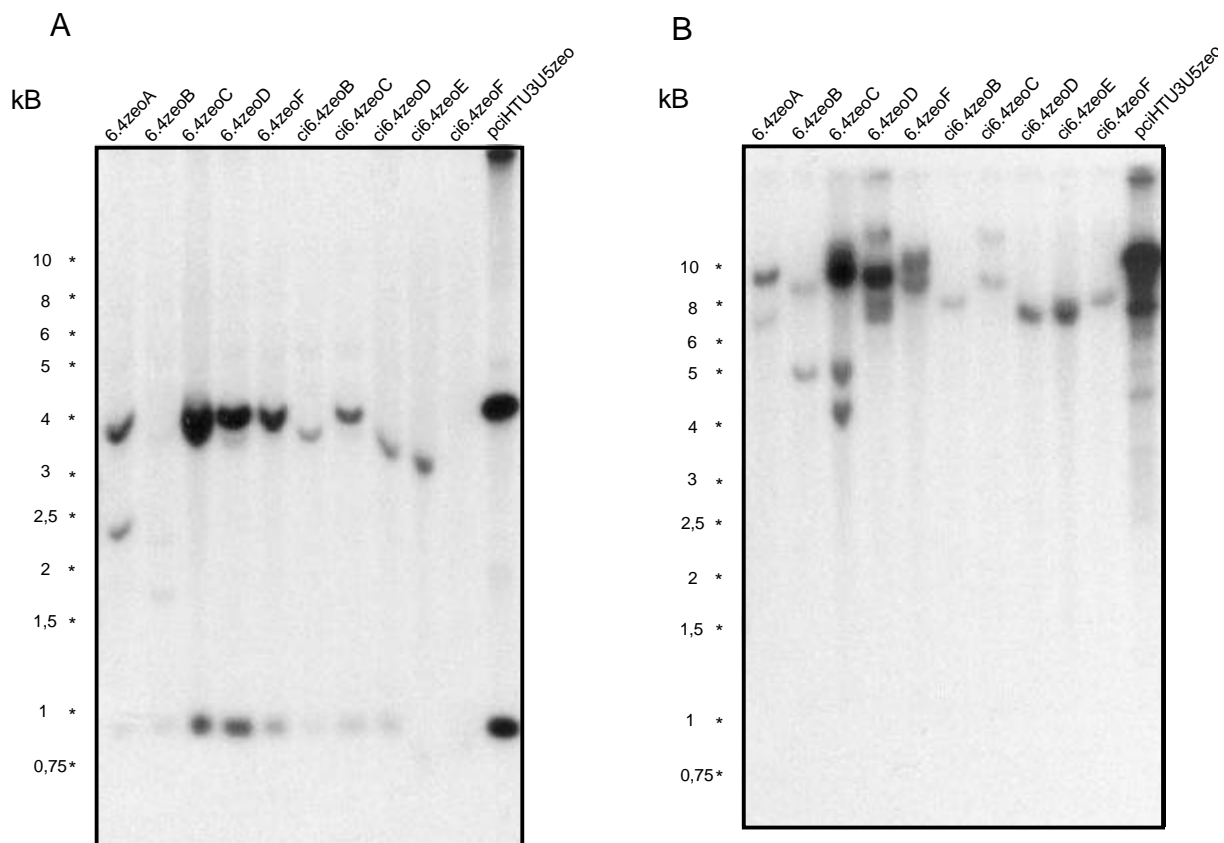


Abb.33:

Southern Blot Hybridisierung mit DNA aus stabil mit **pHTINHTU3U5zeo** und **pciHTU3U5zeo** transfizierten BHK-Einzelzellklonen. Die DNA wurde vorher mit XagI (A) bzw. Bpu1102I (B) geschnitten. Beide Membranen wurden mit einer LTR-Sonde hybridisiert. Der DNA-Größenmarker ist am linken Bildrand markiert.

Abbildung 33, B zeigt mit Bpu1102I geschnittene und mit der LTR Sonde hybridisierte zelluläre DNA. Da dieses Enzym einmal ins virale Genom schneidet,

wurde die kontroll-Plasmid-DNA linearisiert, während integrierte DNA Größen von 9195 bp + X und 3590 bp + X aufweisen sollte. Rekombinante DNA könnte allerdings ebenfalls Größen über 3590 bp aufweisen. Nur Fragmente welche kleiner als 3590 bp sind, wären ein Beweis für Rekombination. Anhand der Abbildung 33, B ist, da keine Fragmente, kleiner als 3590 bp detektiert wurden, die Frage, ob Integration oder Rekombination stattgefunden hat, nicht eindeutig zu beantworten. Durch die Größe kann integrierte, virale DNA daher nicht von rekombinanter DNA unterschieden werden.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Austausch der HSRV-Integrase gegen die HTLV-1-Integrase die Integrationsrate des humanen Foamyvirus steigert. Durch diesen Austausch sollte ein Vektor zum gezielten Gentransfer hergestellt werden, der alle erwünschten Eigenschaften beider Retroviren auf sich vereint: ein chimäres Virus, welches optimal an seine Aufgabe, den kontrollierten Gentransfer angepaßt wäre. Das HSRV-Genom als basale Komponente eines solchen Vektors hätte den Vorteil, daß es apathogen und schwer übertragbar wäre. Seine geringe Integrationseffizienz stellt allerdings einen Nachteil dar. HTLV-1 integriert dagegen mit sehr hoher Effizienz. Es war also naheliegend, ein chimäres Spumavirus zu konstruieren, das die HTLV-1-Integrase trägt.

Wie sich zeigte, war aber der Austausch der Integrase allein nicht geeignet, die Integration zu verbessern.

Retrovirale Integrasen erkennen spezifisch die ersten 6 bis 15 Nukleotide am 5'- und am 3'-Ende der proviralen DNA (Zhou et al. 2001), wobei die Substitution einiger Basen nicht zum völligen Verlust der Integration führen muß. Die Übereinstimmungen dieser 15 Nukleotide zwischen HSRV und HTLV-1 waren allerdings so gering, daß die HSRV-Sequenzen von der HTLV-1-Integrase möglicherweise nicht erkannt wurden. Da dieses HTLV-1-Integrase-chimäre HSRV-Plasmid keine Steigerung der Integration aufwies bzw. keinen viralen Titer im FAB-Zell Assay hatte, wurde ein weiteres Konstrukt kloniert, welches zusätzlich zur HTLV-1-Integrase auch die ersten 15 Nukleotide der entsprechenden HTLV-1-LTR-Enden besaß. Diese 15 Nukleotide wurden daher am 5'-und am 3'-Ende beider LTR in die Sequenz von HTLV-1 rekloniert. Trotz dieser weiteren Anpassung an die HTLV-1-Sequenz ergab sich aber keine Verbesserung der Integration. Dieser Austausch brachte möglicherweise ein neues Problem mit sich. In Studien mit HIV führte eine Substitution dieser Nukleotide zu einer Veränderung der RNA-Sekundärstruktur, die es der reversen Transkriptase unmöglich machte sich an die RNA anzuheften (Zhou et al. 2001).

Eine weitere Erklärung für die Replikationsdefizienz der chimären Klone war das Fehlen der essentiellen cis-Elemente, die sich im C-terminalen Bereich der HSRV-Integrase befinden und für die der Stabilisierung der RNA-Sekundärstruktur wichtig

sind. Diese Überlegung führte zur Klonierung eines proviralen HSRV-Genoms mit einer chimären Integrase, die wie folgt aufgebaut war: der N-terminale und der mittlere Teil der HTLV-1-Integrase wurden mit dem C-terminalen Teil der HSRV-Integrase fusioniert und in das HSRV-Provirus sowie in den chimären Klon mit den HTLV-1-LTR-Enden an Stelle der vorherigen Integrase eingeführt. Auch diese rekombinanten Plasmide erwiesen sich jedoch als replikationsdefizient.

Als Kontrollen dienten ein HSRV-Klon ohne Integrase, ein HSRV-Klon mit wiedereingeführter HSRV-Integrase und ein Konstrukt mit den HTLV-1-LTR-Enden aber mit der HSRV-Integrase.

Es war nicht entscheidbar, ob einer oder mehrere Faktoren für die Replikationsdefizienz der chimären Klone verantwortlich waren. Wie Untersuchungen mit einer im DD(35)E Motiv mutierten HSRV-Integrase belegen (Enssle et al. 1999, Meiering et al. 2000), sind Foamyviren ohne aktive Integrase nicht in der Lage zu replizieren. Eine wichtige Frage war daher, ob es mit der HTLV-1-Integrase überhaupt möglich ist, ein fremdes virales Genom zu integrieren. Die Tatsache, daß auch im zellfreien System Integrasen Oligonukleotide in Testsequenzen integrieren können (Müller 1999, Masuda et al. 1998, Chow 1997, Pahl und Flügel 1993, Farnet und Haseltine 1990), legte den Schluß nahe, daß die Ursache der Replikationsdefizienz schon vor dem Integrationsschritt zu suchen war. Die Analysen der rekombinanten Plasmide sollten darüber Aufschluß geben, wie in den folgenden Abschnitten detailliert diskutiert wurde.

## **4.1. Analyse der chimären Viruskonstrukte**

### **4.1.1. Infektiösität der chimären Klone**

Der FAB-Zell Assay (Yu und Linial 1993) ist der einzige für HSRV existierende Test, um den Virustiter im Zellkulturüberstand zu messen (s.2.2.5.5.). Da er Bel1 abhängig ist, und Bel1 normalerweise nicht im Viruspartikel vorhanden ist, ist es für den Nachweis von Bel1 notwendig, daß alle Schritte im Lebenszyklus des Virus, vom Eindringen in die Zelle bis zur viralen Genexpression vollzogen wurden, um im FAB-Zell Assay ein positives Ergebnis zu liefern. Da die chimären Klone im FAB-Zell Assay negativ waren, mußte einer oder mehrere Schritte im Lebenszyklus des Virus defekt sein d.h. sie bildeten keine bzw. sehr wenige oder defekte Viruspartikel. Daß

allein der Integrase-defiziente Klon einen geringen Virustiter hatte, zeigte, daß eine Restinfektiösität auch ohne Integration gemessen werden konnte. Dies legt den Schluß nahe, daß bei den chimären Konstrukten, die gar keinen Titer aufwiesen, andere Reaktionen als nur die Integration negativ beeinflusst wurde. Der Integrase-defiziente Klon konnte möglicherweise eine Replikationsrunde vollziehen, während die chimären Klone schon dazu nicht in der Lage waren, d.h. ihre Defizite schon vor der Integration lagen.

Für HTLV-1 existiert bislang kein Assay zur Titerbestimmung. Die Infektiösität von HTLV-1 kann nur durch den Nachweis viraler RNA mit Hilfe einer RT-PCR bestätigt werden (Derse et al. 1995, 1996) oder durch in vivo Tests vollzogen werden. Zwar war virale RNA kurz nach der Transfektion (2 Tage) eindeutig nachweisbar, aber zwei Wochen nach der Transfektion und mehreren Zellpassagen war weder virale RNA noch DNA durch PCR oder RT-PCR detektierbar, was die Replikationsdefizienz der chimären Klone bestätigte. Die kurz nach der Transfektion gefundenen viralen Transkripte wurden möglicherweise direkt vom transfizierten Plasmid exprimiert.

#### **4.1.2. Transkription**

Durch den Nachweis genomischer RNA im Northern Blot wurde ausgeschlossen, daß die proviralen Konstrukte aufgrund fehlender genomischer RNA nicht infektiös waren. Obwohl bei HSRV auch genomische DNA im Viruspartikel gefunden wurde (Yu et al. 1999, Linial 1999), ist nicht bewiesen, daß diese DNA auch infektiös ist. Ein Charakteristikum von Foamy Viren ist, daß die Aktivierung der reversen Transkriptase vor bzw. während der viralen Morphogenese stattfindet (Moebes et al. 1997), woraus wahrscheinlich die in den Partikeln gefundene DNA resultiert.

