

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Sarah Chareza

aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2008

**Charakterisierung der strukturellen und
funktionellen Interaktion zwischen dem
Foamyvirus-Bet-Protein und dem zellulären
APOBEC3-Protein**

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann
Prof. Dr. Marin Löchelt

Die vorliegende Arbeit wurde von mir in der Zeit von April 2005 bis Mai 2008 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Martin Löchelt angefertigt. Hiermit bestätige ich, keine weiteren Hilfsmittel außer den in dieser Arbeit angegebenen angewendet zu haben.

Heidelberg, den 27.05.2008

Sarah Chareza

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich hiermit ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin Löchelt für die Bereitstellung des interessanten Themas und die intensive fachkundige wissenschaftliche Betreuung sowie für die Unterstützung der Verfassung dieser Dissertationsschrift bedanken. Für diese Arbeit wurden mir optimale Arbeitsbedingungen zur Verfügung gestellt und ich konnte während der Arbeit sowohl von Seinen Ideen und Anregungen profitieren, als auch eigene Forschungspläne umsetzen.

Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann danke ich für seine Bereitschaft, das Erstgutachten zu übernehmen und gleichzeitig für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung sowie für die gewährte Unterstützung.

Dr. Carsten Münk (Paul-Ehrlich-Institut, Bundesministerium für Gesundheit, Langen) hat mir im Rahmen unserer hervorragenden Kooperation zahlreiche Plasmide und Zellen zur Verfügung gestellt und mir regelmäßig wertvolle Ratschläge erteilt. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Dr med. vet. Uwe Truyen (Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der L.-Maximilian-Universität, München) möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit durch die Immunisierung der Kaninchen zur Gewinnung polyklonaler Antiseren danken, die einen essentiellen Teil meiner Arbeit ermöglicht haben.

In gleicher Weise schulde ich Elisa Zabogli Dank, die im Rahmen ihrer zweimonatigen wissenschaftlichen Arbeit in unserem Labor, zahlreiche wichtige Experimente in Kooperation mit mir durchgeführt hat.

Lisa Steinbrück hat mich während eines zweimonatigen Praktikums, das Sie unter meiner Anleitung durchgeführt hat, tatkräftig und engagiert bei der experimentellen Arbeit unterstützt.

Ich möchte auch Ihr auf diesem Wege nochmals herzlich dafür danken.

Auch Evi Schyr möchte ich für Ihre Mithilfe bei der Langzeitstudie der Viruspassagierung, und bei zahlreichen Klonierungsprojekten danken.

Den Mitgliedern des Labors 2.108, der Abteilung Infektion und Krebs: Xiaojun Xu, Weibin Liu und Daniel Maeda, sei für ihre tatkräftige Unterstützung und eine schöne Arbeitsatmosphäre gedankt.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Forschungsschwerpunkts Infektion und Krebs, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern, Prof. Dr. Christa Ness und Jerzy Chareza aussprechen, die mir auf meinem bisherigen Weg immer liebe- und verständnisvoll zur Seite standen.

Name: Sarah Chareza
Abgabedatum: 27.05.2008
Name des Erstgutachters: Prof. Dr. Lutz Gissmann
Titel der Dissertation: Charakterisierung der strukturellen und funktionellen Interaktion zwischen dem Foamyvirus-Bet-Protein und dem zellulären APOBEC3-Protein

ZUSAMMENFASSUNG

Die Analyse der genomischen APOBEC3-Region der Hauskatze (*F. catus*) ergab, dass sich der chromosomale APOBEC3-Lokus von Primaten, Nagetieren und Hunden wesentlich unterscheidet (Münk et al., 2008). Im Katzen genom wurden drei Kopien des *feA3C*-Genes entdeckt, die hintereinander auf dem Chromosom B4 lokalisiert sind. Sie codieren für drei *feA3C*-Isoformen, die sich in 6 bzw. 7 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Neben dem Nachweis von drei sehr ähnlichen *feA3C*-Genen und einem *feA3H*-Gen wird post-transkriptionell durch alternatives Spleißen ein Zwei-Domänen *feA3CH*-Protein als Fusionsgen gebildet. Es handelt sich dabei um das Zwei-Domänen *feA3*-Protein im Gegensatz zu den Ein-Domänen *feA3C*- und *H*-Proteinen. Diese *feA3*-Proteinfamilie bildet als Teil der angeborenen Immunantwort einen entscheidenden viralen Abwehrmechanismus und inhibiert die Replikation der Bet-defizienten FFVs sowie der Vif-defizienten FIVs.

Ein elementarer Bestandteil der Arbeit war die Untersuchung der Expression endogener *feA3*-Proteine in Katzenzellen, sowie die Analyse ihrer antiviralen Aktivität und der Interaktion mit foamyviralen Bet- und Gag-Proteinen. Dabei wurde die Expression des Zwei-Domänen *feA3CH*-Proteins in CrFK- und Mya-Zellen nachgewiesen, während *feA3C*- und *-H*-Proteine nur in CrFK-Zellen nachweisbar waren. Die spezifische antivirale Aktivität der einzelnen *feA3*-Hauptformen gegen Bet-deletiertes FFV sowie ihre Interaktionen mit FFV-Bet und FIV-Vif führten schließlich zur Formulierung eines Bet-abhängigen foamyviralen Abwehrmechanismus. Dieser unterscheidet sich grundlegend von dem Mechanismus der Vif-induzierten *feA3*-Degradation. In diesem Abwehrmodell inhibiert Bet die *feA3*-Gag-Interaktion und somit die Partikelinkorporation, welche für ihre antivirale Aktivität essentiell ist.

Sowohl die Mutation des katalytischen Zentrums, als auch einer strukturell wichtigen Aminosäuren im *feA3C-a*-Protein haben einen Verlust der antiviralen Aktivität gegen Bet-defiziente FFV zur Folge. Die Interaktion von *feA3C-a* mit FFV-Gag ist nur auf die Aminosäure des katalytischen Zentrums im *feA3C-a* zurückzuführen.

Die Erkenntnisse über die Austauschbarkeit der viralen Abwehrfaktoren Bet und Vif zur Wiederherstellung des foamyviralen Titers führten zur Konstruktion eines chimären *pCF7-Vif*-Vektors, der durch *in vitro* Selektion optimiert wurde. Durch seinen stabilen Titer in seriellen Langzeitpassagen bildet dieser Vektor eine geeignete Grundlage für die Entwicklung eines Vakzinevirus gegen FIV.

In dieser Arbeit wurde der foamyvirale Abwehrmechanismus gegen ein Protein der angeborenen Immunantwort auf molekularer Ebene aufgeklärt. Aufbauend auf diesen funktionellen Grundlagenstudien wurde ein chimäres Vakzinevirus entwickelt, das das FIV-Vif-Immunogen und weitere Antigene im Kontext des apathogenen FFV Vektorgenoms exprimiert.

Summary

The analysis of the genomic APOBEC3-region in the domestic cat (*F. catus*) revealed a chromosomal APOBEC3-locus that considerably differs between primates, rodents and canines (Münk et al., 2008). Three copies of the feA3C-genes were discovered, that are positioned on the chromosome B4 in a head-to-tail-formation. They code for three feA3C-isoforms that differ in 6 to 7 amino acids. Besides the confirmation of these very similar feA3C-genes and one feA3H-gene a two-domain feA3CH is built post-transcriptionally and by alternative splicing. This results in a two-domain feA3CH-protein in contrast to the one-domain feA3C and -H. This feA3-protein-family works as a part of the innate immune response and inhibits the replication of Bet-deficient FFV and Vif-deficient FIV as a crucial part of the viral defence-factor.

One basic component of this thesis was the investigation of the expression of endogenous feA3-proteins in cat cells and the analysis of their antiviral activity as well as their interaction with foamyviral Bet- and Gag-proteins. Thereby the two domain feA3CH-proteins were detected in CrFK- and Mya-cells, whereas feA3C- and H-proteins were only detected in CrFK-cells. This specific antiviral activity of the single feA3-C-, -H- and CH-proteins against Bet-deleted FFV as well as their interaction with FFV-Bet and FIV-Vif lead to the formulation of a Bet-dependent foamyviral defence mechanism. This mechanism differs basically from the mechanism of a Vif-induced feA3-degradation. In this defence model Bet inhibits the feA3-Gag-interaction and the particle incorporation, which is essential for their antiviral activity.

Both mutations in the catalytically centre as well as the in structurally important amino acid in the feA3C-a-protein lead to a loss of the antiviral activity against Bet-deficient FFV. The interaction of feA3C-a with FFV-Gag is solely caused by the amino acid in the catalytically centre of feA3C-a.

The finding of the compatibility of the viral defence factors Bet and Fiv for the foamyviral titre rescue lead to the construction of a chimeric pCF7-FIV-vector that was optimised by *in vitro* selections. This vector shows a stable titre in long-term passages and an adequate fundament for the development of a vaccine virus against FIV.

In this work the foamyviral defence mechanism against a protein of the innate immunity was solved on the molecular basis. Based on these functional studies a chimeric vaccine virus was developed that expresses the immunogenic FIV-Vif and further antigens in an apathogenic vector genome.

Inhalt

Inhalt.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Formelsammlung.....	9
1 EINLEITUNG.....	10
1.1 Retroviren.....	10
1.2 Foamyviren.....	11
1.2.1 Verbreitung und Vorkommen.....	12
1.2.2 Infektion und Tropismus.....	13
1.2.3 Das feline Foamyvirus.....	13
1.2.4 Genomorganisation und -expression des Felinen Foamyvirus.....	13
1.2.5 Morphologie.....	15
1.2.6 Replikationszyklus der Foamyviren.....	16
1.2.7 Foamyvirale Vektoren.....	17
1.3 APOBEC3.....	18
1.3.1 Die antivirale Aktivität der A3-Proteine gegen FV.....	23
1.4 Das Feline APOBECA3.....	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	27
2 MATERIAL.....	28
2.1 Puffer und Lösungen.....	28
2.1.1 Allgemeine Lösungen.....	28
2.1.2 Puffer für Arbeiten mit DNA.....	28
2.1.3 Puffer für proteinbiochemische Techniken.....	29
2.1.4 SDS-Gelelektrophorese- und Immunoblot-Puffer.....	30
2.1.5 β -Galactosidase-Assay.....	31
2.2 Zellen.....	31
2.3 Bakterienstämme.....	31

2.4	Vektoren und Plasmide	32
2.4.1	Foamyvirale Vektoren.....	32
2.5	Enzyme.....	34
2.6	Molekulargewichtsmarker.....	34
2.7	Antikörper und Antiseren.....	35
2.7.1	Primärantikörper	35
2.7.2	Sekundärantikörper	35
2.8	Kits.....	35
2.9	Medien.....	36
2.9.1	Medien für die Zellkultur	36
2.9.2	Medien für die Bakterienkultur	36
2.10	Chemikalien.....	37
2.11	Fotographisches Material.....	37
2.12	Verbrauchsmaterialien	37
2.13	Geräte	38
2.14	Primer.....	39
3	METHODEN.....	42
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	42
3.1.1	Lagerung und Kultur von Bakterien	42
3.1.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	42
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.2.1	DNA-Präparation im kleinen Maßstab („Miniprep“)	43
3.2.2	DNA-Präparation im großen Maßstab („Maxiprep“)	43
3.2.3	DNA-Mengenbestimmung	44
3.2.4	DNA-Restriktionsverdau	44
3.2.5	DNA-Reinigung durch Phenol/Chlorophorm-Extraktion	45
3.2.6	DNA-Reinigung durch Ethanol-fällung.....	45
3.2.7	Horizontale DNA-Elektrophorese.....	45
3.2.8	Elution von DNA aus Agarosegelen	46
3.2.9	Dephosphorylierung von 5´-Enden	46
3.2.10	Ligation	47

3.2.11	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA	47
3.2.12	DNA-Sequenzierung	47
3.2.13	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	47
3.2.14	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	49
3.2.15	Topoklonierung und blau-weiß-Selektion positiver <i>E.coli</i> -Kolonien.....	49
3.3	Computeranalysen	50
3.4	Arbeiten mit Proteinen	50
3.4.1	Gewinnung zellassoziierter Proteine und Viruspartikel aus eukaryotischen -Zellen	50
3.4.2	SDS-Gelelektrophorese	50
3.4.3	Proteinimmundetektion (Western Blot, Immunoblot).....	52
3.4.4	Proteingelfärbung	53
3.4.5	Expression eukaryonter Fusionproteine in <i>Escherichia coli</i>	53
3.4.6	Extraktion und Aufreinigung eukayonter Fusionsproteine	53
3.4.7	Co-Immunpräzipitation.....	54
3.4.8	Proteininteraktions-Assay	54
3.4.9	Aufreinigung polyklonaler Antiseren mithilfe einer Affinitäts-Säulenchromatographie	55
3.5	Zellkultur und Arbeiten mit Viren	55
3.5.1	Kultivierung eukaryotischer -Zellen.....	55
3.5.2	Lagerung und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	56
3.5.3	Transiente transfektion eukaryotischer Zellen mit der Kalzium-Phosphat-Methode	56
3.5.4	Infektion und transduktion von CRFK -Zellen.....	57
3.5.5	β -Galactosidase-Assay mit transduzierten bzw. infizierten FeFAB -Zellen.....	57
3.5.6	Isolierung von Viruspartikeln aus dem Zellkulturüberstand	58
3.5.7	DNaseI-Verdau	42
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Nachweis und Vergleich der felinen A3 Proteine	60
4.1.1	Klonierung der GST-feA3C-a, -feA3H und -feA3CH-linker Fusionskonstrukte	60
4.1.2	Expression und Aufreinigung der GST-feA3-Fusionsproteine	62
4.1.3	Nachweis von endogenem feA3C-a, feA3H und feA3CH in CrFK- und Mya-Zellen.....	64
4.1.4	Vergleich der Aminosäuresequenzen der feA3C-a, -b und -c-Proteine	66
4.2	Antivirale Aktivität der feA3-Formen gegen wt FFV im Vergleich zu FFVBBtr.....	67

4.2.1	Vergleich der Titer Bet-deletierter und Bet-trunkatierter FFV-Titer nach Cotransfektion mit feA3C-a	70
4.3	Stabilität von feA3C-a, -H und -CH in Anwesenheit von FIV-Vif im Vergleich zu FFV-Bet.....	72
4.3.1	Nachweis der proteasomalen Degradation von feA3C-a, feA3H, feA3CH in Anwesenheit von FIV-Vif	72
4.3.2	Untersuchung der Inhibition von feA3C-a im foamyviralen Kontext	74
4.3.3	Transkomplementation Bet-defizienter FFV durch Vif.....	76
4.4	Interaktionsstudien von wt FFV-Bet und mutiertem FFV-Bet mit den feA3-Proteinen.....	78
4.4.1	Co-Immunopräzipitationsstudien von wt FFV-Bet und mutiertem FFV-BetMCS mit feA3C-a, -H und -CH	78
4.4.2	Co-Immunopräzipitation von feA3C-a-, -H- und -CH-Proteinen mit FFV-Bet in proviralen Kontext	81
4.4.3	Vergleichende Interaktionsstudien von FFV-Bet und FFV-BetMCS mit den feA3-Isoformen.....	83
4.5	Untersuchung der Interaktion von feA3C-a, feA3H und feA3CH mit FFV-Gag	85
4.5.1	RNA-unabhängige Interaktion von FFV-Gag mit feA3C-a, -H- und -CH.....	85
4.5.2	Untersuchung der Interaktion der drei feA3C-Isoformen mit FFV-Gag.....	88
4.5.3	Wt FFV-Bet verhindert die Inkorporation von feA3C-a, feA3H und feA3CH in FFV-Viruspartikel.....	90
4.6	Dimerisierung der feA3-Proteine in Anwesenheit von FFV.....	92
4.6.1	Keines der feA3C-Proteine zeigt trans-dominant-negative antivirale Effekte in Coexpressionsstudien.....	94
4.7	Klonierung und Charakterisierung katalytischer und struktureller feA3C-a Mutanten	96
4.7.1	Mutation der katalytischen und strukturellen Aminosäuren E70Q, C72S und E70Q/C72S in feA3C-a	96
4.7.2	Vergleich der katalytischen feA3C-a Mutanten auf die antivirale Aktivität gegen FFV und FFVBBtr	97
4.7.3	Analyse der FFV-Partikel-Inkorporation und der Gag-Interaktion feA3C-a-Mutanten.....	99
4.8	Konstruktion eines FFV-Vif-Vektors	102
4.8.1	Kinetik der Genexpression des FFV-Vif-Vektors in transfizierten 293T- und infizierten CrFK-Zellen	104
4.8.2	Vergleich der Titer von FFV-Vif und wt FFV in Langzeitpassagen.....	109
4.8.3	Genotypische Untersuchung der Genome isolierter FFV-Vif-Virionen auf akkumulierte Mutationen.....	112

5	DISKUSSION	115
5.1	Phänotypen der feA3-Formen	115
5.1.1	Charakterisierung der feA3-Haupt- und Isoformen.....	116
5.2	Interaktion der feA3-Formen mit foamyviralen Proteinen.....	119
5.3	Einfluss der feA3-Dimerisierung auf die antivirale Aktivität.....	121
5.4	Bedeutung des katalytischen Zentrums von feA3C-a für dessen Phänotyp.....	122
5.5	Charakterisierung eines chimären pCF7-Vif-Vektors.....	123
6	ZUSAMMENFASSUNG	125
7	Literatur	126

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A3	APOBEC3
AAV	Adeno assoziiertes Virus
AID	Activation induced deaminase
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Agm	African green monkey
Amp	Ampizillin
APOBEC	apolipoprotein <i>B</i> mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galactosidase
Bel 1	Between env and LTR 1
bel 1	Virales bel 1-Gen
Bel 2	Between env and LTR 2
bel 2	Virales bel 2-Gen
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	canine
CIP	Calf intestine phosphatase
CMV-IE	Immediate early Promotor des humanen Cytomegalovirus
cpz	chimpanzee
CrFK	Crandell feline kidney cells
Cys	Cystein
dd H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIAV	Equus infectious anemia virus
ELP	Env leader protein
Env	Envelope, Hüllprotein
<i>env</i>	Virales Env-Gen
ER	Endoplasmatisches Retikulum

fe	feline
FeFAB	Feline Foamyvirus-aktivierte β -Galactosidase-Expression
FCS	Fötales Kälberserum
FFU	Focus forming units
FFV	Felines Foamyvirus
FIV	Felines Immundefizienzvirus
FV	Foamyvirus
G	Guanin
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
<i>gag</i>	Virales Gag-Gen
Glu	Glutamin
GST	Glutathion-S-Transferase
GSH	Glutathion
HBV	Hepatitis-B-Virus
HFV	Humanes Foamyvirus
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
IN	Integrase
IP	Interner Promotor
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
Ke-R-Zellen	Fibroblasten-Zelllinie
lacZ	β -GalactosidaseGen
LB	Luria-Bertani Medium
Lsg.	Lösung
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrixprotein
mac	Rhesus marcaque
MCS	Multiple Klonierungsseite
min	Minute
mind.	mindestens
MLV	Murines Leukämievirus
mut.	mutiert
Mya-1	T-Zelllinie
mRNA	Messenger RNA
NC	Nukleokapsid-Protein
N.d.	Nicht untersucht

nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PBS	Primer-Bindungsstelle
PBS	Phosphate Buffered Saline (nur im Methodenteil)
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Pol	Virale Enzyme
pol	Virales Pol-Gen
RH	RNase H
Ring Box	Really interesting new gene Box
PR	Protease-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Rous Sarkomvirus
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur (nur im Methodenteil)
RV	Retrovirus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	Simian Foamyvirus
SIV	Simian Immundefizienzvirus
sm	Sooty mangabey
SU	Surface
T	Thymin
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran-Domäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uracil
U	Unit (Enzymeinheit)
ubi	Humaner Ubiquitin C-Promoter
UV	Ultraviolett
Vif	Virionen Infektivitätsfaktor
vif	Virales Virionen-infektivitätsfaktor-Gen
VSV-G	G-Protein des Vesicular-Stomatitis-Virus
wt	Witdtyp
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZNS	Zentrales Nervensystem

Formelsammlung

<i>Formelzeichen</i>	<i>Name</i>	<i>Einheit</i>
U	Stromstärke	A
I	Elektrische Spannung	V
	Länge	m
MW	Molekulargewicht	Da
mol	Stoffmenge	n
m	Masse	kg
V	Volumen	l
T	Temperatur	°C
λ	Wellenlänge	m
Ω	Elektrischer Widerstand	Ohm
t	Zeit	s

1 EINLEITUNG

1.1 Retroviren

Retroviren (RV) wurden Anfang des letzten Jahrhunderts erstmals beschrieben. Ellermann und Bang gelang es bereits 1908 die Mäuseleukämie durch Ultrafiltrate zu übertragen. 1911 isolierte Peyton Rous das Rous Sarkomvirus (RSV) als erstes Retrovirus, das mit der Entstehung von Tumorerkrankungen bei Geflügel in Verbindung gebracht wurde (Ellerman, 1908; Rous, 1911). Das erste humane Retrovirus wurde 1971 von Achong aus den Lymphoblastoiden Zellen eines afrikanischen Patienten mit Nasopharynx-Karzinom isoliert und als das humane Foamyvirus identifiziert (Achong BG, 1971). Weitere Isolate humaner RV waren neben dem von RC. Gallo 1981 beschriebenen humanen *T-Zell-Leukämie-Virus I* (HTLV-I) (Gallo, 1981) auch die später identifizierten humanen Immundefizienz-Viren 1 und 2 (HIV-1 und HIV-2) (Barre-Sinoussi and C., 1983).