RNA von drei der chimären Klone wurde untersucht, dazu gehörte das rekombinante Plasmid mit der HTLV-1-Integrase und den HTLV-1-LTR-Enden, das Konstrukt mit der chimären Integrase und der Klon mit der chimären Integrase und den HTLV-1-LTR-Enden. Im Vergleich zur wt-Kontrolle waren die genomischen RNA Banden allerdings sehr schwach, was an einer schnelleren Ausdünnung der nichtreplikationsfähigen chimären Klone in der Zellkultur liegen konnte, im Gegensatz zum infektiösen wt-HSRV. Dieser Northern Blot hatte zwar eindeutig das Vorhandensein viraler RNA der gesamten untersuchten Klone in den transfizierten Zellen gezeigt, diese RNA konnte möglicherweise aber nicht in die Viruspartikel



verpackt werden. Wie oben schon angedeutet wurde, war die fehlende Integration eventuell nicht der einzige Grund für die Replikationsdefizienz der chimären Konstrukte. Wichtige, für die Replikation und Bildung von intakten Viruspartikeln notwendige Sequenzen liegen am 5'- und am 3'-Ende der HSRV-Integrase (Heinkelein et al. 1998, 2000). Fehlen diese cis-aktiven-Elemente, welche zusammen CASII genannt wurden, dann ist die genomische RNA instabil und kann möglicherweise nicht mehr in Viruspartikel inkorporiert werden. Diese cis-Elemente liegen im proviralen DNA Genom zwischen Nt 4645 – 5439 und Nt 5989 – 6545. In einer weiteren Veröffentlichung (Erlwein et al. 1998) wird dieses cis-Element zwischen Nt 5638 und 6317 gefunden. Durch den Austausch der Integrase wurde das vordere cis-Element um die letzten 70 bp deletiert, das zweite cis-Element wurde ganz herausgenommen. Da die HTLV-1-Integrase ca. 200 bp kürzer ist als die HSRV-Integrase, fehlen im binären Sequenzvergleich der beiden Integrasen diese Nukleotide am 5'- und am 3'-Ende der HTLV-1-Integrase. Die Verkürzung von Pol am 5'-Ende könnte so generell ein Problem bei der Stabilisierung der RNA darstellen. Um das Problem der fehlenden cis-Elemente zu lösen, wurde daher das 3'-Ende der HSRV-Integrase mit dem 5'-Teil und dem Mittelteil der HTLV-1-Integrase fusioniert. Das zweite cis-Element wurde dadurch bis auf wenige Nukleotide regeneriert. Da daraufhin trotzdem keine Integration bzw. Replikation zu messen war, ist das erste cis-Element möglicherweise ebenfalls unverzichtbar für eine Inkorporation der genomischen RNA in die viralen Partikel. Sequenzvergleiche von SFV1, SFV2 und cpzFV mit der 114 bp langen fehlenden Sequenz des ersten cis-Elementes von HSRV, daß die Konservierung in diesem Bereich nicht signifikant höher war als im restlichen Genom. Trotzdem könnte dieser Bereich eine wichtige Bedeutung für die Replikation von HSRV haben, die weniger auf der Sequenz als vielmehr auf der Faltung der RNA beruht. Um dies zu überprüfen, müßten diese 114 bp vor die HTLV-1-Integrase im HSRV inkloniert werden. Der in Abbildung 1 gezeigte Proteinsequenzvergleich basiert auf den Röntgenstrukturanalysen der RSV und HIV Integrasen (Yang et al. 2000) und spiegelt die in den chimären proviralen Plasmiden deletierten HSRV *pol* Basenpaare wieder.

Die Aktivität chimärer Integrasen wurde schon früher untersucht, um die Funktionen der einzelnen Motive der Integrasen besser zu verstehen (Katzmann und Sudol 1998, Berger et al. 2001). Diese chimären Enzyme waren alle, verglichen mit dem

jeweiligen wt in ihrer Aktivität eingeschränkt. Damit ist es wahrscheinlich, daß zwar das cis-Element regeneriert wurde, die chimäre Integrase aber nur noch partiell oder überhaupt nicht mehr aktiv war.

HSRV-pol	MKPDITIQHE	KGISLQIPVF	ILKGNALADK	LATQGSYVVN	CNTKK	<b>PNLDA</b>
HSRV-pol	MKPDITIQHE	KGISLQIPVF	ILKGNALADK	LATQGSYVVN	CNTKP.....	
HSRV-IN	<b>ELDQLLQGHY</b>	<b>IKGYPKQYTY</b>	<b>FLEDGKVKVS</b>	<b>RPE</b>	GVKIIPP	QSDRQKIVLQ
HTLV-IN	.....	.....	.....	...GALLITP	..VLQLSPA	E
HSRV-IN	A <b>EN</b> L <b>A</b> STGRE	ATLLKIANLY	WWPNMRKDVV	KQLGRC <b>Q</b> Q <b>CL</b>	ITNASNKASG	
HTLV-IN	L <b>S</b> F <b>T</b> CGQT	ALTLQGAT..	..TTEASNIL	R... <b>S</b> <b>C</b> H <b>A</b> C.	RKNNPQHOMP	
HSRV-IN	PILRPDRPQK	<b>P</b> FDK <b>F</b> I <b>D</b> YI	GPLPPSQGYL	YVLVVVDGMT	GFTWLYPTKA	
HTLV-IN	RGHIR.RGLL	<b>P</b> NHI <b>W</b> Q <b>G</b> DIT	.HFKYKNTLY	RLHVWVDTFS	GAISATQKRK	
HSRV-IN	PSTSATVKSL	..NVLTSIAI	<b>P</b> KVI <b>H</b> S <b>D</b> Q <b>G</b> A	AFT <b>S</b> S <b>T</b> FAEW	AKER <b>G</b> I <b>H</b> LEF	
HTLV-IN	ETSSEAISSL	L.QAIAYL <b>G</b> K	<b>P</b> SYIN <b>T</b> D <b>N</b> GP	AYISQDFLNM	CTSLAIRHTT	
HSRV-IN	STPYHPQSGS	<b>K</b> VER <b>K</b> NSDI <b>K</b>	RLLTKL.LVG	RPTKWYDLLP	VVQ...LAL.	
HTLV-IN	HVPYNPTSSG	<b>L</b> VER <b>S</b> NGIL <b>K</b>	TLLYKYFTDK	PD.....LP	MDNALSIALW	
HSRV-IN	.. <b>N</b> NTYSPVL	KYTPHLLFGI	DSNTPFANQD	TLDLTREEEL	SLLQIRTSLY	
HTLV-IN	TINHLNVLTN	CHKTRWQDLH	HSPRLQ....	.....	.....	
HSRV-IN	HPSTPPASSR	SWSPVVGQLV	QERVARPASL	RPR <b>W</b> H <b>K</b> P <b>S</b> TV	LKVLNPRTVV	
HTLV-IN	..... PIPE	THSLSNKQTH	WYYFKLPGLN	SRQ <b>W</b> K <b>G</b> P <b>Q</b> EA	LQEAAGAALI	
HSRV-IN	ILDHLGNNRT	VSIDNLKPTS	HQNGTTNDDTA	TMDHLEKNE		
HTLV-IN	PVSASSAQWI	PWRLKRAAC	PRPVGGPADP	KEAEKTPRDL	QHHG	

Abb.1

Vergleich der HSRV-Integrase mit der HTLV-1-Integrase, basierend auf den Röntgenstrukturanalysen der RSV und HIV Integrasen (Yang et al. 2000). Die Schnittstelle zwischen der RNase H Region und der Integrase-Domäne durch die virale Protease ist mit einem schwarzen vertikalen Pfeil gekennzeichnet. Die Klonierungsstelle der HTLV-1-Integrase ist mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet. Die Sequenz, um welche die HTLV-1-Integrase verkürzt ist und die für HSRV ein wichtiges cis-Element darstellt, ist **lila** unterlegt. Die beiden Histidine und die beiden Cysteine des HH-CC-Motifs sind **grün** bzw. **gelb** unterlegt. Die beiden Asparaginsäurereste des DD(35)E Motifs sind **rot** gekennzeichnet, die genau 35 Aminosäuren von dem zweiten Asparaginsäurerest entfernte Glutaminsäure **grünblau**. Weitere im Vergleich auch mit anderen Integrasen konservierte AS sind fett dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit, das fehlende cis-Element zu kompensieren sollte durch eine Kotransfektion zweier viraler Konstrukte untersucht werden. Durch eine Transkomplementation sollte so die Infektiösität wieder hergestellt werden. Dazu

wurde das Konstrukt mit der HTLV-1-Integrase und den HTLV-1-LTR-Enden mit dem Klon, bei welchem nur die HTLV-1-LTR-Enden eingesetzt waren, kotransfiziert, um so das cis-Element durch den zweiten Klon bereitzustellen. Da beide Plasmide die HTLV-1-LTR-Enden besaßen, war nicht zu erwarten, daß sie durch die HSRV-Integrase ins Wirtsgenom integriert werden könnten.

Da die Zellkulturüberstände trotz der Kotransfektion im FAB-Zell Assay negativ waren, fand in diesem Fall keine Transkomplementation statt. Möglicherweise müßte das cis-Element auf dem gleichen viralen Genom liegen wie die HTLV-1-Integrase um die RNA-Stabilisierung und Verpackung zu gewährleisten.

#### **4.1.3. Proteinexpression und Prozessierung**

Die Analyse der Proteinexpression sollte Aufschluß darüber geben, ob die viralen Proteine exprimiert und prozessiert wurden. Die Expression viraler Proteine sagt zunächst nichts über die Integrationsfähigkeit der proviralen Konstrukte aus, da virale Proteine vom transfizierten Plasmid exprimiert werden.

Die Analyse des humaninfektiösen Virus (HSRV) erfolgte sowohl im homologen (293T-Zellen) als auch im heterologen (BHK-Zellen) System.

BHK-Zellen sind immortalisierte Nierenfibroblastenzellen eines neugeborenen syrischen Hamsters. Bei 293T-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte humane embryonale Nierenzelllinie, die mit Adenovirus-5-DNA transformiert wurde und das SV40 T-Antigen stabil im Genom integriert, trägt. Die Morphologie der 293T-Zellen ist epithelial.

Obwohl die Transfektionseffizienz in BHK-Zellen höher war als in 293T Zellen, erfolgte durch die schnelle Proliferation der BHK-Zellen eine schnelle Ausdünnung von transfizierten Zellen. Da BHK-Zellen durch HSRV leicht infiziert werden, war dies bei einer Transfektion mit infektiösen Viruskonstrukten kein Problem, denn das Virus konnte durch Infektion an die neuen Zellen weitergegeben werden. Da bei einer Transfektion mit replikationsunfähigen viralen Konstrukten jedoch keine neuen Zellen infiziert wurden, waren nach der Transfektion mit den chimären Viruskonstrukten bald keine viralen Proteine im Zellysate mehr nachweisbar.

Die Konzentration der analysierten viralen Proteine variierte zwischen den benutzten Zelllinien, aber auch zwischen den einzelnen Konstrukten. Dies konnte an der unterschiedlichen Gesamtproteinkonzentration der analysierten Probe liegen. Die

Expression der viralen Proteine konnte aber auch aufgrund technischer Faktoren, wie z.B. Reinheit der DNA, schwanken.