Charakteristisch für alle RV ist das virale Enzym Reverse Transkriptase, das für die molekulare Transkription des einzelsträngigen RNA-Genoms in DNA verantwortlich ist (Temin, 1970). Bei den RV ist der bekannte genetische Informationsfluss von DNA über RNA umgekehrt, eine Eigenschaft, die ausschlaggebend für die Namensgebung der RV war. Weitere charakteristische retrovirale Merkmale sind in der Homologie der Genomorganisation, der Expression von Protease und Integrase sowie dem Verlauf der Replikation und der Virusstruktur zu finden.

Nach einer Definition des *International Committee on Taxonomy of Viruses* werden die Retroviren in sieben Genera der "einfachen" Alpha-, Beta- und Gammaretroviren sowie der „komplexen“ Deltaretro-, Epsilonretro- und Lentiviren eingeteilt. Zusammengefasst bilden diese die Subfamilie der *Orthoretrovirinae*. Eine weitere Subfamilie bilden die *Spumaretrovirinae*, die auch synonym als Foamyviren (engl.: foamy virus, FV) bezeichnet werden und sich durch spezifischen Merkmale hinsichtlich der Genexpression und der Proteinprozessierung von den übrigen RV unterscheiden. Abb. 1.1 zeigt die phylogenetische Einteilung der Retroviren.

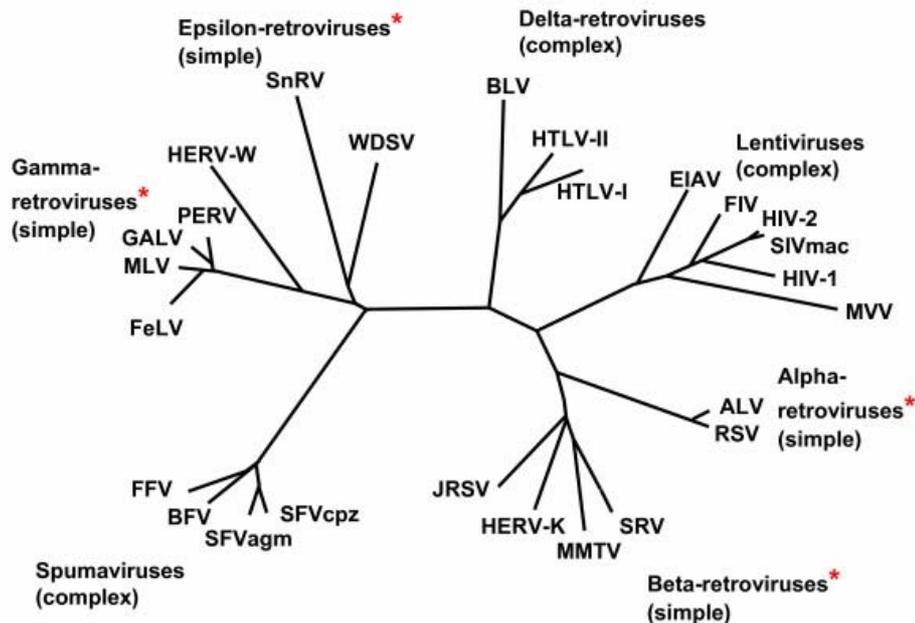


Abb. 1.1: Phylogenetische Einteilung der Retroviren (Weiss, 2006). Die phylogenetische Einteilung der Retrovirus-Familie erfolgt anhand von Sequenzanalysen konservierter Regionen der Polymerase-Gene der Viren. Entsprechend werden die Retroviren in die Gattungen, Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-, Lenti- und Spumaviren eingeteilt.

Die einfachen Viren besitzen nur *gag*-, *pol*- und *env*-Gene, während das Genom der komplexen Retroviren weitere Gene enthält, die für regulatorische Proteine verschiedenster Funktionen kodieren. Neben der Assoziation der RV als Erreger unterschiedlicher Krankheiten, existieren auch Vertreter, deren Infektion nicht als pathogen gilt. Ein Beispiel hierfür sind die Vertreter der Foamyviren (Bodem et al., 1997; Linial, 1999; Nestler et al., 1997; Russell and Miller, 1996).

1.2 Foamyviren

Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften bilden Foamyviren (FV), auch Spumaretroviren (SRV) genannt, das einzige Genus in der Subfamilie *Spumaretrovirinae*. FV-infizierte Zellkulturen nehmen durch Vakuolisieren und nach Bildung von vielkernigen Riesen-Zellen (Synzytien) ein schaumartiges Aussehen an (lat.: „spuma“, engl.: „foam“ für „Schaum“) (Nemo et al., 1978). Auf dieser Eigenschaft beruht die Namensgebung der FV.

FV besitzen retrovirale Eigenschaften bezüglich der Expression einer Protease und Integrase sowie hinsichtlich der Morphologie. In einigen Aspekten der Protein-Prozessierung, Genexpression und Replikation unterscheiden sich FV erheblich von den anderen RV. FV verfügen beispielsweise über einen essentiellen internen Promotor und besitzen eine eigene

gespleißte Polymerase-mRNA (Löchelt et al., 1995). Des Weiteren treten im Replikationszyklus der FV spezifische Merkmale auf, die nicht bei anderen RV vorkommen. Diese ähneln dem Replikationszyklus der Familie der Hepadnaviren, dessen bekanntester Vertreter das *Hepatitis-B-Virus* (HBV) ist. Hepadnaviren besitzen im Gegensatz zu RV ein DNA-Genom, codieren jedoch auch für eine Reverse Transkriptase.

1.2.1 Verbreitung und Vorkommen

Obwohl FV erstmalig aus einem humanen Nasopharynxkarzinom isoliert wurden (Achong et al., 1971), zeigten Sequenzvergleiche, dass es sich in diesem und weiteren untersuchten Fällen um Interspezies-Übertragungen aus nicht humanen Primaten SFV (Affenfoamyviren, engl.: simian foamy viruses) handelte (Herchenröder and Mergia, 1994). FV können durch zoonotische Infektionen eingeschränkt von einer Tierart auf eine andere übertragen werden und haben sich auf diese Weise mit ihren Wirten weiterentwickelt (Broussard et al., 1997; Romen F and M., 2004). Der Mensch scheint kein natürlicher Wirt zu sein, sondern wird nur in seltenen Fällen zoonotischer Übertragungen infiziert. Diese Infektionen wurden, soweit man heute weiß, nie weitergegeben (Ali et al., 1996; Schweizer et al., 1995).

Unter den verschiedenen Wirten sind die jeweiligen FV weit verbreitet, wobei Pferde, Rinder, Affen und Katzen als natürliche Wirte eine sehr hohe Durchseuchung von 10-70 % haben (Neumann-Haefelin et al., 1993; Romen F, 2007; Romen et al., 2006; Winkler, Lochelt, and Flower, 1999) Obwohl die genauen Übertragungswege der FV nicht bekannt sind, wird vermutet, dass die Übertragung oropharyngeal über den Speichel durch Lecken oder Beißen und nicht durch sexuelle Kontakte erfolgt (Johnson RH, 1988; Winkler, Lochelt, and Flower, 1999).

Das Risiko einer zoonotischen Interspezies-Übertragung ist jedoch nicht allein vom Ausmaß und der Art der Exposition mit einem heterologen Pathogen abhängig, sondern auch vom beteiligten Virus. Sind die vom Virus kodierte Proteine die primären Ziele des adaptiven, humoralen und zellulären Immunsystems, werden die durch den Wirt festgelegten Strukturen, z.B. virionassoziierte Wirtsproteine, direkt durch Mechanismen der angeborenen Immunität oder durch passiv angepasste kreuzreaktive Immunmechanismen identifiziert (Burton, 2002). So gesehen nimmt das Risiko einer zoonotischen Übertragung mit der Nähe der genetischen Verwandtschaft des ursprünglichen mit dem neuen Wirt zu. Dadurch sind z.B. Übertragungen vom Affen auf den Menschen aufgrund von konservierten Virusproteinen viel wahrscheinlicher also solche von weit entfernten Spezies wie Katzen, Rindern und Pferden (Saib, 2003). Auf diese konservierten Virusproteine und ihre Interaktion mit Proteinen der angeborenen Immunabwehr soll in Abschnitt 1.3 detailliert eingegangen werden.

In menschlichen Populationen wurden FV-Infektionen nur selten nachgewiesen, zumal bis heute keine eindeutige Assoziation zwischen Infektion und einer dadurch induzierten

Erkrankung nachgewiesen werden konnte (Linial, 1999). Allerdings entwickelten FV transgene Mäuse schwere neurologische Krankheiten (Aguzzi et al., 1996). Auch *In vitro* führt eine Infektion mit FV zu deutlichen cytopathischen Effekten in Form von Zellfusionen benachbarter Zellen und dadurch zur Bildung so genannter Riesen-Zellen (Syncytien) sowie zu Vakuolisierung und schließlich dem Zelltod.

Der asymptomatische Verlauf der Infektion im Menschen führte dazu, dass FV seit einiger Zeit als interessante Kandidaten für die Entwicklung von Vektoren in der Gentherapie erforscht werden (Bodem et al., 1997; Nestler et al., 1997; Russell and Miller, 1996).

1.2.2 Infektion und Tropismus

Trotz Analysen verschiedener FV-infizierter Tierspezies und eines SFV-infizierten Menschen ist der Tropismus der FV nur unvollständig bekannt. Bislang konnte FV-DNA in allen untersuchten Organen, z.B. Zentrales Nervensystem (ZNS), innere Organe, Knochenmark und Blut nachgewiesen werden. Als Hauptreservoir für FV-DNA wurden CD8⁺-T-Zellen, aber auch CD4⁺-Lymphozyten, Monozyten und B-Zellen beschrieben (Falcone et al., 1999b; von Laer et al., 1996). Jedoch konnte lediglich in der Mundschleimhaut foamyvirale RNA nachgewiesen werden, was die transkriptionelle Aktivität darlegt und für eine sehr geringe Replikation der FV im Organismus spricht (Falcone et al., 1999a). Die Tatsache, dass FV mehrfach erfolgreich aus verschiedenen Organen (PBL, ZNS, Speicheldrüsen, Thymus und Rachenraum) mehrerer Tierspezies isoliert wurden, belegt eine erfolgreiche Replikation des Virus im persistent infizierten Wirt (Hooks and Gibbs, 1975; Johnson RH, 1988; Johnston, 1961; Kertayadnya IG, 1988; Winkler et al., 1998).

1.2.3 Das feline Foamyvirus

Das feline Foamyvirus (FFV) wurde erstmals 1969 beschrieben (Riggs JL, 1969). 1997 wurde es erstmals vollständig kloniert und sequenziert (Helps and Harbour, 1997; Winkler et al., 1997). Sofern Daten des im Folgenden vorgestellten FFV nicht bekannt sind, werden Erkenntnisse über das intensiver untersuchte HFV herangezogen.

1.2.4 Genomorganisation und -expression des Felinen Foamyvirus

Charakteristisch für das feline Foamyvirus (FFV) ist sein komplexes Genom, das mehrere offene Leseraster (engl.: *open reading frames*, ORF) am 3'-Ende besitzt (Linial, 1999). Mit ca. 11700 bp ist die provirale FFV-DNA eines der größten Genome der Familie der *Retroviridae*.

Neben den für alle Retroviren typischen Genen *gag* (Strukturproteine), *pol* (enzymatische Proteine) und *env* (Hüll-Glykoproteine, engl.: *envelope*) beinhaltet das FV-Genom die regulatorischen Gene *bel 1* und *bel 2* (engl.: *Between Env and LTR*) am 3'-Ende (Flugel et al., 1987).

Durch Ihre Lage zwischen dem *env*-Gen und dem 3'-LTR erhielten diese akzessorischen Proteine die Bezeichnung *bel*-Gene (engl.: *Between env and LTR*). Für die Aktivierung des LTR Promotors wie auch des Internen Promotors wird das virale Transaktivator-Protein Bel 1 benötigt, das auch als Tas (*Trans-Aktivator der Spumaretroviren*) bezeichnet wird (Zusammengefasst in (Löchelt, 2003)). Bei FV werden die *bel 2*- und *bet*-Gene vorwiegend von gespleißten Transkripten des internen Promotors exprimiert (Bodem, Zemba, and Flugel, 1998). Bisher wurde das Produkt des *bel 2*-Gens noch nicht identifiziert.

Der Leserahmen des *bet*-Gens setzt sich aus den Leserahmen der *bel 1*- und *bel 2*-Gene zusammen (Keller et al., 1991). Für das Bet-Protein fusionieren die ersten 31 Aminosäuren des Bel 1-Proteins an den gesamten Bel 2-Leserahmen. Das FFV-Bet-Protein reagiert mit einem Bel 2-spezifischen Antiserum und wird im Immunoblot als eine Bande von ca. 43 kDa detektiert (Alke et al., 2001). Lange Zeit war die Funktion von Bet neben einer postulierten Rolle bei der Etablierung der viralen Persistenz unklar (Saib et al., 1995; Saib, Peries, and de The, 1993; Yu, Stone, and Linial, 1996). Mittlerweile ist bekannt, dass Bet hauptsächlich als Gegenspieler einer zellulären, antiviralen Abwehr von Bedeutung ist (Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005).

Der LTR-Promotor in der U3-Region der 5'-LTR ist für die Bildung der genomischen sowie der gespleißten *pol*- und *env*-Transkripte verantwortlich. FV unterscheiden sich von anderen Retroviren unter anderem durch das Vorhandensein eines weiteren essentiellen, internen Promotors am 3'-Ende des *env*-Gens, der eine zeitlich regulierte Transkription ermöglicht. Prinzipiell ist die Aktivität des internen Promotors höher, als die des LTR-Promotors (Lochelt, Aboud, and Flugel, 1993). Daher startet die Transkription des proviralen Genoms nach Integration in die Wirtszell-DNA am internen Promotor. Infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation des viralen Transaktivators Bel 1. Nach Überschreiten einer bestimmten Schwellenkonzentration wird auch der LTR-Promotor aktiviert, wodurch die Transkription der Strukturgene *gag*, *pol* und *env* ausgelöst wird.

Weitere Besonderheiten sind das Fehlen eines Gag-Pol-Fusionsproteins und der Pol-Expression von einem gespleißten Transkript (Bodem et al., 1998; Bodem et al., 1996; Enssle et al., 1996; Yu et al., 1996). Außerdem fehlen die Retrovirus-typischen MHR-(*Major Homology Region*) in der Kapsid-Domäne und der Cys-His-Boxen in der Nukleokapsid-Domäne. Das Pol-Protein wird durch die virale Protease in die *Protease*- (PR), *Reverse Transkriptase*- (RT), *RNase H*- (RH) und *Integrase*- (IN) Domänen prozessiert.

Gag wird nicht in die Domänen Matrix, Kapsid und Nukleokapsid-Domäne prozessiert, sondern ein 4 kDa großes Fragment des C-Terminus wird proteolytisch abgespalten (Linial, 1999). Entsprechend wird das Gag-Protein im Immunoblot mit einem Gag-spezifischen Antiserum als Doppelbande mit einem Laufverhalten von 52 und 48 kDa detektiert (Alke et al., 2000; Zemba et al., 2000). Dabei entspricht die große Bande dem unprozessierten Gag-Vorläufer, während

die kleine Bande mit der prozessierten Form übereinstimmt, von der ein C-terminales Peptid von 3 kDa durch die virale Protease abgespalten wird.

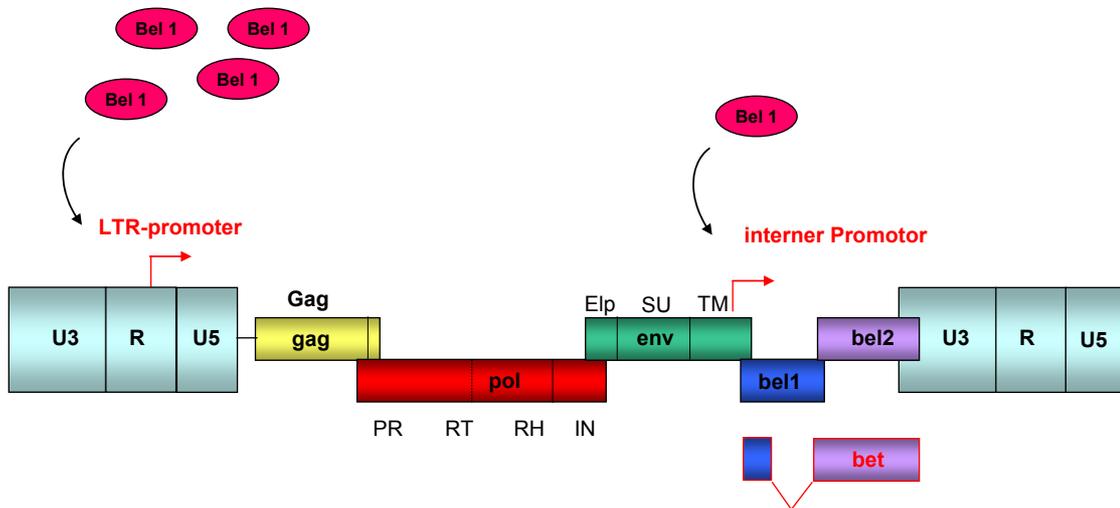


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des linearen proviralen FFV-Genoms und der Aktivierung des internen sowie des LTR-Promotors (nicht maßstabsgerecht¹). Die LTR-Regionen sind in U3, R und U5 untergliedert und mit hellblauen Boxen unterlegt. Die viralen Leseramen sind durch gefärbte Boxen (gelb, rot, grün für die Strukturgene, blau und violett für die akzessorischen und regulatorischen Gene) dargestellt. Die Domänen bzw. Spaltprodukte der Proteine sind durch schwache Striche in den jeweiligen Boxen und durch entsprechende Abkürzungen (siehe Text) angezeigt. Die Bel 1-Proteine (rote Ovale) aktivieren den internen Promotor in geringer, den LTR-Promotor erst in hoher Konzentration. Die abgewinkelten Pfeile verweisen auf die Transkriptionsstartstellen bei den beiden Promotoren

Ebenso wie das Pol-Protein wird das Env-Protein von einem gespleißten Transkript exprimiert (Bodem, Zemba, and Flugel, 1998). Dabei wird die Transmembran (TM) -Domäne von der Oberflächendomäne (SU), vergleichbar mit anderen Retroviren, durch eine zelluläre Furinprotease voneinander getrennt (Duda et al., 2004). Des Weiteren wird ein N-terminales env-leader-protein (Elp) von Env abgespalten. Abb. 1.2 stellt den linearen Aufbau des proviralen FFV-Genoms graphisch dar.

1.2.5 Morphologie

Morphologisch gleichen FV den Retroviren: Das Genom wird durch ein Kapsid umgeben, die von einer Matrixhülle eingefasst ist. Daran schließt sich eine weitere Hülle cytoplasmatischen Ursprungs an, in deren oberflächenvirale Glykoproteine, die sog. „Spikes“ eingelagert sind. Weitere virale Proteine, die in den Viruspartikeln gefunden wurden, sind die Strukturproteine

¹ modifiziert nach Dr. A. Schwantes

Gag, Pol und Env, (Baldwin and Linial, 1998) jedoch nicht die akzessorischen Proteine Bel 2 und Bet sowie der Transaktivator Bel 1. (M. Löchelt, nicht veröffentlichte Daten). Anders als bei Retroviren besteht das Genom neben RNA, auch noch aus vollständigen oder fast vollständigen infektiösen DNA-Genomen (Yu, Sullivan, and Linial, 1999).

1.2.6 Replikationszyklus der Foamyviren

In vielen Punkten gleicht der Replikationszyklus der FV dem der anderen Retroviren, an anderen denen der Hepadnaviren (Delelis, Lehmann-Che, and Saib, 2004). FV binden über einen noch nicht identifizierten zellulären Rezeptor an die Cytoplasmamembran der Wirtszelle. Nach der sog. Penetration, der Aufnahme des Viruspartikels in der Zelle, wird das Virusgenom in der Wirtszelle freigesetzt („Uncoating“). Es wird angenommen, dass bei PFV die reverse Transkription, im Gegensatz zu anderen Retroviren, erst kurz vor dem Verlassen der neuen Viruspartikel aus der Wirtszelle stattfindet (Moebes et al., 1997). Die zusätzlichen aus den Viruspartikeln stammenden DNA-Genome können nach Infektion einer Zelle in die Wirtszell-DNA integrieren und somit die provirale DNA bilden (Meiering, Comstock, and Linial, 2000). Dieser Vorgang ist für die Replikation erforderlich, denn von der proviralen DNA werden die verschiedenen Transkripte zur Herstellung der Proteine und als neues Genom produziert (Enssle et al., 1999). Der Zusammenbau der neuen Viruspartikel (engl.: Assembly); (Lecellier and Saib, 2000) sowie das Verpacken der Virusgenome (engl.: Packaging) erfolgt im Cytoplasma. Anders als bei Retroviren erfolgt die Zusammenlagerung der partikulären Kapside mit der Virushülle über eine direkte Interaktion des N-Terminus von Gag (Peters et al., 2005) mit dem Elp-Protein von Env (Wilk et al., 2000). Dabei ist Env für das Freisetzen der Viren („Release“) notwendig. Die Viruspartikel verlassen die Wirtszelle über das Endoplasmatische Retikulum (bei HFV; (Goepfert et al., 1999)) bzw. die Zellmembran (bei FFV; (Alke et al., 2001)). Dabei bleibt ein Großteil der Viren intrazellulär und wird nicht freigesetzt (Bodem et al., 1997). Abb. 1.3 stellt den foamyviralen Replikationszyklus graphisch dar.