Da Bel1 essentiell für die ausreichende Expression der Strukturproteine ist, war es ein wichtiges Resultat, daß der virale Transaktivator Bel1 von allen oben beschriebenen chimären viralen Konstrukten exprimiert wurde. Erst ab einer bestimmten kritischen Konzentration von Bel1 erfolgt die Transaktivierung des LTR-Promotors und somit die Transkription der Strukturgene (Löchelt 2001).

Obwohl Bel1 und auch Bet von den chimären Konstrukten in BHK- und 293T-Zellen exprimiert wurden, war das Konzentrationsverhältnis von Bel1 zu Bet in BHK- und 293T-Zellen unterschiedlich. Die Konzentration von Bet im Verhältnis zu Bel1 war in 293T-Zellen stärker als in BHK-Zellen. Ob diese Beobachtung auf eine höhere Expression von Bet oder einen verzögerten Abbau des Proteins zurückzuführen war, ließ sich anhand der vorliegenden Daten nicht entscheiden.

Das Gag-Protein wurde in BHK-Zellen von allen viralen Konstrukten exprimiert. Nur bei dem Integrase-defizienten Klon war die Prozessierung von Gag jedoch gestört, da nur die p71 Gag-Bande im Westernblot detektiert wurde. In 293T-Zellen war bis auf den Kontrollklon mit wiedereingesetzter HSRV-Integrase und dem HSRV-Klon mit den HTLV-1-LTR-Enden bei keinem der anderen proviralen Konstrukte die terminale Gag-Prozessierung nachweisbar. Nur der Klon mit wiedereingesetzter HSRV-Integrase und das Konstrukt mit den HTLV-1-LTR-Enden zeigten, wenn auch nur schwach, die p68-Gag-Bande im Westernblot. Da Gag durch die virale Protease prozessiert wird (Kovalinka et al. 1995) könnte man zunächst von einem Defekt der viralen Protease ausgehen. Das Fehlen der Integrase im Pol-Vorläuferprotein scheint die Gag-Prozessierung durch die virale Protease, in beiden Zelltypen zu inhibieren.

Die Expression der Pol-Proteine war in der Westernblotanalyse zwar bei allen proviralen Konstrukten schwächer als die Gag-Expression, die Prozessierung von Pol war jedoch bei allen Klonen sowohl in BHK- als auch in 293T-Zellen normal. Auch das Konstrukt ohne Integrase war in der Lage, den nur 4,5 kDa großen, mit Env überlappenden Teil der Integrase abzuspalten. Da auch die Pol-Proteine von der viralen Protease prozessiert werden, konnte somit das Fehlen der Gag-Prozessierung in 293T-Zellen nicht auf einen Defekt der viralen Protease zurückgeführt werden.

Eine Erklärung für die fehlende Gag-Prozessierung könnte ebenfalls mit dem oben beschriebenen CASII Element zusammenhängen. In 293T-Zellen fand bei den in Pol modifizierten chimären Plasmiden keine Prozessierung von Gag statt, der Integrase-defiziente Klon zeigte auch in BHK-Zellen keine Gag-Prozessierung, allen chimären Klonen fehlte das cis-Element. Das Kontrollplasmid mit wieder eingesetzter HSRV-Integrase zeigte normale Gag-Prozessierung, das Plasmid mit der HSRV-Integrase aber den HTLV-1-LTR-Enden wies ebenfalls eine, verglichen mit wt schwächere Gag-Prozessierung auf. Bei beiden Konstrukten war CASII erhalten, beide zeigten Gag-Prozessierung. Fehlende Gag-Prozessierung nach der Deletion des cis-Elementes CASII wurde auch von Heinkelein et al. 1998 gefunden. Die ebenfalls in 293T-Zellen durchgeführten Transfektionen zeigten ein Ausbleiben der Gag-Prozessierung bei gleichzeitiger normaler Pol-Prozessierung. In untersuchtem Zelllysate wurde noch eine sehr geringe Gag-Prozessierung detektiert, wogegen in Viruspartikeln keine Prozessierung von Gag gefunden wurde (Heinkelein et al. 1998). Eine Erklärung für das Ausbleiben der Gag-Prozessierung nach Deletion von CASII ist, daß die RNA im Viruspartikel eine stabilisierende Funktion zwischen Gag und Pol hat. Wenn die genomische RNA selbst nicht mehr stabil in den Partikel eingebaut würde, könnte dann zwar Pol sich selbst prozessieren, jedoch nicht mehr mit Gag interagieren. Da die Gag-Prozessierung essentiell für die Infektiosität von HSRV ist (Enssle et al. 1997), führt das Fehlen der Gag-Prozessierung normalerweise zum vollständigen Verlust des Virustiters (Zemba et al. 1998, Kovalinka et al. 1995). Da die proteolytische Prozessierung keine Voraussetzung für die Inkorporation von Pol in Partikel ist (Baldwin und Linial 1999), werden Viruspartikel gebildet, die jedoch größer bzw. deformiert unter dem Elektronenmikroskop erscheinen (Kovalinka et al. 1995).

Dieses Modell erklärt jedoch noch nicht, warum in BHK-Zellen Gag-Prozessierung stattfand. Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß bestimmte zelluläre Faktoren die in 293T-Zellen fehlen, in BHK-Zellen aber vorhanden sind, eine Rolle bei der Prozessierung von Gag spielen. Es könnte sich dabei um Proteine handeln, die zur Faltung von Gag oder Pol beitragen (Chaperone). Außerdem wäre eine Wechselwirkung der transfizierten Plasmidklonen mit Teilen von endogenen in BHK- oder 293T-Zellen vorhandenen Retroviren denkbar.

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, daß die Gag-Proteine auch im Präintegrationskomplex einiger Retroviren enthalten sind (Gallay et al. 1995, Miller et al. 1997, Carteau et al. 1999, Haffar et al. 2000). Die Gag-Proteine interagieren dort möglicherweise spezifisch mit der Integrase. Eine funktionelle HTLV-1-Integrase könnte aus diesen Gründen HTLV-1-Gag als Interaktionspartner benötigen, wobei HSRV-Gag eventuell nicht kompatibel wäre. Um diesen Punkt als Möglichkeit für die Replikationsdefizienz der Klone zu untersuchen, wurde ein HTLV-1-Gag Expressionsplasmid mit den chimären Klonen kotransfiziert. Da der Virustiter trotz der Kotransfektion mit HTLV-1-Gag weiterhin bei allen chimären Klonen sowohl in BHK- als auch in 293T-Zellen extrem gering war, zeigte sich, daß mit diesem Versuchsaufbau durch HTLV-1-Gag keine Verbesserung der Infektiosität erzielt werden konnte. Trotzdem muß nicht ausgeschlossen werden, daß Gag im Präintegrationskomplex eine Rolle spielt, nur konnte in der Kotransfektion das ebenfalls vorhandene HSRV-Gag störend gewirkt haben. Im Präintegrationskomplex sind außer der Integrase und der proviralen DNA noch weitere virale und zelluläre Proteine vorhanden (Miller et al. 1997). Die Integrase benötigt demnach eventuell weitere virale Proteine, wie die reverse Transkriptase, die virale Protease oder bestimmte akzessorische Proteine welche alle schon im Präintegrationskomplex nachgewiesen werden konnten (Hansen und Bushmann 1997, Farnet und Haseltine 1991), deren Funktionen im Bezug auf die Integration jedoch noch unklar sind. Im Hinblick auf die Kotransfektion der chimären Konstrukte mit HTLV-1-Gag kann man schlußfolgern, daß außer Gag noch weitere virale Proteine bei der Integration eine Rolle spielen, so daß erst die Interaktion aller wichtigen viralen Proteine eine korrekte Integration zuläßt.

Obwohl die HTLV-1-Integrase sowie die chimäre Integrase im Westernblot in BHK-Zellen 24 h nach der Transfektion detektierbar waren, konnte das Pol-Vorläuferprotein mit dem Anti-HTLV-1-Integrase-Serum nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise erfolgte nach der Abspaltung der HTLV-1-Integrase vom Pol-Vorläuferprotein eine Konformationsänderung, so daß die ursprüngliche Form durch den Antikörper nicht detektierbar war. Ein weiterer interessanter Aspekt war der schnelle Abbau der HTLV-1-Integrase. Während das HSRV-Pol-Vorläuferprotein mit dem Anti-Protease-Serum auch 48 h nach der Transfektion noch im Westernblot zu

sehen war, war die HTLV-1-Integrase schon nicht mehr nachweisbar. Eventuell lag die Konzentration der HTLV-1-Integrase schon unter der Nachweisgrenze. Eine schnelle Abspaltung von Pol und ein darauffolgender Abbau der Integrase in der Zelle könnte die Ursache dafür sein.

Möglich wäre dann, daß die Integrase im Viruspartikel fehlte, oder in zu geringer Konzentration vorhanden war. Da die Prozessierung von Pol normalerweise erst im Viruspartikel erfolgt, könnte eine vorzeitige Abspaltung der Integrase dazu führen, daß sie nicht in den Partikel verpackt wird.

Die Env-Proteine sind für die Bildung infektiöser Viruspartikel bei HSRV essentiell (Pietschmann et al. 1999) und für die Syncytienbildung infizierter Zellen verantwortlich. Da die Spliceakzeptoren von *env* in dem mit *env* überlappenden Teil der Integrase liegen, war die korrekte Env-Expression ein wichtiges Resultat. Env ließ sich jedoch im Westernblot nur schwer nachweisen, da das Env(TM) und das Env(SU)-Antiserum sehr viele unspezifische Bindungen eingingen und dadurch der Hintergrund zu stark war. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Radioimmunpräzipitationen (RIPA) mit transfizierten BHK-Zellen durchgeführt. Untersucht wurden die proviralen Konstrukte mit der HTLV-1-Integrase und den HTLV-1-LTR-Enden sowie das Konstrukt mit nur den HTLV-1-LTR-Enden. Mit dem Env(SU)-Antiserum war in der RIPA bei beiden Klonen das Env-Bet-Fusionsprotein und das Env-Vorläuferprotein nachzuweisen. Das abgespaltene SU-Protein konnte weder in der wt-Positivkontrolle noch in den chimären Konstrukten detektiert werden. Da das Bandenmuster der chimären Konstrukte mit den wt-Banden übereinstimmte, konnte davon ausgegangen werden, daß die Env-Expression nicht beeinträchtigt war, was auch an der, wenn auch geringen Syncytienbildung bei BHK-Zellen mit den chimären Viruskonstrukten zu erkennen war. Interessanterweise wurde mit dem Env(SU)-Antiserum das Bet-Protein ebenfalls gefällt. Möglicherweise hing dieser Befund mit dem Env-Bet-Fusionsprotein zusammen (Giron et al. 1999, Lindemann und Rethwilm 1998); die Prozessierung erfolgte eventuell *in vitro*, nach der Fällung, oder es bildete sich ein Komplex zwischen Bet und Env, der unter den verwendeten Bedingungen der Fällung stabil blieb.