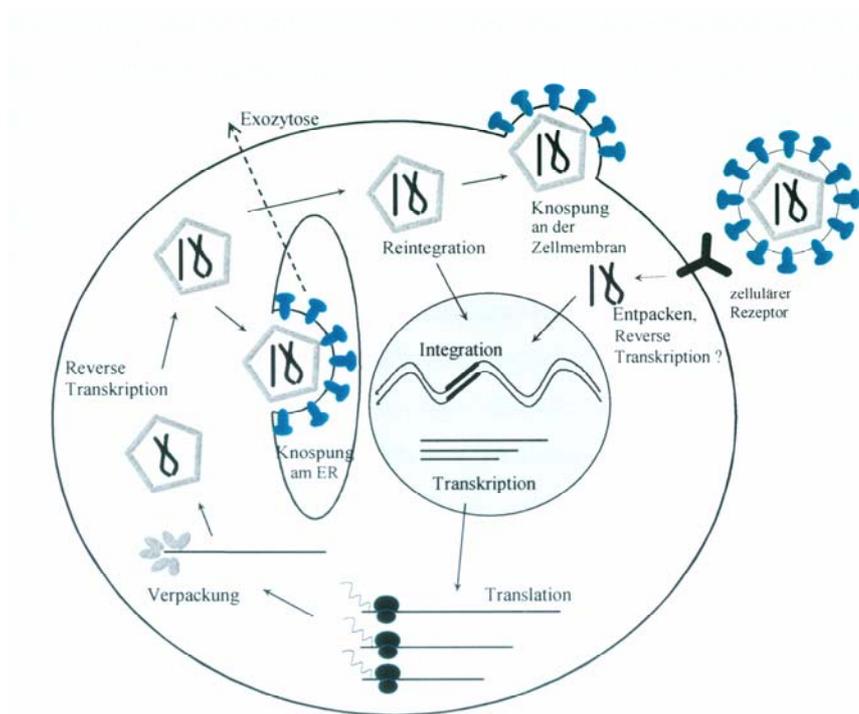


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des foamyviralen Replikationszyklus im Vergleich zum retroviralen Replikationszyklus². Das foamyvirale Genom ist ein RNA-Genom (geschwungene Linien). Alternativ können auch nahezu vollständige DNA-Genome (Striche) in den Viruspartikeln enthalten sein. Die Reverse Transkription findet daher vermutlich erst spät im Replikationszyklus statt (kurz vor oder nach dem Verlassen der Zelle). Nach dem Eintritt in die Zelle gelangt das Genom zusammen mit dem Präintegrationskomplex in den Zellkern. Dort integriert das FV-Genom in die Wirts-DNA. Anschließend kommt es zur Transkription und Translation der verschiedenen viralen Genprodukte. Im Zytoplasma werden virale Kapsidstrukturen, die das neue Genom integriert haben, ausgebildet. Die Freisetzung der neuen Viruspartikel erfolgt bei HFV am Endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. an bei FFV an der Zellmembran. Diese über das ER freigesetzten Viren verlassen die Zelle über den Golgi-Apparat durch Exozytose. Des Weiteren wird vermutet, dass das FV-Genom durch einen internen Replikationszyklus erneut in den Zellkern gelangt und reintegriert.

1.2.7 Foamyvirale Vektoren

FV-Vektoren stellen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften eine interessante Alternative zu den bisherigen retroviralen Vektoren dar. In erster Linie zeichnen sich FV durch ihren asymptomatischen Infektionsverlauf aus, der zu einer langjährigen Persistenz trotz anwesender neutralisierender Antikörper im Wirtsorganismus führt. Des Weiteren ist eine Abwesenheit einer bestehenden Immunität gegen FV beim Menschen und das Ausbleiben sekundärer FV-Übertragungen von Mensch zu Mensch von Vorteil für die Entwicklung eines FV-basierten Vektors (zusammengefasst in (Heneine et al., 2003)). Aufgrund ihrer Genomgröße verfügen FV

² Freundlicherweise überlassen von Dr. A. Schwantes

theoretisch über ein großes Genomverpackungspotential, was die Insertion von bis zu 10 kb heterologe DNA in den Vektor ermöglicht (Trobridge et al., 2002). FV haben einen breiten Zelltropismus und können unterschiedliche Zelltypen aus verschiedenen Spezies infizieren (zusammengefasst in (Mergia and Heinkelein, 2003)). Als Vertreter der Retroviren integrieren sie ihr Genom und damit auch das therapeutische Gen stabil in das der Wirtszelle. Dies bietet gegenüber anderen retroviralen Vektoren den Vorteil, dass das therapeutische Gen während mitotischer Teilungen der Wirtszelle an die Tochterzelle weitergegeben wird.

FV integrieren in ruhenden Zellen nach Transduktion bis zu 14 Tage stabil (Trobridge and Russell, 2004). Nach Einleitung der Mitose waren diese noch zur effizienten Integration und Markerexpression fähig, was vermutlich auf eine höhere Stabilität von DNA-Genomen im Vergleich zu RNA im Cytoplasma und die späte DNA-Synthese im FV-Replikationszyklus zurückzuführen ist.

Ein weiterer möglicher Vorteil foamyviraler Vektoren könnte der Ort der Integration im Wirtszellgenom sein. Im Gegensatz zu MLV-Vektoren, die bevorzugt um Regionen um den Transkriptionsstartpunkt von Genen integrieren, bevorzugen lentivirale Vektoren die transkribierten Regionen der Gene (Wu X, 2003). Dagegen finden 20-30% der HFV-Integrationen in RefSeq-Genen statt, was einer zufälligen Verteilung der Integrationen im zellulären Genom entspricht ((Nowrouzil A, 2004; Russell et al., 2004).

Replikationskompetente FV-Vektoren wurden bereits vor 13 Jahren auf HFV-Basis entwickelt (Schmidt and Rethwilm, 1995). Hierbei wurden heterologe Gene in ein zellkultur-adaptiertes HFV-Genom eingesetzt, das Deletionen in der *bel 2*-Region enthielt. Um den essentiellen Transaktivator weiterhin exprimieren zu können, war der *Bel 1*-Leserahmen nicht von den Deletionen betroffen. Diese ersten Vektoren bildeten infektiöse Partikel und dirigierten effizient die Expression des Reportergens unter Zellkulturbedingungen (Schmidt and Rethwilm, 1995). Die experimentelle Infektion von Katzen mit dem FFV zeigten eine effiziente Replikation des Virus im Tier (Alke et al., 2000). In den letzten Jahren wurden daher auf dem FFV basierende replikationskompetente Vektoren konstruiert und charakterisiert, welche die Grundlage für die vorliegende Arbeit bilden und in Abschnitt 2.4.1 erläutert werden (Schwantes, Ortlepp, and Lochelt, 2002; Schwantes et al., 2003).

1.3 APOBEC3

Um sich gegen die Vielzahl von Pathogenen verteidigen zu können, haben vielzellige Organismen verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, die allgemein in angeborenes (engl.: innate) Immunsystem und erworbene, adaptive Immunantwort eingeteilt werden (Liddament MT, 2004). Während die adaptive Immunantwort unter innaten zytotoxische T-Zellen und Antikörper umfasst, zählen zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems proteolytische Kaskaden, Signalmoleküle wie Interferone, antimikrobielle Peptide und spezielle phagozytierende Zellen. Einen weiteren Bestandteil des angeborenen Immunsystems bildet die

Gruppe der APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide) Proteine, die zu der großen Familie der DNA- oder RNA-Cytidineaminasen gehören und die die Ausbreitung diverser Retroviren, Retrotransposons und einiger anderer Viren verhindern (Jarmuz et al., 2002). Somit schützen sie das zelluläre Genom vor eindringenden Nucleinsäuren. Alle Proteine dieser Familie haben ein oder zwei Deaminase-Motive einschließlich der Sequenz His-Xaa-Glu-Xaa₂₃₋₂₈-Pro-Cys-Xaa₂₋₄-Cys (Huthoff and Malim, 2005). Dabei koordinieren das Histidin und die zwei Cystein-Reste ein Zn²⁺-Ion, während der Glutaminsäurerest für die Protonenübertragung verantwortlich ist (Liddament MT, 2004). Diese katalytische Reaktion bewirkt eine hydrolytische Deaminierung an der C4-Position der Cytidin-Base und wandelt Cytidin (C) zu Uracil (U) um (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Zhang, 2003). Abb. 1.4 stellt die Deaminierungsreaktion in einer Reaktionsgleichung dar.

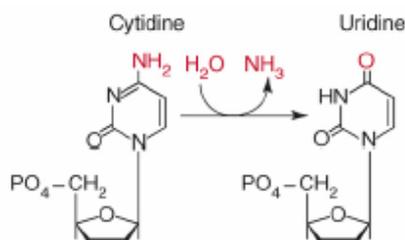


Abb. 1.4: Reaktionsgleichung der Cytidineaminierungsreaktion katalysiert durch APOBEC Enzyme (modifiziert nach Malim, 2007). Hierbei wird Cytidin durch die Addition von Wasser und der Abspaltung einer Aminogruppe zu Uracil konvertiert. Dieser Vorgang wird auch als „Editierung“ (engl.: „editing“) bezeichnet (Simpson, 1999).

Im Menschen umfasst die APOBEC3-Familie AID (hAID), APOBEC1 (hA1), APOBEC2 (hA2), APOBEC3A-APOBEC3H (hA3A-hA3H) und APOBEC4 (hA4), die auf dem Chromosom 22 ein cluster bilden (Conticello et al., 2005; Jarmuz et al., 2002). Abb. 1.5 zeigt die graphische Darstellung der humanen APOBEC Proteine.

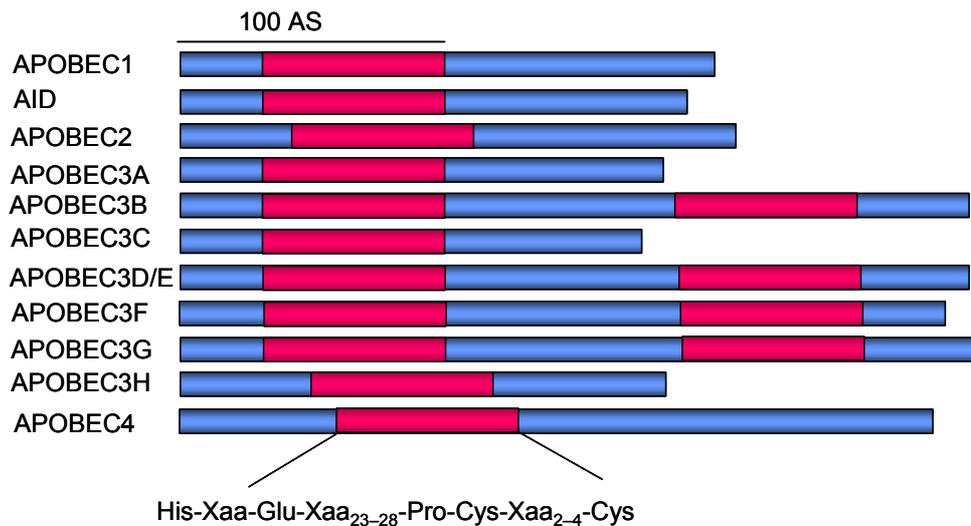


Abb. 1.5: Graphische Darstellung der Domänenorganisation der humanen APOBEC Proteine (modifiziert nach (Holmes RK, 2007)). Die roten Balken markieren die Cytidineaminase Motive. Unterhalb der Abbildung ist die Konsensussequenz angezeigt.

Wesentlicher Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das APOBEC3-Protein, weshalb im Folgenden vertieft darauf eingegangen wird. Humane A3-Gene sind in verschiedenen Geweben exprimiert, die entweder mit endogener oder exogener retroviraler Replikation verbunden sind, z.B. Hoden, Eierstöcke und stimulierte bzw. unstimulierte PBLs (Schumann, 2007). Die humanen A3-Proteine hA3G (Opi S, 2006; Zennou and Bieniasz, 2006), hA3F (Bishop et al., 2004; Liddament MT, 2004) (Wiegand, 2004) (Yang et al., 2007; Zheng et al., 2004) und im geringeren Umfang hA3DE (Dang, 2006) bilden wichtige Restriktionsfaktoren gegen HIV-1. Humane A3 Proteine werden in der virusproduzierenden Zelle in Virionen verpackt und erreichen so die Zielzelle (Svarovskaia, 2004). Dort binden sie an den einzelsträngigen Minus-DNA-Strang, der während der reversen Transkription gebildet wird und deaminieren Cytosine zu Uracil (Suspène R, 2004; Yu, 2004). Während der reversen Transkription wird nachfolgend Uracil von der Reversen Transkriptase als Thymin erkannt und in den plus-DNA-Strang Adenin (A) anstelle eines Guanins (G) eingefügt. Diese vermehrte Anhäufung von G- zu A-Mutationen, auch „Hypermutation“ genannt, führt schließlich zum völligen Informationsverlust des Genoms (Harris, 2003; Mangeat et al., 2003; Zhang, 2003). Uracil-N-Glycosylasen degradieren zudem durch die Uracile im proviralen DNA-Genom dessen Degradation (Bishop, Holmes, and Malim, 2006; Kaiser, 2006; Mangeat et al., 2003; Mariani, 2003).

HIV-1 hat im Laufe der Co-Evolution von Virus und Wirtszelle zur Gegenabwehr das akzessorische Vif (virion infectivity factor)-Protein entwickelt (Gabuzda, 1992; Simon, 1996; von Schwedler, 1993). Vif greift A3G oder -F an und löst dessen proteasomale Degradation aus, was gleichzeitig dessen Verpackung in Virionen verhindert (Kao, 2003; Mariani, 2003; Marin, 2003; Sheehy, Gaddis, and Malim, 2003; Stopak, 2003). Dabei wirkt Vif als Adapterprotein, das A3G und -F mit einer Ubiquitin-Ligase einschließlich Elongin B, Elongin C, Cullin 5 und Ring box-1 verbindet und dabei eine Polyubiquitinierung mit anschließender proteasomaler

Degradation auslöst (Yu X, 2003). Zusätzlich zu der degradativen Aktivität verhindert Vif auch die *de novo* A3G Synthese (Stopak, 2003). Einzig hA3B ist in der Lage, sowohl HIV-1, als auch Vif-deletiertes HIV-1 (HIV Δ Vif) zu inhibieren, wird jedoch in primären T-Zellen nur schwach exprimiert (Bishop et al., 2004; Cullen, 2006; Doehle, 2005; Rose, 2005). Abb. 1.6 fasst die deaminierungsabhängige antivirale Aktivität der A3-Proteine schematisch zusammen.

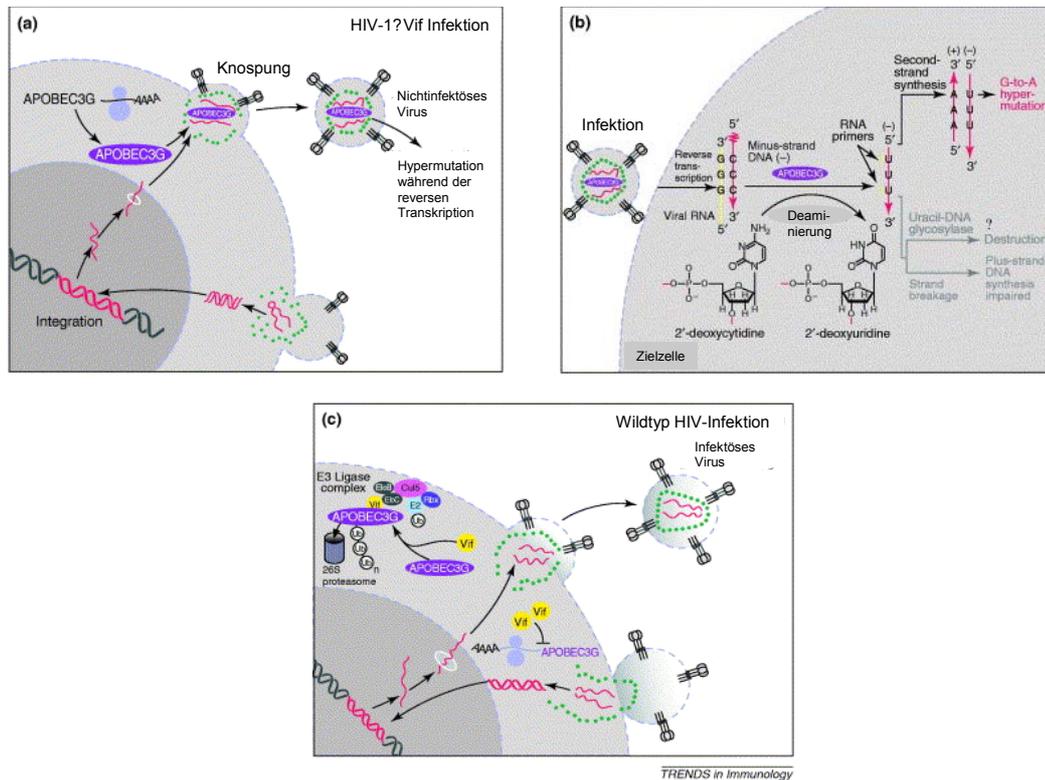


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der deaminierungsabhängigen antiviralen Aktivität von A3-Proteinen und der Abwehr durch HIV-1 Vif (Chiu and Greene, 2006). a, b Letale Editierung der reversen Transkripte von HIV-1 durch virioninkorporierte Cytidindeaminasen. In Abwesenheit von Vif wird A3G (violett) effizient in knospende Virionen inkorporiert (a) und löst während der reversen Transkription in der Zielzelle eine extensive Deaminierung der Cytidinreste im Minusstrang der viralen einzelsträngigen DNA aus b. Durch die daraus resultierenden dG- zu dA-Austausche im viralen Plusstrang bzw. durch den Abbau des uracilhaltigen Minusstrangs mittels Uracil-DNA-Glycosylasen wird die HIV-Replikation effektiv blockiert. c) Neutralisation der A3 Proteine durch Vif. Vif wirkt der antiviralen Aktivität von A3G und -F (im Bild nicht gezeigt) durch die Rekrutierung des E3 Ligasekomplexes (Rbx1, Cullin5, Elongine B und C und E2-Ub) entgegen. Dabei fungiert es als Substraterkennungseinheit zur Induktion der Polyubiquitinierung dieser antiviralen Enzyme und führt sie indirekt zu einer beschleunigten Degradation durch das 26S Proteasom. Zusätzlich verhindert Vif teilweise die Translation der A3G mRNA. Dieser bimodale Mechanismus entfernt A3 aus der Zelle und resultiert in der Produktion voll infektiöser Virionen.

Bei einigen Studien stellte sich die Frage, ob der inhibitorische Effekt der A3-Proteine allein durch die Deaminaseaktivität zustande kommt, da ein starker antiviraler Effekt auch ohne Hypermutation beobachtbar ist (Bishop, Holmes, and Malim, 2006; Holmes, Malim, and Bishop,

2007; Newman et al., 2005; Opi S, 2006; Shindo et al., 2003). Daher nimmt man an, dass A3-Proteine neben der deaminierenden Aktivität noch über einen weiteren editing-unabhängigen antiviralen Mechanismus verfügen, der allerdings bislang nicht vollständig geklärt wurde. Es wird vermutet, dass A3-Proteine zelluläre HIV-Transkripte direkt zur zellulären Endonuklease führen (Holmes, Malim, and Bishop, 2007).

Die hA3G-HIV Interaktion ist ein wichtiges Kriterium für die Speziespezifität von HIVs und dem verwandten SIV (Engl.: Simian *Immunodeficiency Virus*). Eine zoonotische Infektion kann nur auftreten, wenn das Vif-Protein des übertragenen Virus hA3G bindet und eine Degradation induzieren kann (Cullen, 2006). So kann beispielsweise das Vif-Protein des HIV-1 und des Schimpansen SIV (SIVcpz, Engl.: chimpanzee) die Degradation von hA3G induzieren und somit Menschen infizieren. Andererseits ist hA3G resistent gegen das Vif-Protein des SIVagm (Engl.: *african green monkey*), sodass dieses Virus nicht Menschen infizieren kann. Die Speziespezifität der Vif-APOBEC-Interaktion ist auf einen einzelnen Aminosäureunterschied in A3G an der AS-Position 128 zurückzuführen (Yu Q, 2004).

Interessanterweise ist agmA3G einerseits resistent gegen HIV-1 Vif aber andererseits sensibel für SIVagm Vif (Cullen, 2006; Mariani, 2003). Die Speziespezifität der A3-Proteine zu den Primaten-Retroviren sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1 Spezies-spezifische Suszeptibilität der Primaten A3Gs bezüglich der Vif-Proteine verhindert Kreuzinfektionen von Retroviren. (Modifiziert nach Greene, 2006)

A3G protein	Vif protein				
	HIV	SIVcpz	SIVsm	SIVagm	SIVmac
Human	Yes	Yes ^c	Yes ^c	No	Yes
Chimpanzee	Yes	Yes	N.d.	No	Yes
African green monkey	No	N.d.	N.d.	Yes	Yes
Rhesus macaque	No	N.d.	N.d.	No	Yes

Abkürzungen: mac, Rhesus *macaque*; sm, (engl.: sooty *mangabey*) Mangabe; N.d., nicht untersucht. c: SIV Vif aus Schimpansen und Mangaben neutralisieren hA3G. SIVcpz wurden SIVsm dadurch wahrscheinlich auf Menschen übertragen und entwickelten sich so zu HIV-1 und HIV-2.

Die Interaktion zwischen Vif und A3 ist folglich Speziespezifisch und verhindert somit möglicherweise Zoonosen (Mariani, 2003). Des Weiteren supprimiert hA3G die Replikation von EIAV (*equine infectious anemia virus*) (Mangeat et al., 2003), MLV (*Murines Leukämie Virus*) (Bishop et al., 2004; Harris, 2003; Kobayashi et al., 2004; Mangeat et al., 2003) und FV (Delebecque et al., 2006; Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass einige hA-Proteine auch verschiedene Retrotransposons (Esnault et al., 2005; Esnault et al., 2006; Schumacher AJ, 2005) sowie HBV (*Hepatitis B Virus*) (Esnault et al.,

2006; Noguchi, 2005; Rosler et al., 2005; Suspene, 2005) und das Parvovirus AAV (Adeno assoziiertes Virus) (Chen, 2006) inhibieren.

1.3.1 Die antivirale Aktivität der A3-Proteine gegen FV

Sowohl FFV als auch PFV sind für die Restriktion durch feline bzw. humane A3-Proteine empfänglich, wenn Bet deletiert oder funktionell inhibiert wird. In Folge dessen werden in neu entstandener viraler DNA Hypermutationen nachgewiesen (Delebecque et al., 2006; Löchelt et al., 2005; Russell et al., 2005). Besonders *Bet*-trunkiertes FFV wird durch felines APOBEC3C-a (in Abschnitt 1.4 erläutert) unterdrückt (Löchelt et al., 2005), während hA3G, hA3F, mA3, agm A3G und cpzA3G *Bet* defizientes PFV inhibieren (Delebecque et al., 2006; Russell et al., 2005). Da die überwiegende DNA-Synthese vor der Partikelfreisetzung stattfindet, tritt die G- zu A-Editierung wahrscheinlich schon in der virusproduzierenden Zelle auf.

Unklar ist dabei noch, wie das virale *Bet*-Protein die von APOBEC3 ausgelöste Blockade der FV-Replikation überwindet. In den neusten Studien wurde bislang gezeigt, dass *Bet*-defiziente FV durch APOBEC3C-a inhibiert werden und dass durch Coexpression der entsprechenden *Bet* Proteine der virale Titer des FV weitgehend wieder hergestellt werden kann (Löchelt et al., 2005). Es ist bekannt, dass das PFV-*Bet*-Protein an hA3G, hA3F und cpzA3G bindet und die Verpackung dieser Proteine in PFV-Viruspartikel inhibiert (Delebecque et al., 2006; Russell et al., 2005). *Bet* wird als ein cytoplasmatisches Protein exprimiert und zeigt keine Sequenzhomologie zu HIV-Vif. Das *Bet*-Protein weist keine SOCS-box auf, ein Motiv, mit dem die Ubiquitin E3-Ligase an hA3G und -F bindet (Cullen, 2006). Im Gegensatz zu HIV-Vif führt die Expression von *Bet* nicht zu einer Reduktion der APOBEC-Expression (Löchelt et al., 2005).

Die Fortschritte in der Erforschung der Funktion von A3-Proteinen eröffnen neue Ansatzpunkte für anti-HIV-Therapien. So könnte beispielsweise die Entwicklung kleiner Inhibitormoleküle, welche die Assoziation von Vif und A3G/3F unterbrechen oder die Rekrutierung durch Vif zur E3-Ligase inhibieren, einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen. Dazu ist es wichtig, die Interaktionsseiten beider Proteine auf molekularer Ebene zu identifizieren (Stopak, 2005).

APOBEC3-Proteine inhibieren ein breites Spektrum an Retroviren und LTR-Retrotransposons. Daher ist es wichtig zu wissen, auf welche Weise APOBEC3-Proteine die verschiedenen Viren bzw. genomischen Parasiten erreichen und das Pathogen-assoziierte molekulare Profil dieser Viren und virusartige Elemente erkennen.

1.4 Das Feline APOBECA3

Die Hauskatze (*Felis catus*) dient als bewährtes Tiermodell für genetische-, pharmakologische- und Nahrungsmittelstudien (O'Brien SJ, 2002). Des Weiteren werden virale Infektionen und

Krankheitsverläufe in der Hauskatze als Versuchsmodell untersucht (Burkhard MJ, 2003). Da beispielsweise das *Feline Immunodefizienzvirus* (FIV) viele Eigenschaften mit dem HIV gemeinsam hat, dienen FIV-infizierte Katzen als wichtiges Modell für HIV/AIDS hinsichtlich der Entwicklung möglicher Therapien, Impfstoffe und der Untersuchung der Pathogenese (Münk, 2008; Münk et al., 2008; Paul et al., 2007). A3-Proteine stehen als ein Teil des angeborenen Immunsystems gegen Retroviren unter besonders hohem adaptiven Druck (OhAinle et al., 2006; Sawyer SL, 2004; Zhang and Webb, 2004). Daher ist die Untersuchung ihrer evolutionären Expansion von großer Bedeutung, um Aufschluss über die speziesspezifische Suszeptibilitäten der A3-Formen zu erhalten.

Während Primaten sieben hA3 Gene codieren (hA3A bis -H), wurde bisher eine Diversifikation von A3 in anderen Vertebraten ausgeschlossen (Mariani et al., 2003). Kürzlich wurden nach Analyse des genomischen A3-Lokus auf dem Chromosom B4 mittels einer RACE-PCR-Kombination im Genom der Hauskatze (*Felis catus*) mehrere *feline APOBEC3 (feA3)*-Gene identifiziert und charakterisiert (Münk, 2008; Münk et al., 2008; Münk et al., 2007). Bislang war nur ein *feA3*-Gen bekannt (Löchelt et al., 2005). Diese Untersuchungen wurden in CrFK- (engl.: *Crandell feline kidney cells*, Katzennieren-Zellen), Mya-1- (feline T-Zelllinie) und KE-R-Zellen (Fibroblasten) durchgeführt. Abb 1.7 zeigt die schematische Darstellung der *feA3*-Gene und ihre Expression.

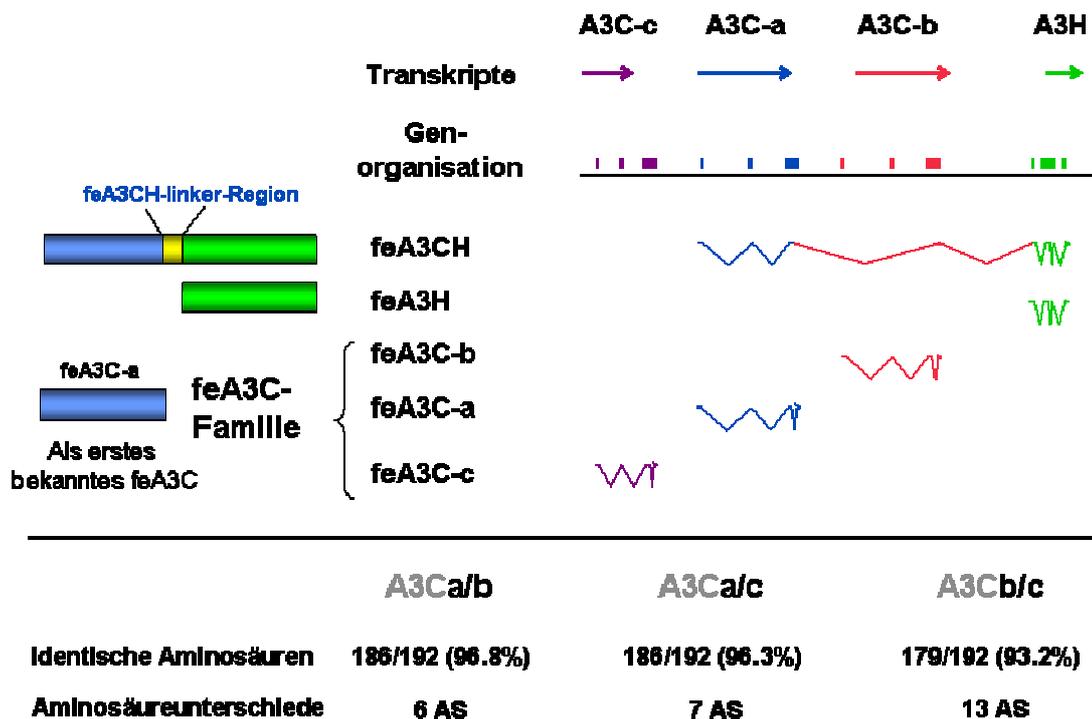


Abb 1.7: Schematische Darstellung der Lokalisation der *feA3*-Gene und der Expression der *feA3*-Proteinfamilie (modifiziert nach Dr. C. Münk). Der *feA3*-Lokus durchlief eine Triplikation der *feA3C*-Gene, während *feA3H* nur in einer Kopie existiert. Des Weiteren wird im Zuge eines Durchlauf-Leserasters das Zwei-Domänen-*feA3CH* exprimiert. Die *feA3C*-Gene und das *feA3H*-Gen sind im Katzen genom direkt hintereinander angeordnet. Unterhalb der Abb. sind die Identischen Aminosäuren der *feA3C*-Proteine miteinander verglichen, sowie die Anzahl der nicht identischen AS angezeigt.

Das Katzen genom enthält ein *feA3H*-Gen und drei sehr ähnliche *feA3C*-(a-c)-Gene, die wahrscheinlich aus zwei konsekutiven Genduplikationen entstanden sind (Münk et al., 2008). Neben dem bereits bekannten und beschriebenen *feA3*-Protein (Löchelt et al., 2005), das als *feA3C*-a identifiziert wurde, existieren folglich noch die Formen *feA3C*-b und -c. Diese *feA3*-Gene weisen eine signifikante Homologie (48,5%) zur zweiten Domäne des *hA3F*-Gens auf (Löchelt et al., 2005; Yuhki et al., 2003). Des Weiteren wurde neben den vier Ein-Domänen A3 Proteinen ein fünftes A3-Protein (A3CH) entdeckt, das durch ein Durchlauf-Leseraster und alternatives Splicen entsteht.

Während in Menschen und Primaten die Spezifikation der verschiedenen A3-Proteine gegen diverse Retroviren und Retrotransposons eingehend untersucht wurde, ist die Spezifikation der *feA3*-Proteine bezüglich feliner Retroviren noch unbekannt (Löchelt et al., 2005).

Im Gegensatz zu HIV-Vif, das humanes A3G durch Ubiquitinierung und anschließender proteasomaler Degradation abbaut (Mehle et al., 2004; Sheehy, Gaddis, and Malim, 2003; Stopak et al., 2003; Yu X, 2003), ist der Inhibitionsmechanismus von *feA3C*-a- (Löchelt et al., 2005) und humanen A3A, -C, -F, G-Proteinen (Russell et al., 2005) durch die Anwesenheit von

FFV-Bet bzw. PFV-Bet weitgehend unklar. Auch gibt es bislang wenige Informationen über die Interaktion der feA3-Proteine mit FFV-Gag und die Verpackung in FFV-Virionen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die genomische Analyse der APOBEC3-Region der Hauskatze (*F. catus*) unterscheidet sich wesentlich vom APOBEC3-Lokus anderer Säugetiere. Das Katzen genom codiert für drei APOBEC3C-Kopien, die hintereinander auf dem Chromosom B4 lokalisiert sind. Die drei feA3C-Isoformen unterscheiden sich in 6 bzw. 7 Aminosäuren. Neben dem Nachweis von drei sehr ähnlichen feA3C-Genen und einem feA3H-Gen wird post-transkriptionell durch alternatives Spleißen ein zwei-Domänen feA3CH-Fusionsprotein gebildet.

Die Zielsetzung dieser experimentellen Arbeit gliedert sich in drei Teile: Zunächst sollen die drei beschriebenen feA3-Proteine, feA3C-a, -H und -CH, von denen bislang nur zelluläre mRNA nachgewiesen worden waren, auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dazu sollen im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antikörper generiert werden, die die endogenen feA3-Proteine (feA3C-a, -H und -CH) in Katzenzellen detektieren.

Im zweiten Teil der Arbeit soll eine umfassende Analyse der feA3-Proteine bezüglich ihrer antiviralen Aktivität gegen Bet-deletiertes FFV durchgeführt werden. Die antivirale Aktivität des feA3C-a als Cytidineaminase war zu Beginn der Arbeit bereits bekannt und sollte mit den anderen vier feA3-Proteinen (feA3C-b, -c, -H, -CH) bezüglich Wildtyp (wt) FFV, Bet-mutiertem, Bet-trunkiertem oder Bet-freiem FFV verglichen werden. Des Weiteren soll der protektive Mechanismus von Bet gegen die feA3-Proteine analysiert und mit dem von FIV-Vif verglichen werden: Durch den Vergleich von FFV-Bet und einer mutierten FFV-Bet-Form soll die Bindungsstelle des FFV-Bet an die feA3-Proteine in Proteininteraktionsstudien ermittelt werden. Analog soll die Interaktion aller feA3-Formen mit FFV-Gag analysiert und die Inkorporation in Virionen Bet-defizienter FFV-Genome untersucht werden. Da hu APOBEC3-Formen als Dimere vorliegen müssen, um katalytisch aktiv zu sein, sollte analysiert werden, ob eine analoge Dimerisierung auch für die felines APOBEC3C-Proteine bestätigt werden und ob der inhibitorische Mechanismus von FFV-Bet eventuell auf der Unterbrechung dieser Dimerisierung basiert. Gleichzeitig soll ein möglicher trans-dominant-negativer Effekt der einzelnen feA3-Formen nach Cotransfektion auf die antivirale Aktivität gegen Bet-defizientes FFV untersucht werden. Katalytische und strukturelle Mutanten des feA3C-a sollen kloniert werden, um eine Korrelation der antiviralen Aktivität des feA3C-a und dessen Deaminierungsaktivität überprüfen zu können. Auch diese katalytischen und strukturellen feA3C-a Mutanten sollen auf Interaktion mit FFV-Gag und FFV-Bet sowie ihrer Inkorporation in Bet-trunkierte FFV-Virionen hin überprüft werden.

Als Resultat der vergleichenden Studien von FFV-Bet und FIV-Vif soll ein chimärer FFV-Vif-Vektor kloniert werden, um die protektive Wirkung von FIV-Vif gegen die feA3-Proteine im foamyviralen Kontext zu untersuchen. Anschließend soll dieser chimäre FFV-Vif-Vektor in Langzeitpassagen auf CrFK-Zellen im Vergleich zu wt FFV untersucht werden. Diese Daten sollen Aufschluss über die Effizienz der Replikation, Stabilität und Transduktion des chimären FFV-VIF-Vif-Vektors Aufschluss geben und damit als Grundlage für einen prophylaktischen Vakzinevektor dienen.

2 MATERIAL

2.1 Puffer und Lösungen

2.1.1 Allgemeine Lösungen

2 x HBS 50 mM 4-2-(hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES)
 280 mM NaCl
 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,13

PBS 8 mM Na₂HPO₄
 1,5 mM KH₂PO₄
 140 mM NaCl
 2,6 mM KCl, pH 7,4

TE 1 mM Tris
 0,1 mM EDTA, pH 8,0

EDTA 0,5 M pH auf 8.0 einstellen

2.1.2 Puffer für Arbeiten mit DNA

DNA-Probenpuffer 40% Saccharose
 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanol

TENS 0,25% SDS
 0,1 M NaOH in TE

Ethidiumbromid-Lösung Lösung: 2 µg Ethidiumbromid/ml

TAE 40 mM Tris-Acetat
 1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.3 Puffer für proteinbiochemische Techniken

Zellysepuffer	1% SDS in PBS 1000-fach Proteaseinhibitor
TLB-Puffer	20 mM Tris 137 mM NaCl 10% Glycerin 2 mM EDTA 1% Triton X-100 50 mM Na ⁺ -β-Glycerophosphate 1000-fach Proteaseinhibitor, pH 7.4
Tris-Puffer 1	10 mM Tris, pH 8,8
Tris-Puffer 2	10 mM Tris, pH 7,5
Tris-Puffer 3	1 M Tris, pH 8
Triethylamin-Puffer	100 mM Triethylamine, pH 11,5
Tris-NaCl-Puffer	500 mM NaCl, 10mM Tris, pH 7,5
Elutionspuffer	100 mM Glycin, mit HCl auf pH 2,5
Tris-HCl-Puffer	50mM Tris, mit HCl auf pH 9,5
PBS-TX100-Puffer	PBS, 0,1% Triton-X100
PBS-Tween	PBS, 1% Tween

2.1.4 SDS-Gelelektrophorese- und Immunoblot-Puffer

Proteingel-Laufpuffer NuPage: MOPS SDS Buffer	50 mM MOPS (3-N- (Morpholino)propansulfonsäure) 50 mM Tris 0,1% SDS 1 mM EDTA, pH 7,7
Proteingel-Laufpuffer NuPage: MES SDS Buffer	50 mM MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) 50 mM Tris 0,1% SDS 1 mM EDTA, pH 7,3
Lösung A	30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid
Lösung B	1,5 M Tris 0,4% SDS, pH 8,8
Lösung C	0,5 M Tris 0,4% SDS, pH 6,8
Transfer-Puffer	25 mM Bicine 25 mM Bis-Tris 1 mM EDTA, pH 7,2
5-fach Ladepuffer	313 mM Tris-HCl 10% SDS 0,05% Bromphenolblau 50% Glycerin 0,5 M DTT, pH 6,8

2.1.5 β -Galactosidase-Assay

Fixierlösung	1% Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd 1 mM MgCl ₂ in PBS
Färbelösung	4 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] (II); 4 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] (III) 4 mg/ml X-Gal 1 mM MgCl ₂ in PBS

Sofern nichts anderes genannt ist, sind alle Puffer und Lösungen in zweifach destillierten Wasser (dd H₂O) angesetzt.

2.2 Zellen

293T-Zellen: Für die Transfektion wurde eine Adenovirus-immortalisierte humane embryonale Nierenzelllinie verwendet, die das Gen für das SV40 T-Antigen stabil im Genom integriert trägt (DuBridge RB, 1987).

CrFK-Zellen: (Crandell feline kidney cell) wurden für FFV-Infektionen und Transduktionen verwendet (Flower RL, 1985; Winkler et al., 1998).

FeFAB-Zellen: Genetisch veränderte CRFK-Zellen, die das β -Galactosidase-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des FFV-LTR-Promotors tragen und die eine schnelle und effiziente Quantifizierung FFV-haltiger Zellkulturüberstände erlauben (Zemba et al., 2000)

2.3 Bakterienstämme

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Stämmen wurden JM109 (Novagen, Bad Soden) und One Shot® TOP10 ElectrocompTM Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden BL21-Expressionsbakterienkulturen verwendet.