#### 4.1.4. Aktivität der reversen Transkriptase

Die reverse Transkriptase ist notwendig, um die genomische im viralen Partikel vorhandene RNA in provirale DNA umzuschreiben. Fehlt die reverse Transkriptase oder ist sie nicht aktiv, dann sind die betreffenden Viruspartikel nicht infektiös. Da in den chimären Viruskonstrukten durch den Austausch der Integrase an *pol* manipuliert wurde, konnte eine Beeinträchtigung der Aktivität der RT nicht ausgeschlossen werden, denn die reverse Transkriptase des HTLV-1 benötigt die RT-RH- und RT-RH-IN Fusionsproteine für ihre vollständige Aktivität (Trentin et al. 1998). Durch einen RT-Assay konnte die RT-Aktivität der chimären Konstrukte mit der Aktivität der RT von HSRV verglichen werden. Auf RT-Aktivität untersucht wurden der Klon mit der HTLV-1-Integrase und den HTLV-1-LTR-Enden und das Konstrukt bei welchem nur die HTLV-1-LTR-Enden angepasst wurden. Die RT-Aktivität war nach der Transfektion in 293T-Zellen bei allen untersuchten viralen Konstrukten einschließlich der wt-Kontrolle sehr niedrig. Auch hier unterschied sich das Verhalten der viralen Konstrukte in 293T-Zellen von dem Verhalten in BHK-Zellen. In BHK-Zellen war die RT-Aktivität der wt-Kontrolle sehr hoch, die chimären Klone dagegen zeigten auch hier nur eine geringe RT-Aktivität. Da das Konstrukt, bei welchem nur die LTR-Enden verändert waren, eine sehr niedrige RT-Aktivität aufwies, konnte die Veränderung in *pol* nicht der einzige Grund für die relativ geringe RT-Aktivität sein. Auch eine allgemeine Replikationsdefizienz der viralen Plasmidklone aus anderen Gründen kann somit in einer geringen RT-Aktivität resultieren. Denn wenn keine Replikation stattfindet sind nur wenige RT-exprimierende provirale Konstrukte vorhanden. Allein die geringe RT-Aktivität im Zellysat von mit den chimären Konstrukten transfizierten BHK-Zellen sollte also ausreichen, um von einer weitgehend intakten reversen Transkription der Klone ausgehen zu können. Besonders geringe Konzentrationen an RT wurden in Viruspartikeln gefunden. Dies bestätigt die Theorie, daß die RT zwar ausreichend exprimiert wurde, aber nur wenige oder für eine Neuinfektion unzureichende Viruspartikel gebildet wurden. Daß die RT-Aktivität in Viruspartikeln (VP) der chimären Klone immer noch signifikant höher war, als die der Negativkontrolle führte zu dem Schluß, daß einige wenige Partikel auch von den chimären Klonen gebildet wurden.



## 4.2. Analyse der zeocinresistenten, chimären Viruskonstrukte

Durch die Einklonierung eines Resistenzgens in die viralen Konstrukte sollten, Zellen mit integrierter viraler DNA gezielt selektioniert werden. Zellen ohne die Zeocinresistenz-vermittelnden Integrate starben ab, und es erfolgte eine Anreicherung von Zellen mit integrierter proviraler DNA. Wenn Integration ein seltenes Ereignis ist, was bei den chimären Klonen der Fall zu sein schien, könnten speziell die wenigen Zellen mit integrierter viraler DNA proliferieren und ließen sich so von der Masse der anderen Zellen abgrenzen.

Das Zeocinresistenzgen war für diese Untersuchungen besonders geeignet, da Zeocin auf Bakterien und eukaryotische Zellen gleichermaßen toxisch wirkt. Ein Vektor mit diesem Resistenzgen hatte dadurch in pro- und eukaryontischen Zellen einen Selektionsvorteil, was die Klonierung vereinfachte. Zeocinresistenz-Selektion ist sehr sicher, denn Zeocin führt nicht nur zu einem Wachstumsarrest der nichtresistenten Zellen, wie es bei einigen anderen Antibiotika der Fall ist, sondern zum Absterben der Zelle durch die Zerstörung der zellulären DNA.

Das Resistenzgen wurde in drei der viralen Konstrukte eingebracht, in wt-pHSRV13, in den Klon mit den HTLV-1-LTR-Enden und der HTLV-1-Integrase und in das Konstrukt mit den HTLV-1-LTR-Enden und der chimären Integrase. Die Resistenz wurde direkt hinter *bet1* in das virale Genom eingebracht, und zwar so, daß *bet1* intakt blieb. *Bet* und *Bel2* wurden durch ein Stop-Codon vor dem Start der eingebrachten Sequenz nur in stark verkürzter Form exprimiert.

In einer transienten Transfektion in BHK-Zellen zeigten die neuen Konstrukte in der Westernblotanalyse eine normale Proteinexpression und Prozessierung. Der Virustiter lag bei dem wt-Zeocinklon nach transienter Transfektion ca. 10% niedriger als bei HSRV. Die Deletion von *bet* und *bel2* hatte also nur einen sehr geringen Einfluss auf die Infektiösität des Virus.

Die beiden chimären Klone zeigten nach dem Einbringen des Resistenzgens wie zu erwarten war, keine positive Veränderung des Titors.

Nach der Transfektion mit den Resistenz-tragenden Plasmiden wurden durch Zeocinselektion Einzelzellkolonien isoliert. Die Transfektionen wurden in BHK-Zellen durchgeführt, da diese Zelllinie sich als stabiler im Bezug auf die virale Genexpression erwiesen hatte, und stärker proliferierte, was zu einer schnelleren

Bildung von resistenten Kolonien führte. Die erhaltenen Einzelzellkolonien zeigten Unterschiede in der Morphologie der Zellen und in der Proliferationsrate. Diese Unterschiede waren wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das Virus, wie im Southern Blot zu erkennen war, bei den jeweiligen Einzelzellklonen an unterschiedlichen Loci im Wirtszellgenom integriert hatte und dadurch eventuell zelluläre Gene beeinflusste. Auch durch illegitime Rekombination anstatt Integration könnten zelluläre Gene beeinflusst worden sein.

Die Titerbestimmung der Einzelzellklone war bei den mit wt-Zeocin stabil transfizierten Zellen bis auf eine Kultur negativ. Trotz der stabilen Integration der Virus-DNA ins Wirtsgenom wurden keine infektiösen Partikel mehr gebildet. Weitere Produktion von infektiösen Partikeln war für die Zelle ein negativer Selektionsdruck, da durch die Infektion eine Zerstörung der Zelle durch Syncytienbildung ausgelöst würde. Es waren so vor allem Zellen mit Zeocinresistenz, aber defektem viralem Genom bei der Selektion im Vorteil. Dies zeigte sich auch bei der Analyse der viralen Genexpression. Nur die Einzelzellkultur, welche als einzige noch einen Virustiter von ca.  $5 \times 10^1$  BFFU/ml aufwies, zeigte noch virale Genexpression, es konnten Gag (p71, p68), Pol und Bel1 nachgewiesen werden. Bei allen Einzelzellklonen wurde das Zeocinresistenzgen Sh ble im Westernblot detektiert.

Die Einzelzellklone aus der Transfektion mit den chimären Viruskonstrukten waren nicht infektiös. Diese Klone standen nicht unter einem Selektionsdruck gegen infektiöse virale Genome, da sie schon bei transienter Transfektion nicht infektiös waren. Trotzdem war keine virale Genexpression der Zellkolonien, welche mit dem rekombinanten Plasmid mit der chimären Integrase transfiziert wurden, mehr nachzuweisen. Teilweise virale Genexpression zeigten die Einzelzellklone, die mit dem HTLV-1-Integrase-Konstrukt transfiziert worden waren. Obwohl nur von einem der Zellklone Bel1 exprimiert wurde, konnte bei vier von fünf Zellklonen das Pol-Vorläuferprotein und bei zwei die Gag-p71-Bande im Westernblot detektiert werden. Bel1 war hier für die virale Genexpression nicht mehr notwendig. Möglich wäre, daß ein zellulärer Promotor, der durch die Integration in der Nachbarschaft der rekombinanten Plasmide lag, die Aktivierung der Pol- und Gag-Expression übernommen hatte.

Alle Einzelzellklone wurden im Southernblot untersucht, um integrierte virale DNA zu detektieren. Bei der Analyse der mit wt-Zeocin stabil transfizierten Zellen wurden

distinkte Banden gefunden, die bei einem Vergleich mit Plasmid-DNA eindeutig auf ein Integrationsereignis hinwiesen. Die eingesetzte LTR-Sonde wies jedoch nicht immer beide LTR nach, was durch den Vergleich mit einer Zeocin-Sonde deutlich wurde, die pro integriertem viralem Genom nur eine Bande detektieren soll, die LTR-Sonde jedoch zwei. Anhand der Banden konnte außerdem die Anzahl der integrierten proviralen Genome bestimmt werden. In der Detektion mit der Zeocin-Sonde stellt theoretisch jede Bande ein Integrationsereignis dar. Diese Analyse ergab fünf bis acht Integrationsereignisse pro Einzelzellklon. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Arbeiten überein, die eine bis zehn bzw. bis zu 20 provirale integrierte HFV Genome in stabilen Einzelzellklonen von 293T-Zellen bzw. humane Erythroleukemia-Zellen detektieren konnten (Meiering et al. 2000, Heinkelein et al. 2000). Einzig bei dem Zellklon, der weiterhin infektiöse Viruspartikel produzierte, waren die Banden nicht klar getrennt, sondern etwas verwischt. Durch neue Integrationsereignisse veränderte sich das Genom dieser Zellen ständig weiter, sie waren daher untereinander nicht mehr identisch, wie es bei den anderen Zellklonen der Fall war, und die Anzahl der Integrationsereignisse war nicht mehr bestimmbar. Drei der Zellklone aus der Transfektion mit den chimären Viruskonstrukten zeigten im Northernblot ein Bandenmuster, welches auf Rekombination statt Integration schließen ließ. Mit der LTR-Sonde wurden Banden sichtbar, die mit der Plasmid-Kontroll-DNA identisch waren. Bei einer Integration hätten diese Fragmente jedoch aufgrund der zellulären flankierenden DNA größer sein müssen, oder sie hätten aufgrund des nach erfolgter Integration fehlenden Vektorelementes (pAT153) schneller als die Plasmid-DNA-Bande laufen müssen. Interessant war, daß gerade diese drei Klone im Westernblot noch rudimentäre virale Genexpression zeigten. Die anderen Zellklone waren zwar im Bandenmuster nicht identisch mit dem Kontrollplasmid, zeigten aber wenige, in ihrer Intensität sehr unterschiedliche Banden, was bei Klonen mit identischem Genom nicht der Fall sein sollte. Es sei denn, die mit der Sonde hybridisierende Region wäre nur teilweise vorhanden, was auch wieder auf Rekombination anstelle der Integration hinweisen würde. Wenn hier Integration erfolgt wäre, dann nur ein bis zwei Integrationsereignisse pro Zellklon, wie aus der Anzahl der Banden zu ersehen war.



## 5. Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war der Austausch der retroviralen Integrase von HSRV gegen die Integrase von HTLV-1. Mit diesem Austausch sollte eine Steigerung der Integrationsrate von HSRV erreicht werden, um ihn als Vektor für die Gentherapie zu optimieren.

Zunächst wurde dazu die HTLV-1-Integrase im Austausch gegen die HSRV-Integrase in HSRV eingebracht. Dieses rekombinante Plasmid war jedoch replikationsdefizient und hatte nach der Transfektion in eukaryote Zellen keinen Virustiter. Dies führte zu der Überlegung, auch die für die Erkennung des Virus durch die Integrase wichtigen ersten 15 Nukleotide der LTR-Enden von HSRV an die Sequenz von HTLV-1 anzugleichen. Da auch der daraus resultierende Klon keine Infektiosität aufwies, konnte die Replikationsdefizienz eventuell weitreichendere Gründe haben als eine reine Integrationsdefizienz. Ein cis-Element am C-Terminus der HSRV-Integrase welches zur Stabilisierung und Verpackung der RNA in Partikel wichtige Funktionen hat, wurde daher in dem Klon mit der HTLV-1-Integrase regeneriert. Dazu wurde eine chimäre Integrase bestehend aus dem N-terminalen und dem Mittelteil der HTLV-1-Integrase mit dem C-terminalen Teil der HSRV-Integrase fusioniert und in das HSRV Provirus mit und ohne die HTLV-1-LTR-Enden eingebracht. Da diese Klone ebenfalls nichtinfektios waren, sollte Expressionsanalyse der rekombinanten Plasmide zur Klärung der Ursache ihrer Replikationsdefizienz beitragen. Als Kontrollen dienten dabei ein HSRV-Klon ohne Integrase, ein HSRV-Klon mit wiedereingeführter HSRV-Integrase und ein Konstrukt mit den HTLV-1-LTR-Enden aber mit der HSRV-Integrase.