2.4 Vektoren und Plasmide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Quelle/Referenz</i>
pcDNA3.1 ⁺	Invitrogen
pGEX-4T3	Amersham Bioscience
pCF-7	Schwantes et al. 2002
pCF7BBtr	Alke et. al 2000
pCF-Bet-Gfp	Schwantes et al. 2002
pGFP	Freundlicherweise überlassen von X. Xu
pFFV-Bet	Alke et al. 2000
pFFV-BetMCS	Alke et al. 2000
pFIV-Vif	Freundlicherweise überlassen von C. Münk
pfeA3C-a	Freundlicherweise überlassen von C. Münk
pfeA3C-b	Freundlicherweise überlassen von C. Münk
pfeA3C-c	Freundlicherweise überlassen von C. Münk
pfeA3H	Freundlicherweise überlassen von C. Münk
pfeA3CH	Freundlicherweise überlassen von C. Münk
pCF7BetMCS	Alke et. al 2000
pCF7UbiLacZ	Bastone et al 2007
pBCEnv	Bastone et al 2007

2.4.1 Foamyvirale Vektoren

In dieser Arbeit werden drei foamyvirale Vektoren verwendet, die im Folgenden erläutert werden sollen³ (Alke et al., 2001):

- pCF7: Ein replikationskompetenter Vektor, bei dem der 5'-LTR im proviralen Genom durch den starken „immediate early“-Promotor des humanen Cytomegalovirus (hCMV-IE) ausgetauscht wurde. (Abb. 2.1 a)
- pCF7BetMCS: Dieser replikationskompetente Vektor enthält eine multiple Klonierungsstelle (engl.: *multiple cloning site*, MCS) in der Bel 2/Bet-Sequenz. Abb. 2.1 zeigt die Lokalisation der MCS innerhalb des FFV-Genoms. (Abb. 2.1 b)

³ Kloniert von Dr. A. Alke

- pCF7BBtr: Entstand durch eine Trunkation des pCF7BetMCS beginnend in der MCS-Region bis zum ende des Bel 2 bzw. Bet, so dass Bel 2 auf 42 AS und Bet auf 116 AS-Reste verkürzt wurde. (Abb. 2.1 c))

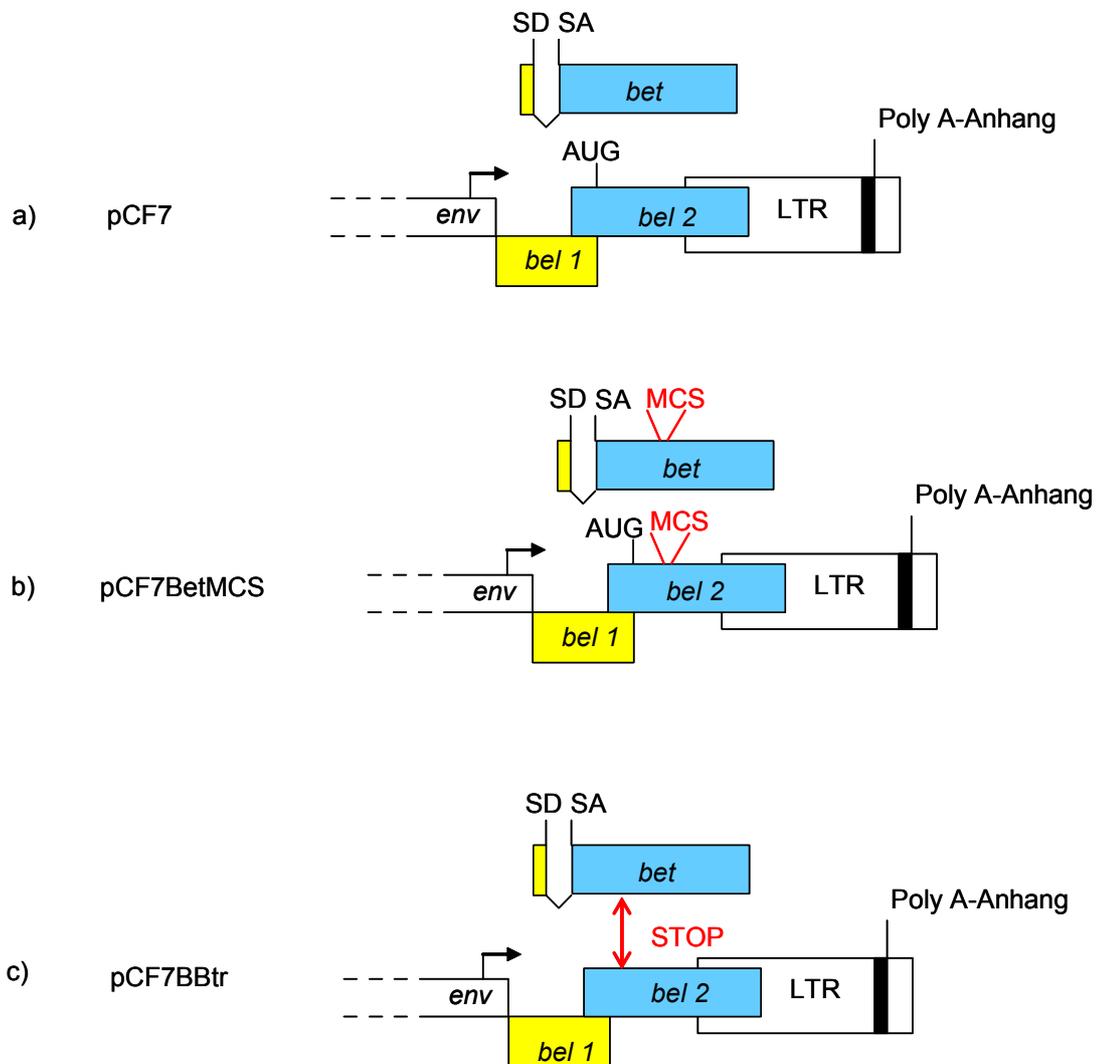


Abb. 2.1.:Schematische Darstellung der Vektoren pCF7, pCF7BetMCS und pCF7BBtr (modifiziert nach Dr. A. Alke). A Waagerechte Balken zeigen die Gene. B rote Markierung zeigt die Lokalisation der MCS-Stelle. C Senkrechter Pfeil zeigt die STOP-Sequenz. SD= Splice Donor; SA= Splice Akzeptor; AUG=Startcodon

2.5 Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt)
Protein A-Peroxidase	Sigma (München)
Protein G-Peroxidase	Sigma (München)
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Herculase TM Hotstart Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
CIP (engl.: calf intestine alkaline phosphatase),	New England Biolabs (Frankfurt)
Taq-DNA-Polymerase	GibcoBRL (Eggenstein)
RNaseA, 2 mg/ml in PBS	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Benzonase (Nuclease)	Sigma (München)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
DNase I	Roche (Mannheim)
MG132	Calbiochem (Darmstadt)

2.6 Molekulargewichtsmarker

DNA-Molekulargewichtsmarker

„Gene Ruler“ 1kb DNA Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot); Bandengrößen in Basenpaaren: 250; 500; 750; 1.000; 1.500; 2.000; 2.500; 3.000; 3.500; 4.000; 5.000; 6.000; 8.000; 10.000

Proteinmolekulargewichtsmarker

Vorgefärbter Proteinmarker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot); Bandengrößen in kDa: 170; 130; 100; 70; 55; 40; 35; 25; 15; 10

SeeBlue® Vorgefärbter Proteinmarker (Invitrogen, Karlsruhe); Bandengrößen in kDa in MOPS-Laufpuffer: 191; 97; 64; 51; 39; 28; 19; 14

SeeBlue® Vorgefärbter Proteinmarker (Invitrogen, Karlsruhe); Bandengrößen in kDa in MES-Laufpuffer: 188; 98; 62; 49; 38; 28; 17; 14; 6; 3

2.7 Antikörper und Antiseren

2.7.1 Primärantikörper

<i>Antikörper/Seren</i>	<i>Referenz/Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
Katzen-Vollserum „Katze 8014“	Alke et al. 2000	1:2.000
Maus-anti-HA Antikörper	Covance	1:1.000
Maus-anti- β -Aktin Antikörper	Sigma (München)	1:10.000
Kaninchen-anti-GST Antikörper		1: 5.000
Maus anti-Tag Antikörper		1:7.500
Maus anti-GFP Antikörper	Sigma (München)	1:500
Kaninchenserum anti-FFV-Bel 2/Bet (α -Bet)	Bodem et al. 1998	1:2.000
Kaninchenserum anti-feA3C-a, feA3H, feA3CH-Linker-Domäne		1:500
Huhn-anti-V5 Antikörper	Sigma (München)	1:500

2.7.2 Sekundärantikörper

<i>Antikörper/Seren</i>	<i>Referenzen/Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt	Sigma (München)	1:5.000
Ziege anti-Maus IgG Peroxidase gekoppelt	Sigma (München)	1:5.000
Ratte anti-Maus IgG Peroxidase gekoppelt	Natutec	1:1.000

2.8 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
ECL™ Western Blot Kit	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Topo TA Cloning ® Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Lipofectamine™2000	Invitrogen (Karlsruhe)

2.9 Medien

2.9.1 Medien für die Zellkultur

<i>Medium</i>	<i>Hersteller</i>
DMEM	GibcoBRL (Eggenstein) komplettiert mit FCS und PS (siehe unten)
Fötales Kälberserum (FCS)	Einsatz: 10%, GibcoBRL (Eggenstein)
Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin)	GibcoBRL (Eggenstein)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml PenicillinG, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Einsatz: 1%, GibcoBRL (Eggenstein)
G418 Sulfat	Sigma (München)
Einfriermedium	70% DMEM 20% FCS 10% DMSO

2.9.2 Medien für die Bakterienkultur

<i>Medium</i>	<i>Hersteller/Ansatz</i>
Luria-Bertani (LB)-Medium	GibcoBRL (Eggenstein)
LB-Agar	GibcoBRL (Eggenstein)
SOC-Medium	2% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose, pH 7,0

Die Medien für die Bakterienkultur wurden unter Standardbedingungen durch Autoklavieren sterilisiert und sowohl LB-Medium als auch LB-Agar wurde nach Abkühlen entsprechend der Bakterienresistenz mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml Roche, Mannheim) versetzt.

2.10 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden üblicherweise von folgenden Firmen bezogen: *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *AppliChem* (Darmstadt), *Fluka* (Buchs, Schweiz), *Sigma-Aldrich* (Steinheim), *Pierce* (Rockford; USA)und *Gibco* (Karlsruhe).

2.11 Fotografisches Material

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
Hyperfilm™ ECL™	Amersham (Freiburg)
Entwickler	AGFA (Köln)
Fixierer G 334i	AGFA (Köln)

2.12 Verbrauchsmaterialien

Bakterienkulturschalen, *Greiner* (Nürtingen)

Deckgläschen, *Langenbrinck* (Emmendingen)

ECL-Filme Hyperfilm™, *Amersham* (Uppsala, Schweden)

Einweghandschuhe Gentle Skin™, *Meditrade* (Kiefersfelden)

Einwegpipetten, *Falcon* (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)

Einwegpipettenspitzen, *Greiner* (Frickenhausen)

Einwegskalpelle, *PFM* (Köln)

Elektroporationsküvetten, *Eurogentec* (Seraing, Belgien)

Eppendorfreaktionsgefäße, *Eppendorf* (Hamburg)

Falcon Reaktionsgefäße, *Greiner* (Frickenhausen)

Glas-Objektträger, *R. Langenbrick* (Emmerdingen)

Haushaltsfolie, *Melitta* (Minden)

Kryoröhrchen, *Nalgene* (Rochester, USA)

Nitrozellulose Membran PROTRAN, *Schleicher und Schuell* (Dassel)

Multi-Loch-Zellkulturplatten, *Corning Inc.* (Corning, USA)

Objektträger, *Langenbrinck* (Emmendingen)
PCR-Reaktionsgefäße, *Eppendorf* (Hamburg)
QIAshredder®, *Qiagen* (Hilden)
Sterifilter (Ø 0,45 µm), *Renner* (Dannstadt)
Trocknerfolien, *Promega* (Madison)
Ultrakonzentratoren VIVASPIN, *Satorius A* (Göttingen)
Ultrazentrifugationsröhrchen, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Whatmann-Papier 3 MM, *Schleicher & Schuell* (Dassel)
Zellkulturflaschen, *Nunc* (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturschalen, *Sarstedt* (Nürnbrecht)
Zentrifugationsröhrchen (PP und PS, 15 und 50 ml), *Greiner* (Frickenhausen)

2.13 Geräte

Agarosegel-Kamera, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Agarosegel-Elektrophoresekammern, *Renner* (Darmstadt)
Analysewaage Type 1419, *Satorius* (Göttingen)
Begasungsbrutschrank Steril-Cult 200, *Labotect* (Göttingen)
Easy Image Gel-Dokumentationssystem, *Herolab* (Wiesloch)
Eismaschine AF-3, *Scotsman* (Glasgow, England)
Entwicklermaschine Classic E.O.S., *Agfa* (Leverkusen)
Elektroporationgerät Gene Pulser II, *Bio-Rad* (München)
Feinwaage Modell BP110P, *Mettler* (Gießen)
Filmkassetten, *Siemens* (Stuttgart)
Fluoreszenz-Mikroskop, *Leitz* (Wetzlar)
Gefrierschrank, *Liebherr* (Heidelberg)
Homogenisierer Emulsifex 05, *Avestin* (Canada)
Kühl-Tischzentrifuge 5417.R, *Eppendorf* (Hamburg)
Magnetrührer, *Ika Labortechnik* (Staufen)
Mikroskop CKS, *Olympus* (Heidelberg)
Mikrowellenherd, *AEG* (Frankfurt)
MiniCycler™ MJ Research, *Waltham* (MA, USA)
Minifuge RF, *Heraeus* (Osterode)
Neubauer Zählkammer, *Neolab* (Heidelberg)
pH-Meter CG822, *Schott* (Mainz)
Pipettierhilfe (Pipetboy), *IBS Integra* (Fernwald)
Pipetten, *Gilson Abimed* (Langenfeld)

Reinraumwerkbank Biogard Hood Baker Company, Sanford (Maine, USA)
Rotoren GSA und F28/50, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Rotor SW41Ti, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Schüttler Rockomat, *Tecnomara* (Göttingen)
SDS-PAGE-Apparatur, *Invitrogen* (Hercules, USA)
Speed Vac Concentrator, *Bachhofer Laborgeräte* (Reutlingen)
Spektralphotometer, *Hitachi* (Tokio, Japan)
Stromquelle, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Thermomixer 5437, *Eppendorf* (Hamburg)
Tischschüttler IKA-VIBRAX-VXR, *Jahnke & Kunkel* (Staufen)
Tischzentrifuge mit Kühlung 5417R, *Eppendorf* (Hamburg)
UV-Flächenstrahler, *Konrad Benda* (Wiesloch)
Überkopfschüttler, *Heidolph* (Rust)
Ultraschallgerät, *Branson* (Danbury, USA)
Ultrazentrifuge, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
UV-Vis-Spektrophotometer UV-1202, *Shimadzu* (Duisburg)
Vortex (Vibrationsmischer) VF2, *Jahnke & Kunkel* (Staufen)
Wasserbäder, *GFL* (Burgwedel)
Wasserentsalzungsanlage NANOpure, *Bernstead* (Dubuque, Iowa, USA)
Wippschüttler, silent rocker, *cti* (Idstein)
Western-Blot-Apparatur, *Invitrogen* (Hercules, USA)
Zentrifuge RC5C, *Sorvall Du Pont* (Wilmington, USA)

2.14 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Herrn Dr. W. Weinig, Abteilung Oligosynthese, DKFZ Heidelberg oder von der Firma Invitrogen (Hercules, USA), synthetisiert. Die homologen Bereiche der Primerpositionen sind durch deren jeweiliges 5'-Ende auf dem (+) oder (-)-Strang in der entsprechenden DNA-Sequenz angegeben. Die Positionen der hier angegebenen *feAPOBEC3*-spezifischen Primer beziehen sich auf die in Romen. et al und Münk et al angegebenen veröffentlichten *feAPOBEC3*-Sequenzen (Münk, 2008; Romen et al., 2006). Die zu diesen Bereichen homologe Sequenz ist fett gedruckt. Heterologe Bereiche der Primer dienen der Einführung von Punktmutationen oder zur Umklonierung in einen GST-Vektor und sind unterstrichen.

Name	Position in der entsprechenden Sequenz	Sequenz 5'-3'
<i>Klonierung der GST-Fusionskonstrukte</i>		
GST-feA3CH- Linker-Region- Sense-Primer	pfeA3CH 639	5' <u>CGAGTCGAATTC</u> CCTTAGTC CCGGCCAACAAAGAAAAAGAGAC 3'
GST-feA3CH- Linker-Region- Antisense-Primer	pfeA3CH 781	5' <u>GCATGAGTCGACTGTGGGTCTGG</u> GCAAGAGGAAGG 3'
GST-feA3C-a- Sense-Primer	pfeA3C-a 935	5' <u>CGAGTCGAATTC</u> AATGGAGCCCTGGC GCCCCAGC 3'
GST-feA3C-a Antisense-Primer	pfeA3C-a 1491	5' <u>GCATGAGTCGAC</u> CCTAAGGATTTCTTGAAGCTC 3'
GST-feA3H-Sense- Primer	pfeA3H 305	5' <u>CGAGTCGAATTC</u> AATGAAT CCACTACAGGAAGTC 3'
GST-feA3H- Antisense-Primer	pfeA3H 821	5' <u>GCATGAGTCGACTTCAAGTTT</u> CAAATTTCTGAGTC 3'
<i>Klonierung pCF7-Vif</i>		
bel 2-NheI-pr. cleav.- vif	pCFIV-Vif 10125	5' GCGGG <u>CTAGCGCCGCGGTACACACCGT</u> <u>CAAAGAGATGAGCGAGGGGACTGGCAG</u> 3'
Antisense intermediärer Primer U3 Agel vif	pCF7U3 10160	5' <u>GTGCTCTCCAAAGACCGGTTATCACAG</u> CTCGCCGCTCCACAGCAGATTCC 3'
Sense intermediärer Primer U3 Agel vif	pCF7U3 10160	5' GGAGGGCGAGCTGTGATA <u>ACCGGTC</u> TTTGAGAGCACAAAGCTGATG 3'
äußerer LTR Antisense Primer	pCF7 LTR 11180	5' CGCTCTGTTGCATGCCGCGC 3'
<i>Sequenzierungs-Primer der pCF7-Vif-Konstrukte aus den Langzeitpassagen</i>		
Sense Primer bel1- Region	pCF7-Vif bel1 9366	5' CCACTTCTGTTTGGACCTTACC 3'
Antisense Primer „Vif-Agel-Site“	pCF7-Vif bel1 10288	5' CAGCTTGTGCTCTCCAAAGC 3'
<i>Klonierung der feA3C-a-Mutanten</i>		
pfeA3C-a E/Q; C/S;E/Q+C/S Sense- Primer	pfeA3C-a 1120	5' CCATCCCTGGGGTCGATGC CATGCGC/GAACAAT/AGCTTCCTCTCTTG GTTCCC 3'

pfeA3C-a E/Q; C/S;E/Q+C/S Antisense-Primer	pfeA3C-a 1625	5' GGAGGGGCAAACAACAGATGG -3'
--	---------------	-------------------------------------

3 METHODEN

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Lagerung und Kultur von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien wurden *Escherichia coli* (*E.coli*) vom Stamm JM109 (Novagen, Bad Soden) oder One Shot® TOP10 Electrocomp™-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Anzucht der Kulturen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C in Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium unter Schütteln bzw. auf LB-Agarplatten. Die Medien wurden mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin (100µg/ml) versetzt, da alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide ein *Ampicillin Resistenzgen* (AmpR) für *Ampicillin* (Amp) tragen. Flüssigkulturen wurden mit einer geeigneten Menge an LB-Medium und dem jeweiligen Selektionsantibiotikum in einem entsprechend großen Gefäß, z.B. in einem Erlenmeyerkolben, angesetzt. Der Luftraum des Gefäßvolumens sollte 80% betragen. Das Animpfen des Nährmediums erfolgte mit einem sterilen Zahnstocher, mit dem eine geeignete Kolonie von einer Platte gepickt und dem Medium zugefügt wurde. Bei Plattenkulturen wurden die Bakterien mit einem Drigalski-Spatel auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen, welche das geeignete Selektionsantibiotikum enthielt. So wurden vereinzelte Kolonien erhalten.

Die Lagerung der Bakterien in Flüssig- bzw. Plattenkultur erfolgt bei 4°C bis zu zwei Wochen. Für eine längerfristige Lagerung wurden von der Flüssigkultur Glycerolkulturen angelegt und bei -80°C gelagert. Dazu wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 0,5 ml sterilisiertem Glycerin versehen.

3.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur erfolgreichen Plasmidaufnahme mussten transformationskompetente Bakterien hergestellt werden. Dazu wurde eine Flüssigkultur von 5 ml LB/Amp-Medium mit einer Kolonie des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde zu 500 ml LB/Amp-Medium gegeben, worauf eine erneute Kultivierung bei 37°C unter ständigem Schütteln bis zu einer OD_{595nm} von 0,5 erfolgte (exponentielles Wachstum). Nach Abkühlung der Kultur in einem Eis-NaCl-Gemisch auf 4°C wurden die Bakterien in einem GSA-Rotor für 5 Minuten bei 8000 rpm und 0°C abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden anschließend in 125 ml eiskaltem CaCl₂ (0,1 M) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation

(Bedingungen siehe oben) wurde das Bakterienpellet in einem Gemisch aus 21,5 ml CaCl₂ (0,1 M) und 3,5 ml 86%-igem Glycerin aufgenommen. Nicht direkt benötigte -Zellen wurden in 100µl-Aliquots in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Präparation im kleinen Maßstab („Miniprep“)

Für die Präparation von analytischen Plasmid-DNA-Mengen wurde eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Zhou, Yang, and Jong, 1990) angewandt. Einzelne Bakterienkolonien wurden in 4 ml LB-Ampicillin (100 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler kultiviert. Von den erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden je 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 sec). Die Überstände wurden verworfen und das Bakteriensediment im verbleibenden Medium (ca. 50 µl) durch Schütteln auf dem Vortexer („vortexen“) resuspendiert. Daraufhin wurde den Bakteriensuspensionen jeweils 250 µl TENS zugesetzt und gevortext. Durch Zugabe von 150 µl 3 M NaAc pH 5,2 und Zentrifugation (13.000 rpm, 2 min) wurden anschließend die Proteine und die chromosomale DNA gefällt. Der DNA-haltige Überstand wurde abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Zugabe von 1 ml Ethanol (-20°C) gefällt und abzentrifugiert (13.000 rpm, 2 min). Das DNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit je 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (20 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Die Proben wurden 15 Minuten bei 55°C inkubiert und mithilfe eines Restriktionsverdau zur Identifikation positiver rekombinanter Plasmid-Klone analysiert.

3.2.2 DNA-Präparation im großen Maßstab („Maxiprep“)

Um größere Mengen eines Plasmides aus transformierten Bakterien für den experimentellen Einsatz zu erhalten (ca. 500 µg), wurde 200 ml LB/Amp-Flüssigmedium mit 2ml einer Übernachtskultur angeimpft und diese Großkultur über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die anschließende Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden) und verlief nach dem Protokoll und mit den mitgelieferten Lösungen des Herstellers.

3.2.3 DNA-Mengenbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren erfolgte durch Messung ihrer optischen Dichte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurde eine geeignete Verdünnung der DNA-Lösung in H₂O hergestellt und 1 ml dieser Verdünnung im Photometer vermessen. Hierbei entsprach einer OD_{260nm} von 1 eine Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. eine Einzelstrang-DNA-Konzentration von 33 µg/ml. Proteinverunreinigungen von Nucleinsäure-Lösungen ließen sich durch den Quotienten aus OD_{260nm} und OD_{280nm} (aromatische Aminosäuren) bestimmen. Liegt dieser Wert zwischen 1,7 und 2,0, so gilt die DNA als ausreichend proteinfrei, ein Wert unter 1,7 ist ein Indiz für die Kontamination durch Proteine.

3.2.4 DNA-Restriktionsverdau

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA-Molekülen in definierte Fragmente wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, die bestimmte Basensequenzen spezifisch erkennen und die DNA an dieser Stelle schneiden. Durch einen Restriktionsschnitt können drei verschiedene Arten von Strangenden erzeugt werden: Bei versetzten Schnitten entstehen 5'- oder 3'-Überhänge (*sticky ends*), bei geraden Schnitten entstehen stumpfe Enden (*blunt ends*). Restriktionsenzyme wurden zum einen bei Klonierungsarbeiten verwendet, um definierte Plasmid-Fragmente zu erhalten (präparativer Verdau), die anschließend durch Ligation (siehe 3.2.10) zu neuen DNA-Molekülen verbunden wurden, zum anderen fanden sie Einsatz bei der Analyse von Plasmid-DNA (analytischer Verdau), da beim Verdau eines Stückes DNA durch definierte Restriktionsenzyme ein spezifisches Bandenmuster im Agarosegel entsteht. Verdauansätze setzen sich folgendermaßen zusammen:

Präparativer Verdau (100 µl Ansatz)

Analytischer Verdau (10 µl Ansatz)

10-20 µg DNA

1 µl DNA

50-100 U Enzym

5-10 U Enzym

10 µl 10 x geeigneter Enzypuffer

1 µl 10 x geeigneter Enzypuffer

Ad 100 µl H₂O

Ad 10 µl H₂O

Prinzipiell ist beim Ansetzen des Verdauens zu berücksichtigen, dass Enzyme in 50%-igem Glycerin gelagert werden, optimale Reaktionsbedingungen aber eine Glycerinkonzentration von unter 5% erfordern. Daher darf der Anteil der Enzymlösung nicht mehr als 10% des Gesamtansatzes betragen. Der Verdau erfolgte bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 1-2 Stunden.

3.2.5 DNA-Reinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Verunreinigungen durch Proteine oder Lipide aus DNA-Präparationen wurde dieses mit einem Ansatz eines Phenol- und Chloroform-Gemischs im Verhältnis 1:1 versetzt. Anschließend wurde der Ansatz gemischt und 10 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Hierbei kommt es zu einer Phasentrennung der organischen und wässrigen Phase. Letztere enthält die Nukleinsäure und kann vorsichtig mit einer Pipette von der organischen Phase abgenommen wurde. Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt (siehe 3.2.6).

3.2.6 DNA-Reinigung durch Ethanolfällung

Die nukleinsäurehaltige Probe wurde mit dem 3-fachen Volumen 100%-igem Ethanol, das zuvor auf -20°C gekühlt worden ist und dem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) versetzt und dann für mindestens 20 Minuten bei -20°C gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes bei 0°C für 15 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die sedimentierte DNA mit 70%-igem kaltem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach Lufttrocknung des Sedimentes wurde die Nukleinsäure in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer oder Wasser aufgenommen (meist 100-200 μl).

3.2.7 Horizontale DNA-Elektrophorese

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten relativ zu einer definierten Marker-DNA wurden die DNA-Proben in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1%-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde im entsprechenden Volumen 1 x Elektrophoresepuffer mit bis zur Entstehung einer homogenen Lösung in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$) versetzt.

Für den Auftrag der Proben auf das Gel wurden 0,1-1 μg DNA mit 2 μl 6 x Farbmaler versetzt und der Ansatz mit H_2O auf 12 μl aufgefüllt. An das Gel wurde eine Spannung von 120 V Gleichstrom angelegt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid konnte mittels eines UV Transluminators bei 254 nm sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert werden. Bei präparativen Gelen wurde der gesamte Verdauansatz mit 10 μl 6 x Farbmaler auf ein Gel mit großen Taschen aufgetragen. Die Betrachtung und Präparation des Gels erfolgte zur

Vermeidung von UV-Schäden an der zu präparierenden DNA bei einer Wellenlänge von 360 nm.

3.2.8 Elution von DNA aus Agarosegelen

Um die nach einer elektrophoretischen Auftrennung (siehe 3.2.7) erhaltenen DNA-Fragmente z.B. für eine Ligation weiterverwenden zu können, mussten diese aus dem Agarosegel herauspräpariert werden. Dazu wurde das Gel bei langwelligem Licht von 360 nm betrachtet und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte nach dem Protokoll und dem „QIAquick Gel Extraction“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden). Bei dieser Methode wurde die Agarose unter dem Einfluss chaotroper Salze aufgelöst und die DNA anschließend an einen Anionenaustauscher gebunden. Das Gelstück wurde gewogen und mit dem 3-fachem Volumen an QG-Puffer versetzt (100 mg \cong 100 μ l). Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 50°C unter gelegentlichem Mischen erhitzt. Die erhaltene DNA-Lösung wurde mit einem Gel-Volumen Isopropanol versetzt, auf eine „QIAquick®MiniColumn“ gegeben und zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, RT). Anschließend wurde die Säule mit 750 μ l PE-Waschpuffer beladen und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Waschpuffers erfolgte zunächst eine weitere Zentrifugation zur Entfernung von Pufferresten. Daraufhin werden 30 μ l TE-Puffer auf die Säule aufgetragen, und nach 1-minütiger Inkubation bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation von der Säule eluiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Elution werden 5 μ l der erhaltenen DNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.2.9 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um eine Religation des Vektors bei Klonierungen mit komplementären Enden zu verhindern, kann man das zuvor geschnittene Vektorplasmid an seinen 5'-Enden dephosphorylieren, damit die für die Ligation notwendige 5'-Phosphatgruppe fehlt. Dies erfolgte mithilfe der Kälberdarmphosphatase CIP (*calf intestine alkaline phosphatase*), indem 1-5 μ g des Vektors mit 1 U des Enzyms bei 37°C inkubiert wurde. Als Puffer dienten die NEB-Puffer 2, 3 und 4 der Firma NEBiolabs (Schwalbach).

3.2.10 Ligation

Mithilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase können zwei DNA-Moleküle, z.B. Vektor und Insert, miteinander verknüpft werden. Hierbei katalysiert das Enzym die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen und der 3'-OH-Gruppe des anderen Fragmentes. Das molare Verhältnis des eingesetzten Inserts zur Vektor-DNA betrug in der Regel ca. 3:1. Als Kontrollansatz diente die Vektor-DNA alleine. Die Fragmente wurden mit 5 U T4-DNA-Ligase im 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer, in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 15°C ligiert.

3.2.11 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von *E.coli* Bakterien mittels Elektroporation wurden mithilfe von Elektroschocks Löcher in die Zelloberflächen der Bakterien „geschossen“, durch die in der Lösung enthaltene Makromoleküle, wie z.B. Plasmid-DNA, die Membran passieren können. Zur Transformation wurden 40 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien, die bei -80°C gelagert wurden, in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Spalt) mit bis zu 2 µl der DNA-Lösung gemischt und einem Elektroimpuls von 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω ausgesetzt. Danach wurden die Bakterien mit 350 µl SOC-Medium versetzt, 1 h bei 37°C geschüttelt und auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert.

3.2.12 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden in der Abteilung „Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung“ des DKFZ Heidelberg durchgeführt.

3.2.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche. Voraussetzung für die Polymerase-Kettenreaktion ist das Vorhandensein einer Matrizen-DNA, welche als Vorlage dient und an der eine DNA-Polymerase einen komplementären Strang synthetisieren kann. Des Weiteren wurden zwei Primer benötigt, die jeweils an einem Ende des zu amplifizierenden Bereiches mit dem (+)-Strang bzw. dem (-)-Strang hybridisieren und der Polymerase als Startpunkt für die Reaktion dienen konnten. Die Reaktion lief nach folgendem Prinzip ab: Nach Hitze-Denaturierung der DNA lagern sich die Primer bei Abkühlung des Reaktionsansatzes an die jeweiligen

Einzelstränge der DNA-Matrize an. Eine hitzestabile Polymerase erstellt ausgehend vom 3'-OH-Ende des jeweiligen hybridisierten Primers einen dem Matrizen-Strang komplementären Strang. Nach erfolgter Synthese werden die neu entstandenen Doppelstränge erneut denaturiert, und die Prozedur wiederholt sich. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Zyklusses erreicht man so eine exponentiell verlaufende Amplifikation des gewünschten DNA-Bereiches. In dieser Arbeit wurde das Enzym Herculase™ Hotstart DNA Polymerase der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Dieses Enzym besitzt eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität und somit eine Korrekturlesefähigkeit, die die Fehlerwahrscheinlichkeit weitgehend reduziert. Dies ist bei der Untersuchung unbekannter Sequenzen sowie bei Klonierungsvorgängen von wesentlicher Bedeutung. Der Begriff Hotstart bedeutet, dass das Enzym in einem durch Antikörper vermittelten inaktiven Zustand vorliegt, was ein unspezifisches Arbeiten der Polymerase und unerwünschte Exonukleaseaktivität vor Beginn der PCR verhindert. Im ersten Denaturierungsschritt, d.h. bei Erhitzen der Probe auf 95°C, kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung der Antikörper, und das Enzym kann seine Funktion voll entfalten. Ein typischer PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl setzt sich folgendermaßen zusammen und wird nach gegebener Reihenfolge zusammenpipettiert:

<i>Komponente</i>	<i>Quantität pro Reaktion</i>
H ₂ O dest.	X µl ad 50 µl
10 x Herculase-Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Mischung (2,5 mM jedes dNTP)	4 µl
DNA-Matrize	20 ng (Plasmid-DNA, PCR-Fragmente)
Primer 1	100 ng
Primer 2	100 ng
Herculase™ Hotstart DNA Polymerase	0,5 µl

Nach dem Ansetzen der Proben wurden diese vorsichtig gemischt. Die Amplifikation der Proben erfolgte nach folgendem Protokoll.

Zykluszahl	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung des Antikörpers	95°C	2 Minuten
25	Denaturierung der DNA-Doppelstränge	95°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	55°	30 Sekunden
	Polymerisation	72°C	1 Minute/Kilobase
1		72°C	7 Minuten
1	Reaktionsende	4°C	∞

Die Hybridisierungstemperatur hängt vom Schmelzpunkt des jeweiligen Primerpaares ab. Haben die beiden Primer unterschiedliche Schmelzpunkte, wird üblicherweise die niedrigere der beiden Temperaturen für die Berechnung verwendet. Die Polymerisationsdauer hängt von der Länge des PCR-Produkts ab.

3.2.14 Aufreinigung von PCR-Produkten

Sofern die Analyse des PCR-Ansatzes im Agarosegel zeigte, dass nur die gewünschte Bande ohne Nebenbanden amplifiziert worden ist, wurde das PCR-Produkt direkt über eine Säule des „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen) aufgereinigt. Das Prinzip dieser DNA-Aufreinigung beruht auf der Eigenschaft der DNA bei hohen Konzentrationen von chaotropen Salz an eine Silicagelsäule (Anionenaustauscher) zu binden. Diese Bindung ist bei pH 7,5 maximiert. Freie Nukleotide sowie überschüssige Oligodesoxynukleotide und Enzyme werden durch Waschen entfernt. Das PCR-Produkt wurde dazu mit der fünffachen Menge PB Puffer gemischt, auf eine „QIAquick®MiniColumn“ geladen und eine Minute bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Säule wurde dann zweimal mit je 0,75 ml PE-Waschpuffer zentrifugiert. Nach Verwerfung des Waschpuffers erfolgte zunächst eine weitere Zentrifugation zur Entfernung von Pufferresten. Anschließend wurde zur Elution der DNA 30-100 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und bei 13.000 rpm 1 Minute zentrifugiert.

3.2.15 Topoklonierung und blau-weiß-Selektion positiver *E.coli*-Kolonien

Für die Topoklonierung wurde zu der aufgereinigten PCR 1 U Taq-Polymerase (Fermentas) zugegeben und der Reaktionsansatz 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt. 4 µl des PCR-Produkts wurden mit 1 µl der Salzlösung des Topo TA Klonierungs-Kits (Invitrogen) versetzt, welches 1:4 mit H₂O dest. verdünnt wurde. Zu diesem

Reaktionsansatz wurde 1 µl pCR 2.1 Topo-Vektor (Invitrogen) zugegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt. 2 µl des Reaktionsansatzes wurden für die elektrophoretische Transformation in *E.coli*-Bakterien (entsprechend Abschnitt 3.2.11) eingesetzt. Für die blau-weiß-Selektion topovektorpositiver *E.coli*-Kolonien wurden Amp-positive Agaroseplatten jeweils mit einem Gemisch aus 75 µl DMF (N, N-Dimethyl-Formamide) und 20 µl X-Gal beschichtet und für 15 Minuten getrocknet. Die transformierten *E.coli*-Bakterien wurden auf diesen Agaroseplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3 Computeranalysen

Computeranalysen von DNA-Sequenzen wurden mithilfe des HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources)-Programmpakets durchgeführt.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 Gewinnung zellassoziierter Proteine und Viruspartikel aus eukaryotischen Zellen

Nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen in PBS wurden die zu lysierenden Zellen in Lysepuffer aufgenommen und mit einem Ultraschallgerät dreimal 30 Sekunden beschallt, um die durch die chromosomale DNA hervorgerufene Viskosität der Proben zu reduzieren. Nachdem der Bestimmung der Proteinkonzentration, wurden die Proben im entsprechenden Volumen 5 x Ladepuffer aufgenommen. Sofern die Proben nicht sofort mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, wurden diese bei -20°C gelagert.

3.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Standardverfahren zur Proteinauftrennung. Die Proteine in den Proben werden durch 5-minütiges Aufkochen denaturiert. Das Detergenz SDS denaturiert die Proteine und gleichzeitig überlagert die Ladung der Sulfatreste die Eigenladung der Aminosäuren. Somit besitzen denaturierte Proteine eine gleiche Ladungsverteilung. Die Ladung der Proteine ist daher zu ihrer Größe direkt proportional. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel kommt es durch einen pH-Sprung zu einer Fokussierung der Proteine, wodurch die Auftrennung der Proteine deutlich gesteigert wird.

Bei dem hier verwendeten Gelsystem handelt es sich um ein diskontinuierliches System nach Kornberg, welches aus einem 7%igen Sammelgel und 12,5%-igen Trenngel besteht. Die Gele setzen sich wie folgt zusammen:

Ansatz für ein 12,5% -iges Gel

Trenngel:

H ₂ O dest.	6,6 ml
Lösung A	8,4 ml
Lösung B	5 ml
APS 10% Ammoniumperoxidsulfat-Lösung	200 µl
TEMED	10 µl

Ansatz für ein 7%iges Gel

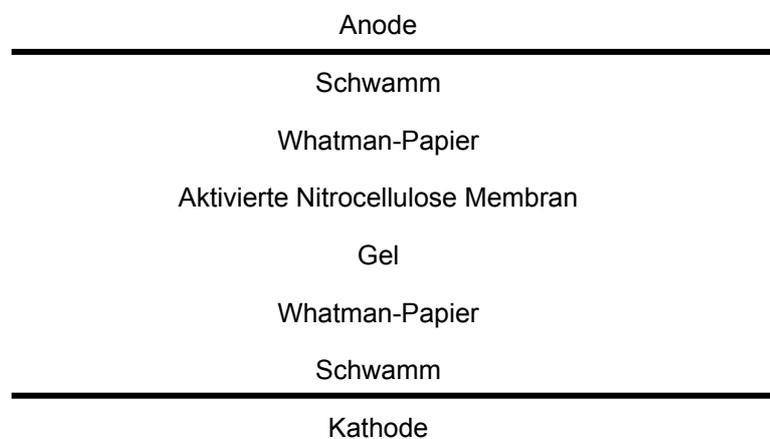
Sammelgel:

H ₂ O dest.	7,75 ml
Lösung A	3,5 ml
Lösung C	3,75 ml
APS 10% Ammoniumperoxidsulfat-Lösung	120 µl
TEMED	10 µl

Nach Zugabe von 5 µl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin) als Polymerisations-Starter wurde das Trenngel zwischen zwei, durch Abstandshalter (1 mm) getrennte, abgedichtete Glasplatten oder in eine Einweggelkassette (Invitrogen) gegossen und zum Glätten der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol durch Spülen mit Wasser entfernt und ein Kamm für 12, 13 oder 15 Geltaschen eingesetzt. Durch Zugabe von TEMED wurde dann die Polymerisation des Sammelgels gestartet und dieses gegossen. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gespannt, die Pufferreservoirs mit Laufpuffer gefüllt und der Kamm entfernt. Anschließend wurden die aufgekochten Proteinproben und ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 200 V durchgeführt. Sobald die Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet, das Sammelgel entfernt und das Gel zur Proteinimmundetektion vorbereitet.

3.4.3 Proteinimmundetektion (Western Blot, Immunoblot)

Proteine, die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, wurden anschließend durch die Western-Blot-Methode auf eine in Transfer-Puffer geschwenkte Nitrocellulose-Membran transferiert. Auf dieser Membran wurden dann anschließend die gewünschten Proteine mithilfe spezifischer Antikörper detektiert (Towbin H, 1979). In dieser Arbeit wurde das Naßblot-Tanksystem der Firma Invitrogen verwendet. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Trenngel vom Sammelgel getrennt. Anschließend erfolgte der Zusammenbau der Naßblot-Apparatur nach folgendem Schema:



Vor dem immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran nach Beendigung des Transfers in 5% Milch/0,1% Tween in PBS 1 h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert, um durch Absättigen der Membran unspezifische Bindungen der Antikörper zu unterbinden. Im Anschluss wurde das spezifische Antiserum in entsprechender Verdünnung (1:500 bis 1:5.000) in 0,1% Tween/PBS zugesetzt und die Membran 1 h bei RT darin geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten) mit 0,1% Tween/PBS wurde die Membran mit dem entsprechenden Konjugat (entweder Peroxidase-konjugierte Protein A, Verdünnung 1:10.000, Peroxidase-konjugierter Anti-rabbit IgG 1:5.000 oder Peroxidase-konjugierter Anti-mouse IgG; Verdünnung 1:5.000) in 5% Milch/0,1% Tween/PBS 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde diese nochmals dreimal mit 0,1% Tween/PBS (je 10 Minuten) gewaschen. Die Membran wurde anschließend einmal mit PBS gespült. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran für 1 Minute in der ECL-Lösung geschwenkt. Dabei oxidiert die gebundene Peroxidase zyklisches Diacylhydrazid unter alkalischen Bedingungen, was zur Chemolumineszenz führt. Die Chemolumineszenz wurde autoradiographisch sichtbar gemacht und auf einem ECL-Film im angemessenen Zeitraum exponiert. Dieser wurde anschließend mithilfe der Entwicklermaschine (AFGA) bei Schutzlicht entwickelt.

3.4.4 Proteingelfärbung

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde das SDS-Gel nach dem Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran mit GelCode Blue Stain-Färbelösung (Pierce) angefärbt. Hierzu wurde das Gel nach dem Transfer eine halbe Stunde in H₂O dest. auf dem Wippschüttler geschwenkt und anschließend drei Stunden in der Färbelösung inkubiert. Nach Entfernung der Färbelösung wurde das Gel drei mal zehn Minuten mit H₂O dest. gewaschen und zur Dokumentation in Trocknerfolien (Promega) eingespannt und über Nacht getrocknet.

3.4.5 Expression eukaryonter Fusionproteine in *Escherichia coli*

BL21 Bakterien wurden mit GST-Expressionsplasmiden entsprechend Abschnitt 3.2.11 transformiert und auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Einzelne Bakterienkulturen wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und damit 5ml LB-Amp-Kulturen angeimpft. Die Bakterienkultur wurde 10 h auf dem Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert und anschließend mit 200 ml LB-Amp-Medium in einem entsprechend großen Erlenmeierkolben überführt. Dieser Ansatz wurde über Nacht auf dem Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert. 5 ml der Bakterienkultur wurden als Glycerokulturen bei -70°C gelagert. Anschließend wurde die 200 ml Bakterienkultur mit 1 l LB-Amp-Medium in einem entsprechend großen Erlenmeierkolben überführt und bei Raumtemperatur auf einem Inkubationsschüttler inkubiert. Nachdem die Bakterienkultur eine optische Dichte (OD) von 0,3 bei 600 nm erreicht hatte, wurde die Expression der Fusionsproteine mit 0,2 mM ITPG induziert. Die Bakterienkultur wurde weitere 5 h bei Raumtemperatur auf dem Inkubationsschüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C in einem SLA3000-Rotor pelletiert, der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 10 ml PBS aufgenommen, in 5 ml-Aliquot aufgeteilt und, sofern sie nicht sofort weiterverwendet wurden, bei -20°C eingefroren.