Die Untersuchung der chimären Klone ergab, daß virale genomische RNA zumindest kurze Zeit nach der Transfektion in den Zellen vorhanden war, aber eventuell nicht in Viruspartikel verpackt wurde, da vor der HTLV-1-Integrase ein weiteres ca. 114 Nt langes cis-Element fehlte. Dieses fehlende cis-Element war möglicherweise auch die Ursache für eine gestörte Gag-Prozessierung der Klone in 293T-Zellen. Da Gag-Prozessierung für den Zusammenbau intakter Viruspartikel essentiell ist, konnte hier ein Grund für die Replikationsdefizienz der chimären Klone liegen. Alle weiteren viralen Proteine wurden von den chimären Klonen exprimiert und normal prozessiert.

Die virale Protease war also enzymatisch aktiv. Weiterhin wurde die korrekte Aktivität der reversen Transkriptase nachgewiesen.

Durch eine Kotransfektion der chimären Plasmide mit dem HTLV-1-Gag-Protein sollte das im Preintegrationskomplex vorkommende Gag-Protein für die  $\emptyset$ TLV-1-Integrase ersetzt werden. Auch dieser Versuchsansatz erwies sich als ungeeignet, die Integration bzw. Replikation der chimären Klone zu verbessern.

Durch die Einklonierung eines Resistenzgens in die viralen Klone sollten Zellen mit integrierter viraler DNA gezielt selektioniert werden. Das Resistenzgen wurde in drei der viralen Konstrukte eingebracht, in wt-pHSRV13, in den Klon mit den HTLV-1-LTR-Enden und der HTLV-1-Integrase sowie in das virale Plasmid mit den HTLV-1-LTR-Enden und der chimären Integrase. Nach der Einzelzellselektion der mit wt-Zeocin transfizierten BHK-Zellen hatte von sechs Klonen nur einer einen geringen Virustiter, dieser exprimierte als einziger virale Gene. Durch Southernblotanalyse dieser Einzelzellklone konnte die Anzahl der Integrate auf fünf bis acht pro Einzelzellklon ermittelt werden. Die Einzelzellklone aus der Transfektion mit den rekombinanten Klonen besaßen keine Infektiosität. Die Expression der viralen Gene war bei den Einzelzellklonen aus der Transfektion des Klons mit den HTLV-1-LTR-Enden und der HTLV-1-Integrase nachweisbar.

## 6. Literatur

- Achong, G., P. W. A. Mansell, M. A. Epstein, and Clifford, P.** 1971  
An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma,  
J. Natl. Cancer Inst. 42, 299-307
- Aguzzi A, Bothe K, Anhauser I, Horak I, Rethwilm A, Wagner EF.** 1992  
Expression of human foamy virus is differentially regulated during development in transgenic mice.  
New Biol. 4, 225-37
- Alke, A., A. Schwantes, M. Zemba, R. M. Flügel, and M. Löchelt** 2000  
Characterization of the humoral immune response and virus replication in cats experimentally  
infected with Feline Foamy Virus.  
Virology **275**, 170-176
- Andrake MD, Skalka AM** 1996  
Retroviral integrase, putting the pieces together.  
J Biol Chem 271, 19633-6
- Andrake MD, Skalka AM** 1995  
Multimerization determinants reside in both the catalytic core and C terminus of avian sarcoma virus  
integrase.  
J Biol Chem 270, 29299-306
- Asante-Appiah E, Skalka AM** 1997  
Molecular mechanisms in retrovirus DNA integration.  
Antiviral Res. 36, 139-56. Review.
- Baldwin DN, Linial ML** 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, 6387-93
- Baunach, G; Maurer, B; Hahn, H; Kranz, M; Rethwilm, A** 1993  
Functional Analysis of Human Foamy Virus Accessory Reading Frames  
J. of Virol. 67, 5411-5418
- Berger N, Heller AE, Stormann KD, Pfaff E.** 2001  
Characterization of chimeric enzymes between caprine arthritis-encephalitis virus, maedi-visna virus  
and human immunodeficiency virus type 1 integrases expressed in Escherichia coli.  
J Gen Virol. 82, 139-48
- Berkowitz R, Fisher J, Goff SP** 1996  
RNA packaging.  
Curr Top Microbiol Immunol 214, 177-218 Review.
- Bodem J, Lochelt M, Winkler I, Flower RP, Delius H, Flügel RM.** 1996  
Characterization of the spliced pol transcript of feline foamy virus: the splice acceptor site of the pol  
transcript is located in gag of foamy viruses.  
J Virol. 70, 9024-7
- Bothe K, Aguzzi A, Lassmann H, Rethwilm A, Horak I** 1991  
Progressive encephalopathy and myopathy in transgenic mice expressing human foamy virus genes.  
Science 2; 555-7
- Brin E, Yi J, Skalka AM, Leis J** 2000  
Modeling the late steps in HIV-1 retroviral integrase-catalyzed DNA integration.  
J Biol Chem 275, 39287-95

**Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM** 1989

Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein.

Proc Natl Acad Sci U S A 86, 2525-9

**Burke CJ, Sanyal G, Bruner MW, Ryan JA, LaFemina RL, Robbins HL, Zeft AS, Middaugh CR, Cordingley MG** 1992

Structural implications of spectroscopic characterization of a putative zinc finger peptide from HIV-1 integrase.

Biol Chem 267, 9639-44

**Bushman FD, Engelman A, Palmer I, Wingfield P, Craigie R** 1993

Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding.

Proc Natl Acad Sci U S A 90, 3428-32

**Callahan, M. E., W. M. Switzer, A. L. Matthews, B. D. Roberts, W. Heneine, T. M. Folks, and P. A. Sandstrom.** 1999

Persistent zoonotic infection of a human with simian foamy virus in the absence of an intact orf-2 accessory gene

J Virol. **73**, 9619-24

**Cannon PM, Byles ED, Kingsman SM, Kingsman AJ** 1996

Conserved sequences in the carboxyl terminus of integrase that are essential for human immunodeficiency virus type 1 replication.

J Virol 70, 651-7

**Carteau S, Gorelick RJ, Bushman FD** 1999

Coupled integration of human immunodeficiency virus type 1 cDNA ends by purified integrase in vitro: stimulation by the viral nucleocapsid protein.

J Virol. 73, 6670-9

**Chomczynski P. and Sacchi N.** 1987

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal. Biochem. 162, 156-159

**Chow, S.A.** 1997

In vitro assays for retroviral integrase

A Companion Met. Enz. 12, 306-317

**Chow, S. A; Vincent, K. A; Ellison, V; Browen, P. O** 1992

Reversal of Integration and DNA Splicing Mediated by Integrase of Human Immunodeficiency Virus

Science 255, 723-726

**Depienne C, Roques P, Creminon C, Fritsch L, Casseron R, Dormont D, Dargemont C, Benichou S** 2000

Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses.

Exp Cell Res 260, 387-95

**Derse, D; Mikovits, J; Waters, D; Brining, S; Ruscetti, F** 1996

Examining the Molecular Genetics of HTLV-I with an Infectious Molecular Clone of the Virus and Permissive Cell Culture Systems

J. Aqu. Imm. Def. Synd. 12, 1-5

**Derse, D; Mikovits, J; Pollanova, M; Felber, B. K; Ruscetti, F** 1995

Virions Released from Cells Transfected with a Molecular Clone of Human T-Cell leukemia Virus Type I Give Rise to Primary Secondary Infections of T Cells

J. of Virol. 69, 1907-1912



- Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM, Engelman A, Craigie R, Davies DR** 1994  
Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases.  
*Science* 266, 1981-6
- Eijkelenboom AP, van den Ent FM, Wechselberger R, Plasterk RH, Kaptein R, Boelens R** 2000  
Refined solution structure of the dimeric N-terminal HHCC domain of HIV-2 integrase.  
*J Biomol NMR* 18, 119-28
- Eijkelenboom AP, van den Ent FM, Vos A, Doreleijers JF, Hard K, Tullius TD, Plasterk RH, Kaptein R, Boelens R** 1997  
The solution structure of the amino-terminal HHCC domain of HIV-2 integrase: a three-helix bundle stabilized by zinc.  
*Curr Biol* 7, 739-46
- Engelmann, A; Hickmann, A. B; Craigie, R** 1994  
The Core and Carboxy-Terminal Domains of the Integrase Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Contribute to Nonspecific DNA Binding  
*J. of Virol.* 68, 5911-5917
- Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R** 1991  
HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer.  
*Cell* 67, 1211-21
- Enssle, J; Moebes, A; Heinkelein, M; Panhysen, M; Mauer, B; Schweizer, M; Neumann-Haefelin, D; Rethwilm, A** 1999  
An active foamy virus integrase is required for virus replication  
*J. of General Virol.* 80, 1445-1452
- Erlwein, O; Bieniasz, P. D; McClure M. o**  
Sequences in pol Are Required for Transfer of Human Foamy Virus-Based Vectors  
*J. of Virol.* 72, 5510-5516 1998
- Esposito, D; Craigie, R** 1998  
Sequence specificity of viral end DNA binding by HIV-1 integrase reveals critical regions for protein-DNA interaction  
*The EMBO J.* 17, 5832-5843
- Farnet, C. M; Haseltine, W. A** 1991  
Determination of Viral Proteins Present in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complex  
*J. of Virol.* 665, 1910-1915
- Farnet CM, Bushman FD** 1997  
HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro.  
*Cell* 21, 483-92
- Farnet, C. M; Haseltine, W. A** 1990  
Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4164-4168
- Flügel M. R; Rethwilm, A; Maurer, B; Gholamreza, D** 1987  
Nucleotide sequence analysis of the env gene and its flanking regions of the human spumaretrovirus reveals two novel genes  
*The EMBO J.* 7, 2077-2084
- Fujiwara T, Mizuuchi K** 1988  
Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate.  
*Cell* 54, 497-504

**Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. 1995**

HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase.

Cell. 17, 569-76.

**Ganem D. 1996**

Hepadnaviridae: the viruses and their replication,

p. 2703-2737. *In* B. N. Fields, D. M. Knip P. M. Howley, R. M. Chanock, and J. L. Melnick

(ed.), Fields Virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa..

**Giron ML, de The H, Saib A 1998**

An evolutionarily conserved splice generates a secreted env-Bet fusion protein during human foamy virus infection.

J Virol 72, 4906-10

**Haffar OK, Popov S, Dubrovsky L, Agostini I, Tang H, Pushkarsky T, Nadler SG, Bukrinsky M 2000**

Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex.

J Mol Biol 299, 359-68

**Hansen MS, Bushman FD 1997**

Human immunodeficiency virus type 2 preintegration complexes: activities in vitro and response to inhibitors.

J Virol 71, 3351-6

**Hazuda DJ, Wolfe AL, Hastings JC, Robbins HL, Graham PL, LaFemina RL, Emini EA 1994**

Viral long terminal repeat substrate binding characteristics of the human immunodeficiency virus type 1 integrase.

J Biol Chem 269, 3999-4004

**He F, Blair WS, Fukushima J, Cullen BR 1996**

The human foamy virus Bel-1 transcription factor is a sequence-specific DNA binding protein.

J Virol. 70, 3902-8

**Heinkelein M, Thurow J, Dressler M, Imrich H, Neumann-Haefelin D, McClure MO,****Rethwilm A. 2000**

Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging.

J Virol. 74, 3141-8

**Heinkelein M, Pietschmann T, Jarmy G, Dressler M, Imrich H, Thurow J, Lindemann D, Bock M, Moebes A, Roy J, Herchenroder O, Rethwilm A. 2000**

Efficient intracellular retrotransposition of an exogenous primate retrovirus genome.

EMBO J. 19, 3436-45

**Heinkelein, M; Schmidt, M; Fischer, N; Moebes, A; Lindemann, D; Enssle, J; Rethwilm, A 1998**

Characterisation of a cis-Acting Sequence in the Pol Region Required To Transfer Human Foamy Virus Vectors

J. of Virol. 72, 6307-6314

**Hill, L. C; Bieniasz, P. D; McClure, M 1999**

Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy

Journal of General Virology 80, 2003-2009

**Johnson MS, McClure MA, Feng DF, Gray J, Doolittle RF 1986**

Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes.

Proc Natl Acad Sci U S A 83, 7648-52

- Kahn, E; Mack, J; Katz, R. A; Kulokosky, J; Skalka, A. M** 1990  
Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences  
Nucl. Ac. Res. 19, 851-860
- Katzman M, Sudol M.** 1995  
Mapping domains of retroviral integrase responsible for viral DNA specificity and target site selection by analysis of chimeras between human immunodeficiency virus type 1 and visna virus integrases.  
J Virol. 69, 5687-96.
- Katzman M, Katz RA, Skalka AM, Leis J** 1989  
The avian retroviral integration protein cleaves the terminal sequences of linear viral DNA at the in vivo sites of integration.  
J Virol 63, 5319-27
- Kertayadnya IG, Johnson RH, Abher I, Burgess GW** 1988  
Detection of immunological tolerance to bovine spumavirus (BSV) with evidence for salivary excretion and spread of BSV from the tolerant animal.  
Vet Microbiol. 16, 35-9
- Konvalinka J, Lochelt M, Zentgraf H, Flugel RM, Krausslich HG** 1995  
Active foamy virus proteinase is essential for virus infectivity but not for formation of a Pol polyprotein.  
J Virol 69, 7264-8
- Kondo T, Kono H, Nonaka H, Miyamoto N, Yoshida R, Bando F, Inoue H, Miyoshi I, Hinuma Y, Hanaoka M** 1987  
Risk of adult T-cell leukaemia/lymphoma in HTLV-I carriers.  
Lancet. Jul 18;2(8551):159
- Kulkosky J, Katz RA, Merkel G, Skalka AM** 1995  
Activities and substrate specificity of the evolutionarily conserved central domain of retroviral integrase.  
Virology 20, 448-56
- Kulkosky J, Jones KS, Katz RA, Mack JP, Skalka AM** 1992  
Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases.  
Mol Cell Biol 12, 2331-8
- LaFemina, R. L; Callahan, P. L; Cordingley, M. G** 1991  
Substrate Specificity of Recombinant Human Immunodeficiency Virus Integrase Protein  
J. of Virol. 65, 5624-5630
- Lecellier CH, Saib A** 2000  
Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses.  
Virology 27, 1-8
- Leclercq I, Mortreux F, Cavrois M, Leroy A, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E** 2000  
Host sequences flanking the human T-cell leukemia virus type 1 provirus In vivo.  
J Virol. 74, 2305-12
- Lindemann D, Rethwilm A.** 1998  
Characterization of a human foamy virus 170-kilodalton Env-Bet fusion protein generated by alternative splicing.  
J Virol. 72, 4088-94
- Linial M** 2000  
Why aren't foamy viruses pathogenic?  
Trends Microbiol 8, 284-9

**Linial, M. L.** 1999

Foamy viruses are unconventional retroviruses  
J Virol. **73**, 1747-55

**Li L, Yoder K, Hansen MS, Olvera J, Miller MD, Bushman FD** 2000

Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins.  
J Virol **74**, 10965-74

**Li L, Farnet CM, Anderson WF, Bushman FD.** 1998

Modulation of activity of Moloney murine leukemia virus preintegration complexes by host factors in vitro.  
J Virol. **72**, 125-31

**Löchelt, M., and R. M. Flügel** 1996

The human foamy virus pol gene is expressed as a Pro-Pol polyprotein and not as a Gag-Pol fusion protein  
J Virol. **70**, 1033-40

**Löchelt M., R. M. Flügel** 1995

The molecular biology of human and primate spuma retroviruses, in "The Retroviridae"  
Vol. 4 (J.A. Levy, ed.),pp 239-292 Plenum press New York

**Löchelt, M., W. Muranyi, and R. M. Flügel** 1993

Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter  
Proc Natl Acad Sci U S A. **90**, 7317-21

**Majors JE, Varmus HE.** 1981

Nucleotide sequences at host-proviral junctions for mouse mammary tumour virus.  
Nature. **22**; 253-8

**Masuda, T; Kuroda, M. J; Harada, S** 1998

Specific and Independent Recognition of U3 and U5 att Sites by Human Immunodeficiency Virus type 1 Integrase In Vitro  
J. of Virol. **72**, 8396-8402

**McCord, M; Chiu, R; Vora, A. C; Grandgenett, D. P** 1999

Retrovirus DNA Termini Bound by Integrase Communicate in Trans for Full-Site Integration in Vitro  
Virology **259**, 392-401

**Meiering CD, Comstock KE, Linial ML.** 2000

Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells.  
J Virol. **74**, 1718-26

**Miller MD, Farnet CM, Bushman FD** 1997

Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition.  
J Virol. **71**, 5382-90

**Müller, B; Kräusslich, H.-G** 1999

Characterisation of human T-cell leukemia virus type I integrase expressed in Escherichia Coli  
Eur. J. Biochem. **259**, 79-87

**Moebes A, Enssle J, Bieniasz PD, Heinkelein M, Lindemann D, Bock M, McClure MO, Rethwilm A.** 1997

Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle.  
J Virol. **71**, 7305-11

**Muranyi, W., and R. M. Flügel.** 1991

Analysis of splicing patterns of human spumaretrovirus by polymerase chain reaction reveals complex RNA structures  
J Virol. **65**, 727-35

**Neumann-Haefelin, D., U. Fleps, R. Renne, and M. Schweizer.** 1993

Foamy viruses  
Intervirology. 35, 196-207

**Neves, M; Pèriès, J; Saïb, A** 1998

Study of human foamy virus proviral integration in chronically infected murine cells  
Res. Virol. **149**, 393-401

**Pahl A, Flugel RM** 1995

Characterization of the human spuma retrovirus integrase by site-directed mutagenesis, by complementation analysis, and by swapping the zinc finger domain of HIV-1.  
J Biol Chem 270, 2957-66

**Pahl, A; Flügel, R** 1993

Endonucleolytic Cleavages and DNA-Joining Activities of the Integration Protein of Human Foamy Virus  
J. of Virol. 67, 5426-5434

**Pauza CD, Trivedi P, McKechnie TS, Richman DD, Graziano FM** 1994

2-LTR circular viral DNA as a marker for human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo.  
Virology. 205, 470-8

**Pfrepper KI, Lochelt M, Rackwitz HR, Schnolzer M, Heid H,Flugel RM** 1999

Molecular characterization of proteolytic processing of the Gag proteins of human spumavirus.  
J Virol. 73, 7907-11

**Pfrepper, K; Rackwitz, H; Heid,H; Löchelt, M; Schnölzer, M; Flügel, R** 1998

Molecular Characterisation of Proteolytic Processing of the Pol Proteins of Human Foamy Virus Reveals Novel Features of the Viral Protease  
J. of Virol. 72, 7648-7652

**Pfrepper, K; Löchelt, M; Schnölzer, M; Flügel, R** 1997

Expressin and Molecular Characterisation of an Enzymatically Active Recombinant Human Spumaretrovirus Protease  
Biochem. a. Biophys. Res. Com. 237, 548-553

**Pietschmann, T; Heinkelein, M; Heldmann, M; Zentgraf,H.-W; Rethwilm, A; Lindemann, D** 1999

Foamy Virus Capsids Requre the Cognate Envelope Protein for Particle Export  
J. of Virol. 73, 2613-2621

**Poiesz, B.J; Ruscetti, F. W; Gazdar, A. F; Bunn, P. A; Minna, J. D; 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  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7415-7419

**Popov S, Rexach M, Ratner L, Blobel G, Bukrinsky M** 1998

Viral protein R regulates docking of the HIV-1preintegration complex to the nuclear pore complex.  
J Biol Chem. 273, 13347-52

**Roth MJ, Schwartzberg PL, Goff SP** 1989

Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: depends on IN function and terminal DNA sequence.  
Cell 58, 47-54

**Russell, D. W., and A. D. Miller.** 1996

Foamy virus vectors  
J Virol. **70**, 217-22

**Saib A, Neves M, Giron ML, Guillemin MC, Valla J, Peries J, Canivet M** 1997

Long-term persistent infection of domestic rabbits by the human foamy virus.  
Virology 17; 263-8.

- Sherman MP, de Noronha CM, Heusch MI, Greene S, Greene WC.** 2001  
Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr.  
J Virol. 75, 1522-32
- Schliephake AW, Rethwilm A.** 1994  
Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein.  
J Virol. 68, 4946-54
- Schmidt, M; Rethwilm, A** 1995  
Replicating Foamy Virus-Based Vectors Directing High Level Expression of Foreign Genes  
Virology 210, 167-178
- Schweizer, M; Fleps, U; Jäckle, A; Renne, R; Turek, R; Neumann-Haefelin, D** 1993  
Simian Foamy Virus Type 3 (SFV-3) in Latently Infected Vero Cells: Reactivation by Demethylation of Proviral DNA  
Virology 192, 663-666
- Tobaly-Tapiero, J., P. Bittoun, M. Neves, M. C. Guillemin, C. H. Lecellier, F. Puvion-Dutilleul, B. Gicquel, S. Zientara, M. L. Giron, H. de The, and A. Saib.** 2000  
Isolation and characterization of an equine foamy virus  
J Virol. 74, 4064-73
- Trentin B, Rebeyrotte N, Mamoun RZ.** 1998  
Human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase (RT) originates from the pro and pol open reading frames and requires the presence of RT-RNase H (RH) and RT-RH-integrase proteins for its activity.  
J Virol. 72, 6504-10
- Trobridge, G. D; Russel, D. W** 1998  
Helper-Free Foamy Virus Vectors  
9, 2517-2525
- Vink C, Oude Groeneger AM, Plasterk RH** 1993  
Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type I integrase protein.  
Nucleic Acids Res 21, 1419-25
- Wagner, A., A. Doerks, M. Aboud, A. Alonso, T. Tokino, R. M. Flugel, and M. Lochelt.** 2000  
Induction of cellular genes is mediated by the Bel1 transactivator in foamy virus-infected human cells  
J Virol. 74, 4441-7
- Wang G, Mulligan MJ** 1999  
Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of foamy viruses.  
J Gen Virol. 80, 245-54
- Wilk, T., F. de Haas, A. Wagner, T. Rutten, S. Fuller, R. M. Flugel, and M. Lochelt.** 2000  
The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer  
J Virol. 74, 2885-7
- Winkler, I; Bodem, J; Haas, L; Zemba, M; Delius, H; Flower, R; Flügel, R; Löchelt, M** 1997  
Characterisation of the Genom of Feline Foamy Virus and its Proteins Shows Distinct Features Different from Those of Primate Spumaviruses  
J. of Virol. 71, 6727-6741
- Yang Z.-N., Mueser T.C., Bushmann F. D., Hyde C.C.** 2000  
Crystal Structure of an active Two-domain Derivative of Rous Sarcoma Virus Integrase  
J. Mol. Biol. 296, 535-548

**Yu, SF; Sullivan, M; Linial, M. L** 1999

Evidence that the Human Foamy Virus Genome is DNA  
J. of Virol. 73, 1565-1572

**Yu, S. F., D. N. Baldwin, S. R. Gwynn, S. Yendapalli, and M. L. Linial.** 1996

Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses  
Science. **271**, 1579-82

**Yu SF, Linial ML.** 1993

Analysis of the role of the bel and bet open reading frames of human foamy virus by using a new quantitative assay.