3.4.6 Extraktion und Aufreinigung eukaryonter Fusionsproteine

Die in Abschnitt 3.4.5 beschriebenen Bakterienkonzentrate wurden mit 1000-fachem Proteaseinhibitor und 0,2 mM DTT versetzt und mithilfe des Homogenisierers aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C mit dem SA600-Rotor zentrifugiert. Der Überstand enthielt das überexprimierte Protein und wurde mit Glutathion-Sepharose in einem 50 ml Reaktionsgefäß versetzt. Die Probe wurde 1 h bei 4°C auf dem Überkoprotator inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die GST-Fusionsprotein-gekoppelte Glutathion-Sepharose 3-mal mit PBS-TX100 Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde die Glutathion-Sepharose mit PBS gewaschen und für den Proteininteraktions-Assay weiter verwendet. Zur Immunisierung

von Kaninchen mit GST-Fusionsproteinen wurde die GST-Fusionsprotein-gekoppelte Glutathione-Sepharose 3-mal mit 10 mM reduziertem Glutathion (GSH) in Tris-HCl-Puffer inkubiert. Jede Fraktion wurde nach kurzzeitiger Zentrifugation abgenommen und bei -70°C gelagert. Proben der Fraktionen wurden mithilfe eines Proteingels und anschließendem Immunoblot auf Proteinkonzentration und Verunreinigungen hin analysiert. Die Injektion der Fusionsproteine in Kaninchen zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurde freundlicherweise von Dr Uwe Truyen vorgenommen.

3.4.7 Co-Immunpräzipitation

Die Interaktion zweier überexprimierter Proteine in eukaryotischen Zellen wurde mithilfe der Co-Immunopräzipitation bestimmt. 293T-Zellen wurden gemäß Abschnitt 3.5.3 mit der Plasmid-DNA der zu exprimierenden Proteine transfiziert. Zwei Tage p.t. wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen gewaschen und in TLB-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen eine halbe Stunde lang auf Eis lysiert und 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abgenommen und mit Normalen-Mausserum als Negativkontrolle und Protein-G-Sepharose für 1 h bei 4°C auf dem Überkopprotator inkubiert. Die Proben wurden anschließend 2 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit monoklonalen HA-Antikörpern (Maus) und Protein-G-Sepharose für 1 h bei 4°C auf dem Überkopprotator inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Protein-G-Sepharose sowie die Negativkontrollen dreimal mit TLB-Puffer gewaschen. Die Proben und die Negativkontrollen wurden mit 5-fachem Ladepuffer versetzt, auf einem Proteingel aufgetrennt und anschließend im Immunoblot analysiert.

3.4.8 Proteininteraktions-Assay

Die Interaktion zwischen einem zellulären Protein und einem aufgereinigten GST-Fusionsprotein wurde mithilfe des Proteininteraktions-Assays bestimmt. 293T-Zellen wurden gemäß Abschnitt 3.5.3 mit der Plasmid-DNA der zu exprimierenden Proteine transfiziert. Zwei Tage p.t. wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen gewaschen und in TLB-Puffer aufgenommen. Anschließend werden die Zellen eine halbe Stunde lang auf Eis lysiert und 5 Minuten bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abgenommen und die Proben mit Glutathione-Sepharose und den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen oder GST alleine als Negativkontrolle für 1h bei 4°C auf dem Überkoprotator inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Glutathione-Sepharose dreimal mit TLB-Puffer gewaschen und in 5-fachem Ladepuffer

aufgenommen. Die Proben wurden auf einem Proteingel aufgetrennt und anschließend mittels Immunoblot analysiert.

3.4.9 Aufreinigung polyklonaler Antiseren mithilfe einer Affinitäts-Säulenchromatographie

Glutathion-Sepharose wurde mit GST-feAPOBECA3C-a für 30 Minuten bei 4°C auf dem Überkopffrotator inkubiert. Das GST-feAPOBECA3C-a-gekoppelte Säulenmaterial wurde viermal mit 0,1% Tween-PBS gewaschen und in eine Säule überführt. Das polyklonale Antiserum wurde auf die Säule gegeben, so dass dieses an feAPOBECA3C-a binden kann. Anschließend wurde die Säule mit Tris-Puffer 2 und mit TrisHCl-Puffer gewaschen. Antikörper, deren Interaktion zu feAPOBECA3C-a säuresensitiv ist, wurden mit glycinhaltigem Elutionspuffer eluiert. Die Fraktionen wurden aufgefangen und mit Tris-Puffer 3 neutralisiert. Die Säule wurde mit Tris-Puffer 1 so lange gewaschen, bis der pH 8,8 erreicht wird. Antikörper, deren Interaktion zu feAPOBECA3C-a basensensitiv waren, wurden mit Triethylamin-Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden aufgefangen und mit Tris-Puffer 1 neutralisiert. Die Säule wurde anschließend so lange mit Tris-Puffer 2 gewaschen, bis der pH 7,5 erreichte. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und mithilfe des Ultrafiltrators aufkonzentriert. Die aufgereinigten Antikörper wurden zum Schutz vor Kontamination mit 0,02% Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert. Die Bindungskapazität und -spezifität der aufgereinigten Antikörper wurde mithilfe von feAPOBEC3C-a transfizierten Zelllysaten im Immunoblot ausgetestet.

3.5 Zellkultur und Arbeiten mit Viren

3.5.1 Kultivierung eukaryotischer -Zellen

Die hier verwendeten eukaryotischen -Zellen wurden im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in beschichteten Kunststoffgefäßen kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden an der Sterilbank durchgeführt. Alle Zellkulturmedien wurden mit 1% einer Penicillin-Streptomycin-Stammlösung versetzt. 293T-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS gehalten. CRFK- und FeFAB-Zellen in DMEM mit 7% FCS, wobei dem FeFAB-Medium 500 µg/ml Neomycin (G 418 Sulfat) zugesetzt wurde (Flower RL, 1985; Winkler et al., 1998; Zemba et al., 2000). Die Zellen wurden bei Konfluenz passagiert. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen, um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen von

der Gefäßoberfläche bei 37°C inkubiert (3-15 min). Die abgelösten Zellen wurden dann im entsprechenden Medium resuspendiert und verdünnt.

3.5.2 Lagerung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur längeren Lagerung der eukaryotischen Zellen wurden diese nach der Trypsinierung in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (1.500 rpm, 5 min, RT) und danach in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, welches 7% DMSO und 20% FCS enthielt, in sterile Kryoröhrchen überführt, in Zellstoff verpackt und bei -70°C eingefroren und gelagert. Zum Auftauen wurde die Zellsuspension auf 37°C erwärmt, zur Entfernung des DMSO-haltigen Mediums zentrifugiert (1.500 rpm, 5 min), sofort in 37°C warmes Kulturmedium aufgenommen und in ein 25 cm² Zellkulturgefäß überführt.

3.5.3 Transiente transfektion eukaryotischer Zellen mit der Kalzium-Phosphat-Methode

Die Transfektion mithilfe der Kalzium-Phosphat-Methode basiert auf der Präzipitation von Plasmid-DNA mit Kalzium-Phosphat. Diese werden von adhärennten eukaryontischen Zellen sehr effektiv endozytotisch aufgenommen. 20 µg Plasmid-DNA wurden ad 450 µl mit sterilem H₂O verdünnt und mit 50 µl 2,5 M CaCl₂ zu einem Endvolumen von 500 µl gemischt. Diese DNA-Lösung wurde tropfenweise zu 500 µl 2 x HBS-Puffer gegeben, gut gemischt und für genau 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Inkubationszeit bildeten sich die oben erwähnten Kalzium-Phosphat-Präzipitate, was an der langsamen Trübung des Gemisches zu erkennen war. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung tropfenweise zu den Zellen einer Platte (10 cm Ø) gegeben. Diese sind am Vortag ausgesät worden und haben zum Zeitpunkt der Transfektion eine optische Dichte von ca. 30%. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit nahmen die Zellen die DNA-Kalzium-Phosphat-Aggregate auf. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, indem das alte Medium abgenommen und frisches Medium zugegeben wurde. Die Ernte der transfizierten Zellen bzw. des Zellkulturüberstands erfolgte ca. 48 Stunden nach der Transfektion (p.T. = post transfection). Für Transfektionen in 6 cm Ø Transfektionsplatten wurde ein Drittel der oben beschriebenen Mengen eingesetzt. Allgemein ist bei der Transfektion zu beachten, dass der Transfektionsansatz die Menge von einem Zehntel des Medienvolumens nicht überschreitet.

3.5.4 Infektion und transduktion von CRFK -Zellen

Zur Infektion bzw. Transduktion von CRFK-Zellen wurden die geklärten ZKÜs (Zellkulturüberstände) transfizierter 293T-Zellen verwendet (Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm). Hierzu wurden CRFK-Zellen auf Zellkulturschalen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transduktion eine optische Dichte von 30-50% aufwiesen. Auf diese wurde dann 1-3 ml geklärter 293T-ZKÜ gegeben. 8 h nach Infektion erfolgte ein Mediumwechsel, um das Vektor-Inoculum zu entfernen.

3.5.5 β -Galactosidase-Assay mit transduzierten bzw. infizierten FeFAB -Zellen

Um den Virus- bzw. Vektortiter in FFV-haltigen Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurden FeFAB-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um genetisch veränderte CRFK-Zellen, welche das β -Galactosidasegen unter der transkriptionellen Kontrolle des FFV-LTR-Promotors stabil im Genom integriert tragen (Zemba et al., 2000). Werden diese Zellen von FFV-infiziert oder von Bel 1-exprimierenden FFV-Vektoren transduziert, wird der LTR-Promotor durch den viralen Bel 1-Transaktivator aktiviert und die β -Galactosidase exprimiert. Die im Nukleus lokalisierte β -Galactosidase kann anschließend direkt durch Umsetzung von X-Gal anhand der Blaufärbung der Zellkerne quantifiziert werden. Abb. 3.1 zeigt die schematische Darstellung des FeFAB-Assays.

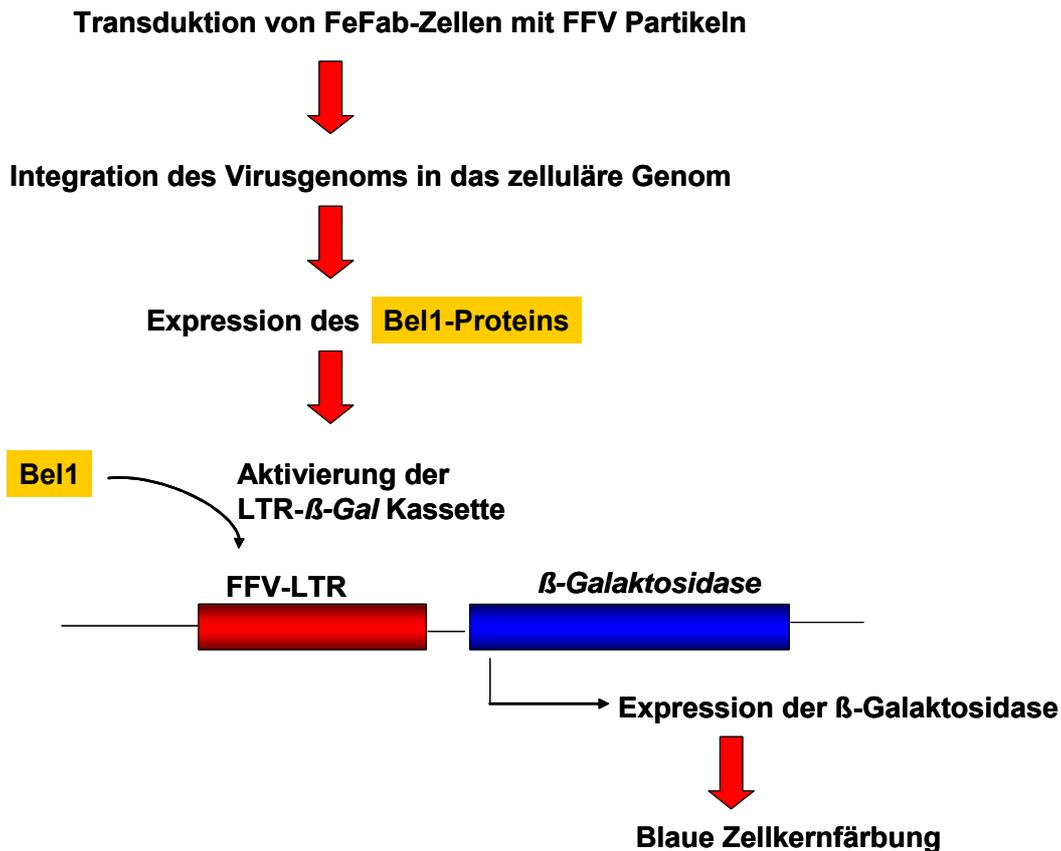


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des zur Bestimmung der Vektortransduktionseffizienz verwendeten β-Galactosidase-Assays.

Für den β-Galactosidase-Assay wurden FeFAB-Zellen in 24-Kalotten-Platten ausgesät. Bei Adhärenz der Zellen wurden entsprechende Verdünnungen (1:10 Verdünnungsreihe) des zu analysierenden infektiösen ZKÜ zugegeben und die Zellen zwei bis drei Tage mit dem infektiösen Überstand inkubiert. Dann wurden die Überstände verworfen, die Zellen mit PBS/1 mM MgCl₂ gewaschen und anschließend mit 1 ml Fixierlösung pro Kalotte versetzt. Nach einer 5-minütigen Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 1 h mit 300 µl Färbelösung/Kalotte bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Entfernen der Färbelösung und zweimaliges Waschen mit H₂O gestoppt. Die Auswertung blau gefärbter Zellen wurde unter dem Mikroskop vorgenommen, wobei der virale Titer in FFU/ml (*focus forming units/ ml*) angegeben.

3.5.6 Isolierung von Viruspartikeln aus dem Zellkulturüberstand

Diese Methode dient der Konzentrierung von Virus- und Vektorpartikeln aus ZKÜs zur nachfolgenden Analyse im Western Blot. ZKÜs transfizierter 293T-Zellen wurden 2 d p.t.

abgenommen und durch zweifache Zentrifugation (zunächst 7 min bei 1.500 rpm, anschließend 30 min bei 3.500 rpm) vorgeklärt. Danach wurden 2 ml einer 20%-igen Sucroslösung in PBS (w/v) in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen (SW41) vorgelegt und vorsichtig mit dem vorgeklärten ZKÜ überschichtet. Nachdem die Röhrchen mit PBS bis zum Rand aufgefüllt und sorgfältig austariert wurden, wurden die Partikel 2 h bei 28.000 rpm und 4°C im SW41-Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig von oben mit einer Pipette abgenommen und das Sucrosekissen zügig abgegossen, um eine Kontamination des Pellets mit nicht partikulärem Material zu vermeiden. Die Zentrifugen-Röhrchen wurden umgedreht, auf ein Papierhandtuch gestellt und mit Whatman-Papier-Streifen getrocknet, ohne das nicht sichtbare Pellet zu berühren. Anschließend wurden 50 µl 4x Ladepufferpuffer zugegeben, kurz gevortext und die resuspendierten Partikel in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20°C.

3.5.7 DNaseI-Verdau

Um kontaminierende zellassoziierte FFV-DNA nach der Viruspartikelaufreinigung abzubauen, wurde im Anschluss ein DNaseI-Verdau (1 U/µl) durchgeführt. Durch das verhältnismäßig große Molekulargewicht der DNaseI von 30-40 kDa ist sichergestellt, dass dieses Enzym nicht in die intakten Partikel gelangen kann. Nachdem das virale Pellet in 90 µl PBS aufgenommen worden ist, wurde eine entsprechende Menge 10 x Reaktionspuffer und 1 U des Enzyms zugesetzt. Dies entspricht einer zehnfachen Überdosierung und gewährleistet den vollständigen Verdau kontaminierender DNA. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 1 h und wurde anschließend durch Inkubation mit 1 µl EDTA (2,5 mM) bei 65°C für 10 Minuten gestoppt. Zur Entfernung viraler Proteine wurde zu dem Ansatz Proteinase K (Roche Diagnostics) auf eine Gesamtkonzentration von 0,2 mg/ml zugesetzt und für 45 Minuten bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K für 10 Minuten bei 98°C inaktiviert. Die auf diese Weise freigesetzte virale DNA wurde im Anschluss direkt für PCRs entsprechend Abschnitt 3.2.13 eingesetzt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Nachweis und Vergleich der felines A3 Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression der im Abschnitt 1.4 beschriebenen, endogenen felines APOBEC3-Proteine (feA3-Proteine), von denen bislang nur zelluläre mRNA bekannt war, in Katzen-Zellen nachgewiesen werden (Münk et al., 2008). Des Weiteren sollte durch die Induktion polyklonaler Antikörper gegen die verschiedenen feA3-Proteine ein von artifiziellen Überexpressionssystemen unabhängiges Nachweissystem etabliert werden. Dazu wurden polyklonale Antikörper generiert, welche die endogenen feA3-Proteine:

- feAPOBECA3C-a, nachfolgend feA3C-a genannt,
- feAPOBECA3H, nachfolgend feA3H genannt
- feAPOBECA3CH, nachfolgend feA3CH genannt,

in Katzen-Zellen detektieren sollten.

4.1.1 Klonierung der GST-feA3C-a-, -feA3H- und -feA3CH-linker-Fusionskonstrukte

Die *feA3*-Gene *pfeA3C-a* und *pfeA3H* sowie die ausschließlich im feA3CH-Protein vorkommende Linkerdomäne (*pfeA3CH-Linker*) wurden zur Expression eines GST (Glutathion-S-Transferase)-feA3-Fusionsproteins in einen pGEX-4T3-Vektor kloniert, so dass die folgenden Konstrukte entstanden:

- pGEXfeA3C-a
- pGEXfeA3H
- pGEXfeA3CH-Linker

Als endgültige Fusionsproteine erhielt man somit:

- GSTfeA3C-a
- GSTfeA3H
- GSTfeA3CH-Linker

Die entsprechenden *pfeA3*-Gene bzw. -Genfragmente wurden hierfür mittels PCR aus ihrem ursprünglichen pcDNA3.1⁺-Expressionsvektoren amplifiziert. Nach dem Schneiden des pGEX-

4T3-Vektors und der amplifizierten *feA3*-Genfragmente mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Sall* wurden diese so mit dem pGEX4T3-Vektor ligiert, dass innerhalb der Expressionskonstrukte die *feA3*-codierenden Sequenzen C-terminal zum GST-Gen und N-terminal zur SV40-Epitop-Sequenz positioniert sind. Abb. 4.1 zeigt die schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der pGEX*feA3*-Plasmide.

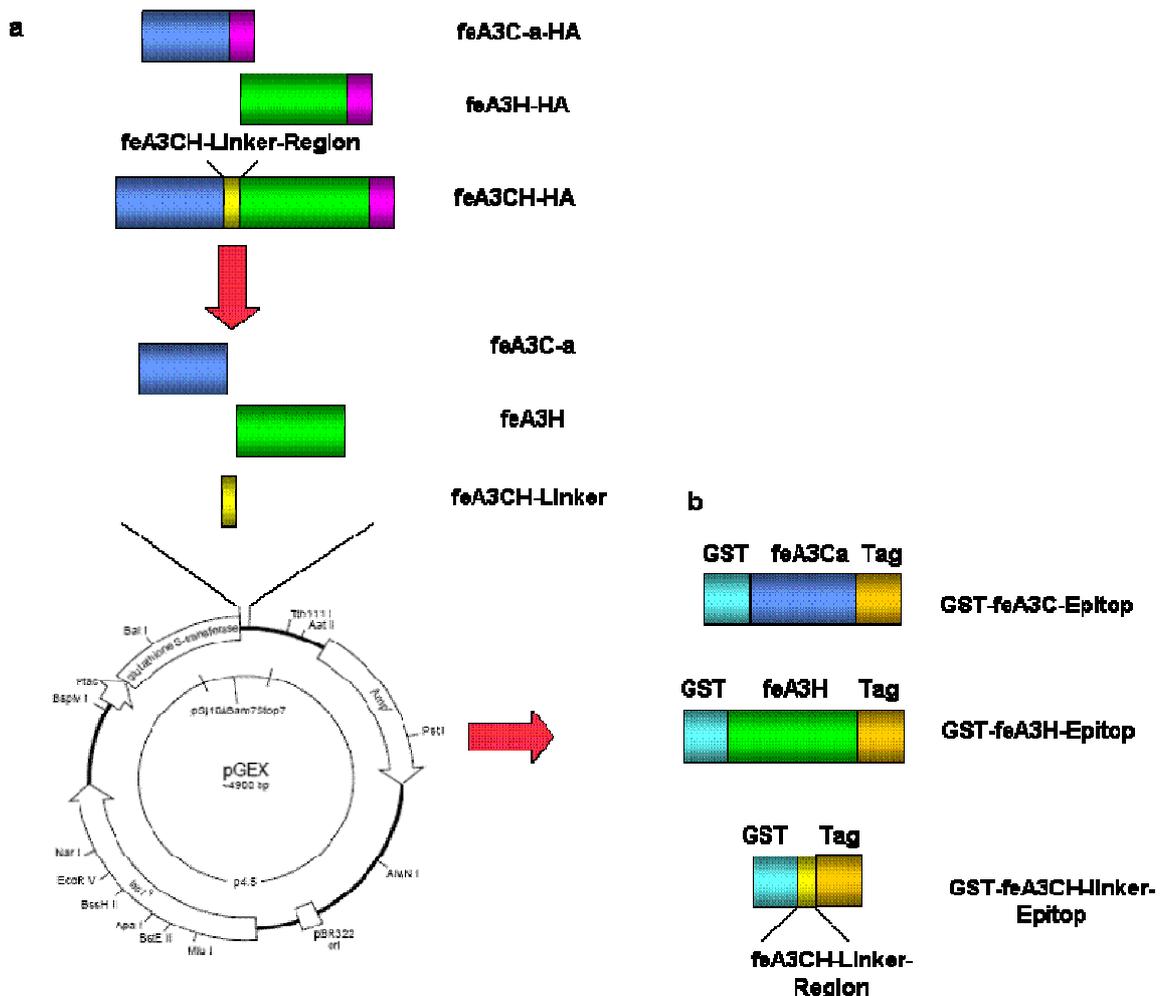


Abb. 4.1: Konstruktion der GST-*feA3*-Expressionsplasmide. A Die oberen drei Balken zeigen die schematische Darstellung der HA-markierten *feA3C-a*, *-H* und *-CH*-Expressionsklone. Von diesen wurden das *feA3C-a*-Gen (blau), das *feA3H*-Gen (grün) und die *Linker-Region* des *feA3CH*-Gens (gelb) per PCR amplifiziert und in den pGEX4T3-Vektoren kloniert. Die Abb. zeigt die Position der Gene innerhalb der pGEX4T3-Vektoren. Die entsprechend exprimierten GST-Fusionsproteine sind in b schematisch dargestellt. Sie tragen C-terminal einen SV40-Epitop (=Tag)

4.1.2 Expression und Aufreinigung der GST-feA3-Fusionsproteine

Die GST-Fusionsplasmide wurden in *BL21*-Expressionsbakterien (Stamm *Rosetta*) entsprechend Abschnitt 3.4.5 überexprimiert, da humane tRNAs, welche in *E.coli* selten auftreten in diesem Stamm stark exprimiert werden. Als Kontrolle wurden *BL21*-Bakterien mit GST-Expressionsplasmiden ohne Fusionsprotein transfiziert. Anschließend wurden die durch Sedimentation aufkonzentrierten Bakterien lysiert und die löslichen Proteine entsprechend Abschnitt 3.4.6 aufgereinigt. Abb. 4.2 zeigt die schematische Darstellung der GST-feA3-Proteinaufreinigung.