J Virol. **67**, 6618-24

**Zemba, M; Wilk, T; Rutten, T; Wagner, A; Flügel, R; löchelt, M** 1998

The Carboxy-Terminal p3<sup>Gag</sup> Domain of the Human Foamy Virus Gag Precursor Is Required for Efficient Virus Infectivity

Virology 247, 7-13

**Zheng R, Jenkins TM, Craigie R** 1996

Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity.

Proc Natl Acad Sci U S A 93, 13659-64





## 7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ASV	Aviärer Sarkom-Virus
ATL	adulte T-Zell-Leukämie
BHK	"Baby hamster kidney" (Babyhamster-Nieren)-Zellen
BLV	Rinderleukosevirus
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin = Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CA	Kapsidprotein p24 (von HIV-1)
Da	Dalton
d.h.	das heißt
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemoluminescence western blot
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Env	Virales Hüllprotein
EtBr	Ethidiumbromid
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
FAB	„foamy“virus aktivierte $\beta$ -Galaktosidaseexpression
FCS	Fötale Kälberserum
Gag	„Gruppenspezifisches Antigen“
HAM	HTLV-1-assoziierte Myelopathie
HFV	"human foamy virus" (humanes Spumaretrovirus)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSRV	humanes Spumaretrovirus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämievirus
IN	Integrase
IU/ml	Infektiöse Einheiten pro Milliliter (Kulturüberstand)
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Broth
LTR	long terminal repeat
MA	Matrix Protein

MW	Molekulargewicht
mRNA	„messenger RNA“ (Boten-Ribonukleinsäure)
NC	Nukleokapsidprotein
NLS	Nukleäres-Lokalisations Signal
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline
pol	Polymerase-Gen
p.i.	post infectionem = nach Infektion
poly(A)+	polyadenyliert
PR	Protease
p.t.	post transfectionem = nach Transfektion
RIPA	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SB	sample buffer = Probenpuffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SU	<u>surface</u> domain = Oberflächen-Domäne
Tab.	Tabelle
Tax	Transaktivator der Transkription
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	<u>T</u> rans <u>m</u> embran-Domäne
tr	trunkiert
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSP	tropische spastische Paraparese
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
Vpr	Virion assoziiertes Protein R
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis
wt	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZKÜ	Zellkulturüberstand (-überstände)



## 8. Induktion des humanen p57<sup>Kip2</sup>-Gens durch den spumaviralen Transaktivator Bel1 und den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1

### Zusammenfassung

Ein Nebenprojekt während der vorliegenden Arbeit war, aufbauend auf der Doktorarbeit von Andrea Wagner die Untersuchung der Induktion des humanen p57<sup>Kip2</sup> Gens durch den spumaviralen Transaktivator Bel1 und durch den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1. Mit Hilfe eines cDNA-Arrays, (durchgeführt von Frau Wagner) wurden die Expressionsprofile zellulärer Gene in HSRV- und Scheininfizierten Zellen analysiert. Dabei war unter anderem die Expression von p57<sup>Kip2</sup> in HSRV infizierten Zellen signifikant erhöht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte nun die Expression von p57<sup>Kip2</sup> nach Transfektion mit Bel1, Bet, und Sp1 Expressionsplasmiden in humanen 293T-Zellen untersucht werden. Außerdem sollte ein Kip2 Expressionsplasmid mit dem originären *kip2* Promotor kotransfiziert werden. Es wurde bestätigt, daß die Expression von p57<sup>Kip2</sup> durch Bel1 induziert wird und durch die Kotransfektion von Bel1 und Sp1 noch weiter gesteigert wird. Die Transfektion eines Bet-Expressionsplasmides verringerte dagegen die Expression von Kip2. Wurden Bet und Bel1 kotransfiziert, dann erfolgte eine sehr viel geringere p57<sup>Kip2</sup> Expression als bei einer Transfektion mit Bel1 allein.

### Einleitung

Es ist bekannt, daß retrovirale Infektionen die zelluläre Genexpression beeinflussen können. Dadurch wird der Zellstoffwechsel günstig an die Bedürfnisse des Virus angepaßt. HTLV-1 exprimiert das Tax-Protein, das zum onkogenen Charakter von HTLV-1 beiträgt, indem es die Expression zellulärer Transkriptionsfaktoren stimuliert, die die Zelle zur Teilung anregen. Außerdem hemmt Tax unter anderem p53-induzierte apoptotische Vorgänge und interagiert mit verschiedenen Zellzyklusproteinen.

Über den Transaktivator von HSRV Bel1 war bisher nicht bekannt, ob er die Expression zellulärer Gene transaktiviert. Mit der Arbeit von Frau Wagner gelang der Nachweis, daß Bel1 unter anderem p57<sup>Kip2</sup> transaktiviert. Das Protein p57<sup>Kip2</sup> gehört zu der Gruppe von Zellzyklusinhibitoren, der auch p21 WAF1 und p27<sup>Kip1</sup> angehören. Das humane *kip2*-Gen enthält einen Promotor mit 37 Sp1-Bindungsstellen, vier Exons

und ist auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert. Diese Chromosomenregion zeichnet sich durch die Expression der Gene vorzugsweise von einem Allel aus (genetisches Imprinting). Ein Verlust dieser Eigenschaft wird mit der Entstehung von Wilms` Tumoren und dem Beckwith-Wiedemann Syndrom in Verbindung gebracht.

Die Expression von Kip2 ist gewebespezifisch. In Plazenta- und verschiedenen anderen Geweben wurde ein 1,5 kb großes *kip2*-Transkript nachgewiesen, während in Skelett-Muskeln und Herz ein 7 kb Transkript zu finden war. Das resultierende Protein p57<sup>Kip2</sup> ist im Zellkern lokalisiert, wo es als stark bindender Inhibitor verschiedener G1-Zyclin/cdk-Komplexe den Übergang der Zellen von G1 zur Synthesephase hemmt. Die Überexpression von p57<sup>Kip2</sup> hat den Arrest in G1 und somit einen Stop der Proliferation der Zellen zur Folge.

### Ergebnisse

Um die Überexpression von Kip2, ausgelöst durch Bel1, näher zu charakterisieren wurden Bel1- und Bet-Expressionsplasmide in 293T-Zellen transfiziert. Das Plasmid **pBCbel** exprimierte Bel1 und Bet, das Plasmid **pbel1s** exprimierte nur Bel1 und das Plasmid **pBCbet** nur Bet. Teilweise wurde zusätzlich ein Kip2-Expressionsplasmid **pKip2** oder **pUC18** kotransfiziert. Insgesamt wurden in jede Transfektion 10µg DNA eingesetzt, 5µg **pUC18** oder **pKip2** und 5µg **pBCbel**, **pbel1s** oder **pBCbet**. Die 293T-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion geerntet und im Westernblot mit anschließender ECL-Detektion analysiert (Abb.1).

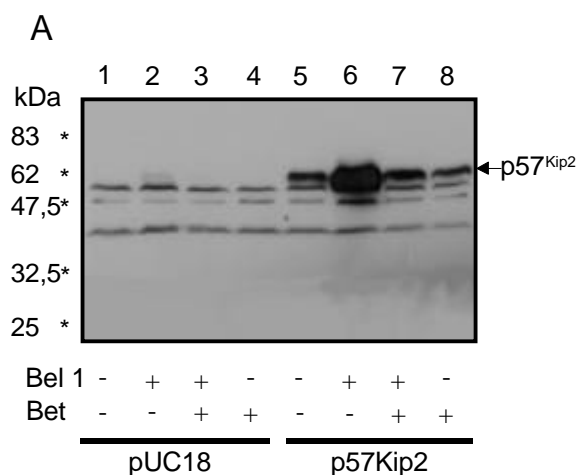


Abb.1:  
Immunoblotanalyse nach Kotransfektionen von **pKip2** mit **pBCbel**, **pbel1s** und **pBCbet** sowie **pUC18** mit **pBCbel**, **pbel1s** und **pBCbet**. Es wurden 293T-Zellen für die Transfektionen verwendet. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion geerntet und im Westernblot analysiert. Die Detektion von Kip2 erfolgte mit einem monoklonalen Kip2 spezifischen Antiserum.

In Abb. 1 in Spur 2 und 6 ist zu erkennen, daß sowohl das endogen in der Zelle vorhandene Kip2, als auch das vom Plasmid **pKip2** exprimierte Kip2 durch Bel1 überexprimiert wird. Ohne Bel1 ist die Menge an endogenem Kip2 so gering, daß sie sich im Westernblot nicht nachweisen läßt (Abb. 1, Spur 1 u. 4). Wurden das Bel1- und Bet-Expressionsplasmid kotransfiziert, dann kam es zu keiner Steigerung der Expression von Kip2 (Spur 3 und 7). Eine Kotransfektion mit Bet allein verringerte den Basalwert von **pKip2** (Spur 5) allerdings nicht mehr stark.

Um herauszufinden wie stark Bet die Überexpression von Kip2 durch Bel1 inhibiert, wurde **pBCbet** in unterschiedlichen Konzentrationen mit **pbel1s** und **pKip2** kotransfiziert (Abb. 2). Pro Transfektion wurden 2 µg **pKip2**-DNA eingesetzt. Das Plasmid **pbel1s** wurde mit je 4µg transfiziert (s. Spur 3-8) und **pBCbet** je 4µg DNA (s. Spur 2 und 3), 2µg-DNA (Spur 5), 1µg DNA (Spur 6), 0,5 µg DNA (Spur 7) und 0,1µg DNA (Spur 8) (s. Abb. 2). Es ist deutlich zu erkennen, daß mit Zunahme der Expression von Bet die Kip2 Expression abnimmt, wobei hier erstmals auch eine deutliche Abnahme der Basalexpression von Kip2 durch die Kotransfektion mit **pBCbet** zu erkennen war (Spur 2).

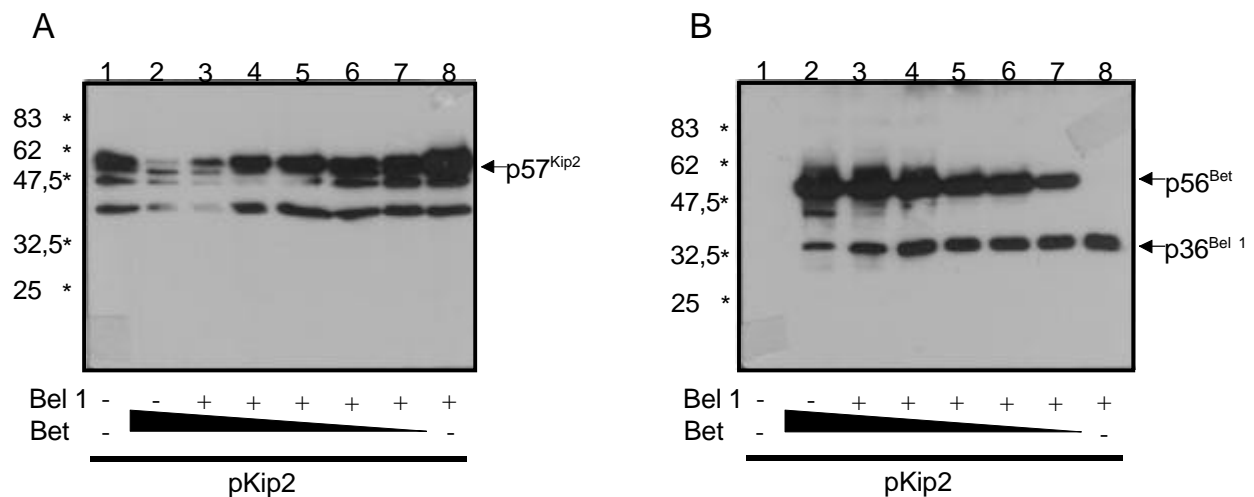


Abb. 2:

Immunoblotanalyse nach Kotransfektionen von **pbel1s** (in konstanter Konzentration) und **pBCbet**, wobei **pBCbet** in unterschiedlichen Konzentrationen transfiziert wurde. Bei allen Transfektionen wurde zusätzlich **pKip2** in konstanter Konzentration dazu transfiziert. Es wurden 293T-Zellen für die Transfektionen verwendet. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion geerntet und im Westernblot analysiert. Die Detektion von Kip2 erfolgte mit einem monoklonalen Kip2 spezifischen Antiserum (A), die Detektion von Bel1 und Bet erfolgte mit einem Bel1/Bet spezifischen Antiserum (B).

Da im Promotor von *kip2* mehrere Sp1-Bindungsstellen vorhanden sind, sollte untersucht werden, ob Sp1 bei der Überexpression von Kip2 durch Bel1 eine Rolle spielt.

Zu diesem Zweck wurde ein Sp1-Expressionsplasmid (**pSp1**) in die folgenden Transfektionen eingesetzt (Abb.3). Es wurden jeweils 2 µg **pKip2**-DNA mit je 4 µg **pBCbet**, **pbel1s** und/oder **pSp1** in 293T-Zellen transfiziert (s. Abb. 3). Die Zellen wurden wieder zwei Tage nach der Transfektion geerntet und im Westernblot analysiert. Die Kotransfektion von **pKip2** mit **pbel1s** zeigte erwartungsgemäß eine verstärkte Kip2-Expression (Spur 2). In der Kotransfektion mit **pBCbet** (Spur 3) bzw. **pSp1** (Spur 4) alleine ging die Kip2-Expression leicht unter den Basalwert zurück. Wurden jedoch Bel1 und Sp1 koexprimiert (Spur 5), dann stieg die Kip2-Expression sogar noch über den Wert der Kotransfektion mit **pbel1s** allein. Unter diesen Bedingungen ist Sp1 also in der Lage die Kip2 Expression mit Bel1 zusammen noch weiter zu steigern.

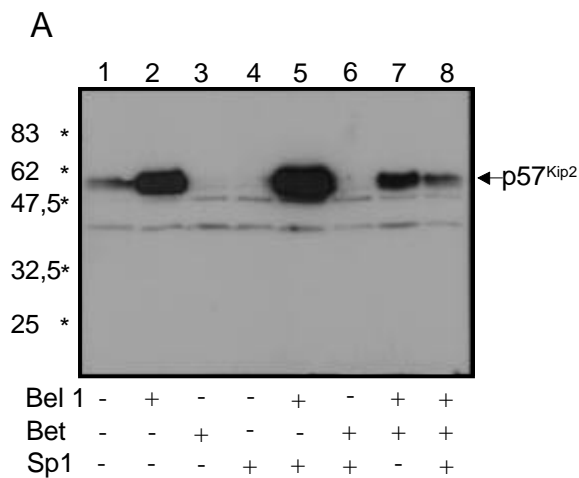


Abb.3:

Die Abb. zeigt eine Kotransfektionen von **pbel1s** und/oder **pBCbet** und/oder **pSp1**. Bei allen Transfektionen wurde zusätzlich **pKip2** dazu transfiziert. Es wurden 293T-Zellen für die Transfektionen verwendet. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion geerntet und im Westernblot analysiert. Die Detektion von Kip2 erfolgte mit einem monoklonalen Kip2 spezifischen Antiserum.

Um die Stärke der Überexpression von Kip2, ausgelöst durch Bel1 und Sp1+Bel1, abschätzen zu können, wurden die Gesamtproteinextrakte aus Abb. 3, Spur 1, 2 und 5 in unterschiedlichen Mengen elektrophoretisch im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Westernblot untersucht.

Spur	Aufgetragene Proteinemenge der Transfektionen		
	pKip2	pKip2 / pbel1s	pKip2 / pbel1s / pSp1
1	30 µg		
2		10 µg	
3		5 µg	
4		2,5 µg	
5		1,25 µg	
6			10 µg
7			5 µg
8			2,5 µg
9			1,25 µg
10			0,5 µg
11			0,25 µg
12			0,1 µg

Tabelle 1:

Tabelle 1 zeigt die Menge an aufgetragenem Gesamtprotein aus drei vorangegangenen Transfektionen in µg.

Eine grobe Abschätzung der detektierten Menge von Kip2-Protein zeigte eine ca. 15fache Erhöhung der Kip2 Expression durch Bel1 und eine ca. 60fache Erhöhung durch Bel1+Sp1 (Tabelle1, Abb 4).

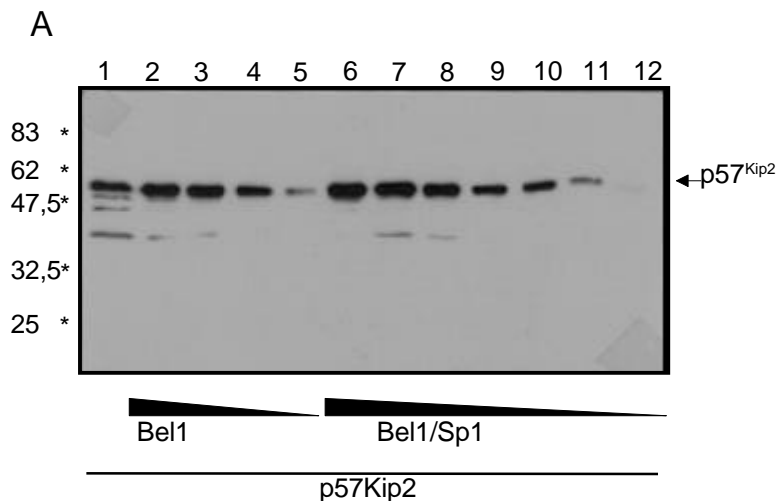


Abb. 4:

Immunoblotanalyse nach Kotransfektionen von **pbel1s** und **pbel1s + pSp1**, in unterschiedlichen Konzentrationen. Bei allen Transfektionen wurde zusätzlich **pKip2**-DNA in konstanter Konzentration dazu transfiziert. Es wurden 293T-Zellen für die Transfektionen verwendet. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion geerntet und im Westernblot analysiert. Die Detektion von Kip2 erfolgte mit einem monoklonalen Kip2-spezifischen Antiserum.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen machten deutlich, daß die Kip2-Expression von Plasmid **pKip2** durch Bel1 um ca. das 15fache gesteigert wurde, durch Bel1 + Sp1 konnte die Expression von Kip2 sogar auf das bis zu 60fache gesteigert werden. Auch das endogene Kip2 wurde durch Bel1 induziert.

Das Bet-Protein dagegen inhibierte sowohl die zelluläre Kip2-Expression als auch die Kip2-Expression von Plasmid **pKip2**.

## Diskussion



Durch die Arbeit von Frau Wager und weiterführend durch die oben beschriebenen Experimente wurde gezeigt, daß eine HSRV-Infektion die zelluläre Genexpression beeinflusst. Es wurde deutlich, daß Bel1 für die Induktion des zellulären Gens *kip2* verantwortlich war. Diese Stimulation ist physiologisch, da eine Infektion der Zellen mit HSRV ausreichte, um die zur Überexpression von Kip2 benötigte Bel1-Menge zur Verfügung zu stellen. Über welchen Mechanismus Bel1 die Expression von Kip2 induziert, ist noch nicht ganz geklärt. Weiterführende Experimente legen aber den Schluß nahe, daß eine Bel1-Bindungsstelle, welche sich nicht im *kip2*-Promotor sondern im *kip2*-Gen selbst befindet, diese Stimulation durch Bel1 ermöglicht.

Eine zusätzlich Induktion von Kip2 wurde durch die Koexpression von Sp1 und Bel1 ausgelöst. Sp1 wird endogen in 293T-Zellen exprimiert. Eine Überexpression von Sp1 allein, durch die Transfektion mit **pSp1**, führte zu keiner Induktion von Kip2, obwohl sich im Promotor von Kip2 bis zu 37 Sp1-Bindungsstellen befinden. Erst durch die Koexpression von Sp1 und Bel1 wurde die Transaktivierung von Kip2 durch Bel1 weiter verstärkt. Wie die Interaktion von Bel1 mit Sp1 konkret aussieht, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Auch die Frage, ob die Transaktivierung von Kip2 durch Bel1 auch in einem Sp1 freien zellulären System funktioniert, ist interessant, konnte aber bislang noch nicht beantwortet werden. Es ist demnach nicht sicher, ob Sp1 die Induktion der Expression von Kip2 durch Bel1 nur steigert, oder ob es sie überhaupt erst ermöglicht.

Das Protein p57<sup>Kip2</sup> ist ein Zellzyklusinhibitor, der durch die Inhibierung verschiedener Zyklin/cdKinase-Komplexe den Übergang der Zellen von der G1 zur Synthesephase hemmt und somit einen Stop der Proliferation der Zellen zur Folge hat. Die verstärkte Wachstumskontrolle in HFV- infizierten Zellen durch die Induktion von Kip2 wäre daher eine mögliche Erklärung für den nichtonkogenen Charakter einer HFV-Infektion.

Das Bet-Protein hatte einen repressiven Effekt auf die basale und die von Bel1 induzierte Expression von Kip2. Der Mechanismus, durch den HSRV-Bet in die Expression von Kip2 eingreift, ist allerdings noch völlig unklar. Denkbar wären Interaktionen von Bet mit Bel1 oder Sp1 sowie eine direkte Bindung von Bet an die Promotorregion von *kip2*. Auch eine Interaktion von Bet mit der *kip2*-mRNA kann nicht ausgeschlossen werden.

Aus dieser Zusammenarbeit entstand folgende Publikation:

**Wagner, A., A. Doerks, M. Aboud, A. Alonso, T. Tokino, R. M. Flügel, and M. Löchelt.** 2000  
Induction of cellular genes is mediated by the Bel1 transactivator in foamy virus-infected human cells  
J Virol. **74**, 4441-7

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Anja Doerks geb. Schager  
Anschrift: Marktstr. 47  
69123 Heidelberg  
Geburtsdatum: 30. 3. 1973  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

---

### Schulbildung / Studium

1979-1983 Anne Frank-Grundschule in Offenbach  
1983-1985 Geschwister Scholl-Schule in Offenbach  
1985-1992 Leibniz-Gymnasium in Offenbach  
Juni 1992 Abitur

10/1992-09/1994 Grundstudium der Biologie an der Johann Wolfgang  
Goethe-Universität Frankfurt a. M.

10/1994-09/1996 Hauptstudium der Biologie an der Johann Wolfgang  
Goethe-Universität Frankfurt a. M.  
Hauptfächer: Zoologie und Botanik,  
Nebenfach: Pharmazeutische Biologie

03/1997-03/1998 Diplomprüfungen und Erstellung der Diplomarbeit mit dem Thema:  
"Zellbiologische Analysen zur 5'-Nukleotidase" unter Betreuung von  
Prof. Dr. H. Zimmermann im Fachbereich Zoologie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Mai 1998 Beginn einer Promotionsarbeit am Deutschen  
Krebsforschungszentrum in Heidelberg mit dem Thema:  
"Molekulare Klonierung und Expression retroviraler, chimärer  
Integrasen im proviralen Kontext des humanen Spumaretrovirus"  
unter Betreuung von Prof. Dr. R. Flügel in der Abteilung  
"Retrovirale Genexpression"