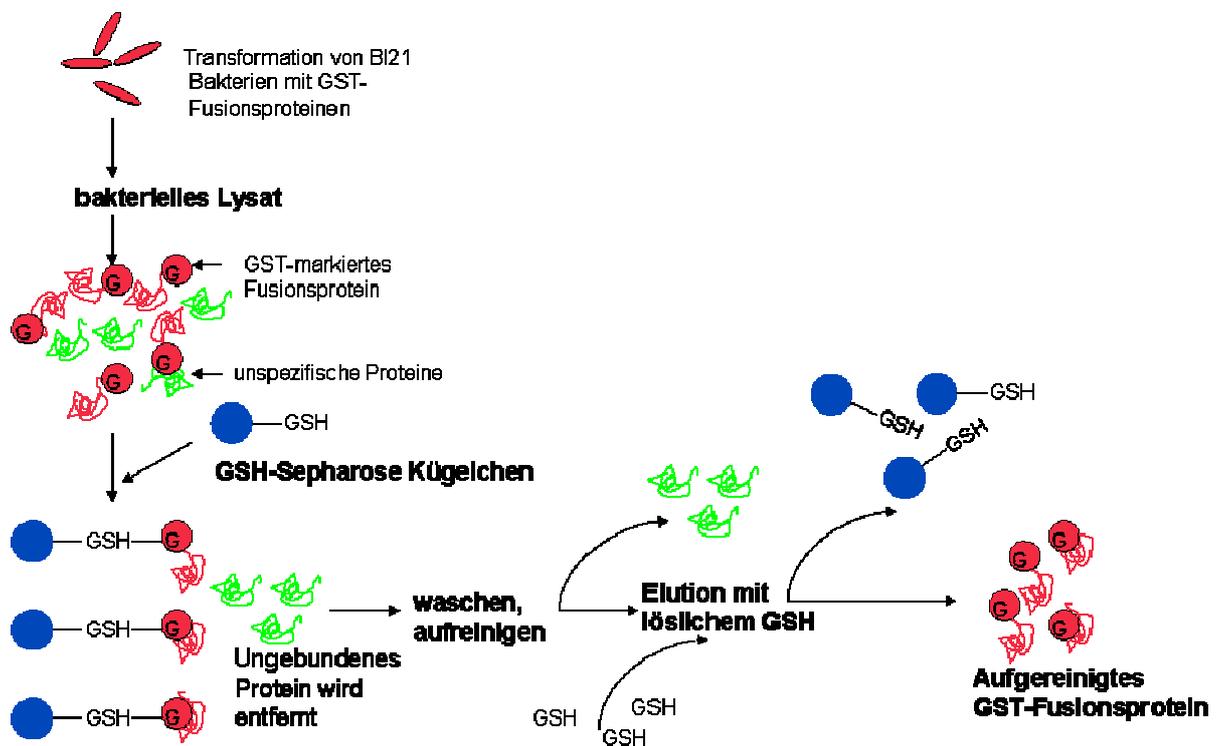


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Aufreinigung der feA3-GST-Fusionsproteine. *BL21*-Bakterien wurden entsprechend Abschnitt 3.2.11 und 3.4.5 mit den *GST-feA3*-Expressionsplasmiden transformiert und kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien lysiert und die GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose-Kügelchen gebunden. Unspezifische Proteine wurden in mehreren Waschläufen entfernt und die gebundenen GST-feA3-Proteine durch Zusatz eines Überschusses an 10 mM löslichem Glutathion von den Glutathion-Sepharose-Kügelchen eluiert (siehe Abschnitt 3.4.6). GST: Glutathion-S-Transferase; GSH: Glutathion

Die GST-feA3-Fusionsproteine wurden dabei in mehreren Elutionsschritten mithilfe von 10 mM löslichem Glutathione von den Glutathion-Sepharose-Kügelchen entfernt. Die einzelnen Fraktionen der isolierten und aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden auf SDS-PAGE Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.4.2) und die entsprechenden Proteinbanden mittels Coomassiefärbung (in Abschnitt 3.4.4 erläutert) detektiert. Abb. 4.3 zeigt

die eluierten Fraktionen der GST-Fusionsproteine zusammen mit dem Säulenmaterial nach der Elution mit 10 mM Glutathione.

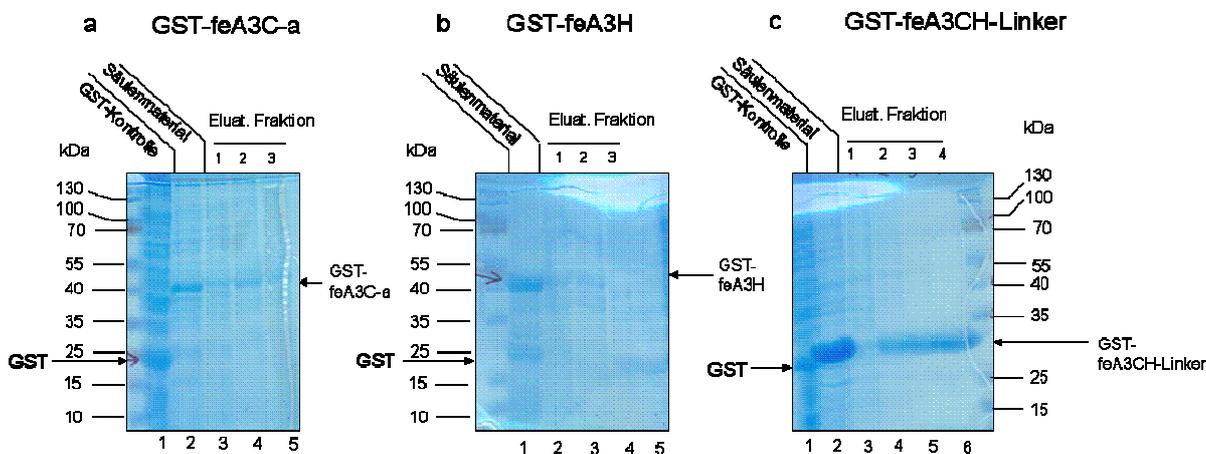


Abb. 4.3 Nachweis der aufgereinigten GST-feA3-Fusionsproteine im Coomassie-Gel.

Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l der eluierten GST-feA3-Fractionen bzw. 10 μ l Säulenmaterial nach Glutathion-Elution. Als Kontrolle wurden 10 μ l eines mit dem GST-Kontrollplasmid transfizierten Bakterienlysates aufgetragen. Die Pfeile kennzeichnen die detektierten Proteine. GST wird auf einer Höhe von ca. 25 kDa detektiert, GST-feA3C-a und -H auf einer Höhe von 50 kDa und GST-feA3CH-Linker auf einer Höhe von 31 kDa. Auf der linken Seite von a und b, bzw. rechten Seite von c sind die Positionen des parallel aufgetrennten Markers angezeigt.

GST-feA3C-a-Proteine wurden nach Elution in allen drei Elutionsfraktionen nachgewiesen (Abb. 4.3 a Spuren 3 bis 5), wohingegen GST-feA3H-Proteine in den beiden ersten Fraktionen nachgewiesen wurden (Abb. 4.3 b Spuren 2 und 3) und diese Proteinbanden zudem schwächer waren als das Signal in der Bande des Säulenmaterials. Dies deutet darauf hin, dass bei diesem Ansatz die Elution weniger effizient war, als für die GST-feA3C-a-Proteine. Nach Elution der GST-feA3CH-Linker-Domäne wurden starke Signale des eluierten Fusionsproteins in den Elutionsfraktionen 4 bis 6 detektiert. Trotz der Tatsache, dass an der Säule noch eine große Menge an GST-feA3CH-Linker-Proteinen gebunden ist, lässt sich aus dem Ergebnis des Coomassiegels eine sehr effiziente Elution und Reinigung dieses Fusionsproteins ableiten.

Die einzelnen Fraktionen der jeweiligen GST-feA3-Fusionsproteine wurden zusammengeführt, die Mengen und Konzentrationen der gereinigten GST-feA3-Fusionsproteine sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Mengen und Konzentrationen der gewonnenen GST-feA3-Fusionsproteine.

	<i>GST-feA3C-a</i>	<i>GST-feA3H</i>	<i>GST-feA3CH-Linker</i>
Menge (ml)	3	3	6
Konzentration (μ g/ μ l)	2,1	0,81	3,72
Molekulargewicht (kDa)	50	50	31,6

Je zwei ml der aufgereinigten GST-feA3-Fusionsproteine wurden anschließend zur Immunisierung von Kaninchen und nachfolgender Gewinnung polyklonaler Antiseren eingesetzt. Jedes Kaninchen erhielt zwei Injektionen im Abstand von acht Wochen. Anschließend wurde den Kaninchen Blut abgenommen und daraus das antikörperhaltige Serum gewonnen⁴.

Diese GST-Fusionsproteine wurden nach Expression und Aufreinigung für folgende Immunisierungsstrategie verwendet:

- GST-feA3C-a-Domäne → Detektion der feA3C-Formen: feA3C-a, feA3c-b und feA3C-c und feA3CH
- GST-feA3H-Domäne → Detektion von feA3H und feA3CH
- GST-feA3CH-Linker-Domäne → Detektion ausschließlich von feA3CH

4.1.3 Nachweis von endogenem feA3C-a, feA3H und feA3CH in CrFK- und Mya-Zellen

Nach Erhalt der Antiseren wurde das GST-feA3C-a-Antiserum aufgrund seiner starken Kreuzreaktivität mittels Affinitätssäulenchromatographie entsprechend Abschnitt 3.4.9 aufgereinigt. Dabei wurden aufgereinigte GST-feA3C-a-Proteine an eine Glutathion-Sepharose-Säule gekoppelt und das feA3C-a-Antiserum über die Säule gegeben, so dass die spezifischen feA3C-a Antikörper an die GST-feA3C-a-Proteine binden. Das aufgereinigte Antiserum wurde sequenziell jeweils mit sauren und basischen Puffern von der Affinitätssäule eluiert und in Neutralisationspuffer aufgenommen.

Die feA3H- und CH-linker-Antiseren sowie das aufgereinigte feA3C-a Antiserum wurden zum Nachweis der endogenen feA3-Proteine in FFV-infizierten und nicht-infizierten CrFK-Zellen bzw. den feline T-Zellen Mya1⁵ eingesetzt. Als Kontrolle wurden 293T-Zellen mit 10 µg HA-markierten *pfeA3C*-, *pfeA3H*- und *pfeA3CH*-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA Kontrollvektor (in 10 cm Zellkulturschalen) transfiziert. Gleiche Mengen CrFK-, Mya1- und transfizierter 293T-Zellen wurden, wie im Abschnitt 3.4.1 beschrieben, lysiert und im Immunoblot analysiert. Dabei wurde die Immunoblotmembran zuvor entsprechend Abschnitt 3.4.3 mit 5% Milch/0,1% Tween in PBS mit 2 mg/ml GST-haltigem Bakterienlysat präadsorbiert, um unspezifische Bindungen der polyklonalen Antikörper zu verhindern. Die Immunoblots wurden anschließend zum Nachweis der feA3C-a, -H und -CH-Proteine mit den entsprechenden Antiseren inkubiert.

⁴ freundlicherweise durchgeführt von Prof. Dr. Uwe Truyen

⁵ freundlicherweise erhalten von Dr. C. Münk

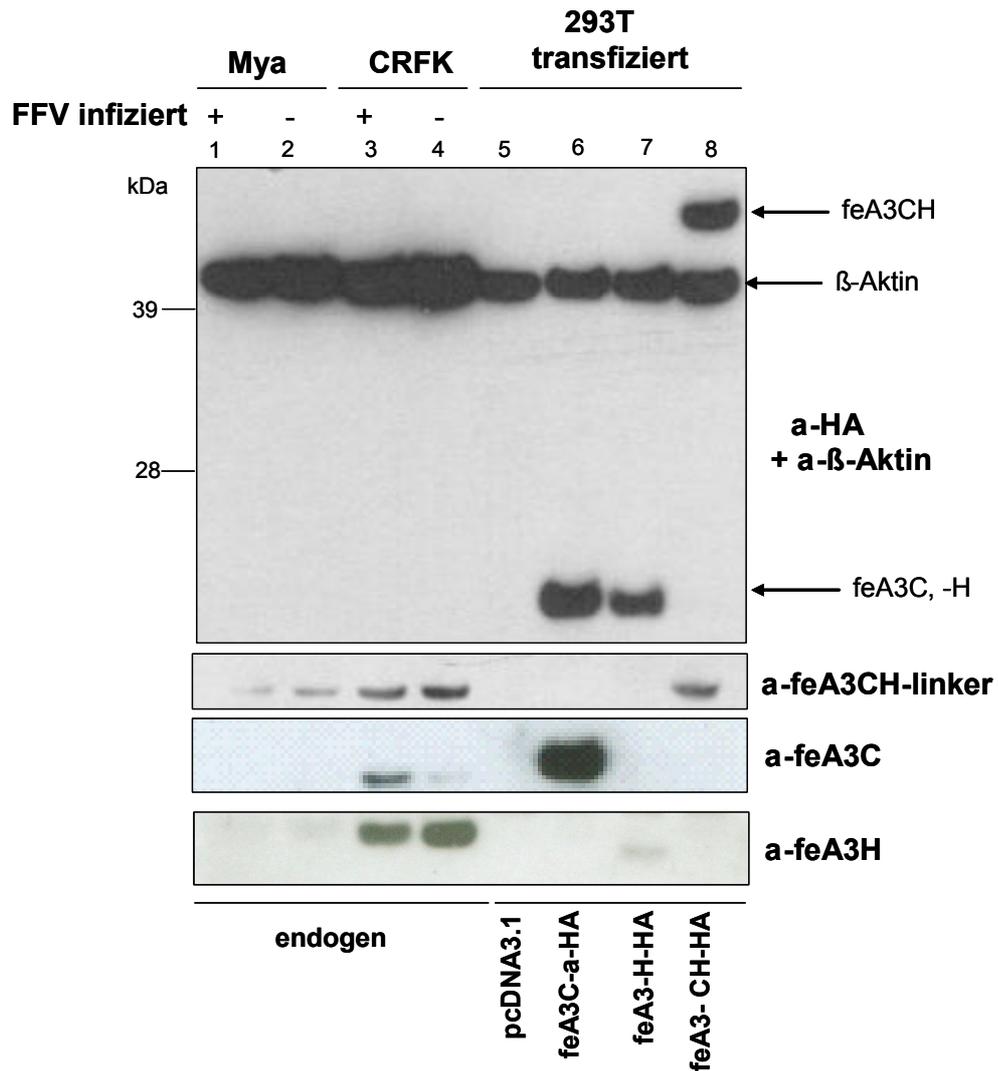


Abb. 4.4: Nachweis der feA3-Proteine in CrFK- und Mya-Zellen. Die Infektion von CrFK- und Mya-Zellen mit FFV-Virionen erfolgte 18 h nach Aussaat. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte CrFK- und Mya-Zellen sowie 293T-Zellen, die mit HA-markierten *pfeA3C-a-*, *-H-* oder *-CH-* Expressionsplasmiden transfiziert wurden. Nach Einstellung der Zelllysate auf gleiche Proteinkonzentrationen wurden 10 µl der jeweiligen Lysate zur elektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Die feA3-Proteine wurden im Immunoblot mit den spezifischen feA3-Antisera in einer 1: 500-Verdünnung detektiert. Zusätzlich erfolgte der Nachweis der HA-markierten feA3-Proteine in den 293T-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop. Zur Mengenkontrolle der Zelllysate wurde zusätzlich β-Aktin mit einem monoklonalen β-Aktin-Antikörper in allen Proben nachgewiesen.

Wie in Abb. 4.4 dargestellt ist, wurden alle drei transfizierten feA3-Proteine, die jeweils C-terminal mit einem HA-Epitop markiert sind, in 293T-Zellen sowohl mit dem monoklonalen anti HA-Antikörper als auch mit den spezifischen polyklonalen Antisera nachgewiesen (Spuren 5 bis 8). Das feA3CH-Protein wurde sowohl in Mya1- als auch in CrFK-Zellen exprimiert (Spuren 1 bis 4), wobei die Expression dieses Proteins in CrFK-Zellen stärker ist als in Mya1-Zellen

(Spuren 1 und 2). Des Weiteren ist eine leicht erhöhte Expression der feA3CH-Proteine in nicht-infizierten Zellen als in FFV-infizierten Zellen zu beobachten.

Die feA3C- und feA3H-Proteine sind nur in CrFK-Zellen eindeutig detektierbar (Spuren 3 und 4). Die Expression der feA3C-a-Proteine war in FFV-infizierten CrFK-Zellen stärker im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen, während die Expression von feA3H-Proteinen nach FFV-Infektion etwas schwächer war.

4.1.4 Vergleich der Aminosäuresequenzen der feA3C-a-, -b- und -c-Proteine

Das Katzen genom enthält ein *feA3H*-Gen und drei sehr ähnliche *feA3C*- (a-c)-Gene, die wahrscheinlich durch zwei konsekutive Genduplikationen entstanden sind (Münk et al., 2008). Neben dem bereits bekannten und beschriebenen feA3-Protein (Löchelt et al., 2005), das später als feA3C-a identifiziert wurde, existieren noch die Formen feA3C-b und -c (Münk et al., 2008). In Sequenzvergleichsstudien wurden in dieser Arbeit die Unterschiede der Nukleinsäuresequenzen und damit auch der Aminosäuren von feA3C-a, -b und -c mithilfe computergestützter, Algorithmus-basierter Analysen untersucht. Abb. 4.5 zeigt die Lokalisation der Aminosäureunterschiede von feA3C-b und -c im Vergleich zu feA3C-a.

APOBEC3C-A	MEPWRPSPRN	PMDRIDPNTF	RFHFPNLLYA	SGRKL CYLCE	QVETEDYFSC
APOBEC3C-B	MEPWRPSPRN	PTDRIDPNTF	RFHFPNLLYA	SGRKL CYLCE	QVETEDYFSY
APOBEC3C-C	MEPWRPSPRN	PMDRIDPNTF	RFHFPNLLYA	SGRKL CYLCE	QVETGDYFSC
FE3-CONSENSUS	MEPWRPSPRN	PMDRIDPNTF	RFHFPNLLYA	SGRKL CYLCE	QVETEDYFSC
	51	Katalytische Region			100
APOBEC3C-A	DDSDRGVFRN	KVHPWARCHA	EQCFLSWFRD	QYPYRDEEYN	VTWFLSWSPC
APOBEC3C-B	NDDSDRGVFRN	KVHPWARCHA	EQCFLSWFRD	QYPYRDEEYN	VTWFLSWSPC
APOBEC3C-C	DDSDRGVFRN	KVHPWARCHA	EQCFLSWFRD	QYPCRDEEYN	VTWFLSWSPC
FE3-CONSENSUS	DDSDRGVFRN	KVHPWARCHA	EQCFLSWFRD	QYPYRDEEYN	VTWFLSWSPC
	101				150
APOBEC3C-A	PTCAEEVVEF	LEEYRNLTLS	IFTSRLYYFW	DPNYQEGLCCK	LWDAGVQLDI
APOBEC3C-B	PTCAEEVVEF	LEEYRNLTLS	IFTSRLYYFW	DPNYQEGLCCK	LWDAGVQLDI
APOBEC3C-C	PTCAEEVVEF	LEEYRNLTLS	IFTSRLYYFY	HPNYQQGLRCK	LWDAGVQLDI
FE3-CONSENSUS	PTCAEEVVEF	LEEYRNLTLS	IFTSRLYYFW	DPNYQEGLCCK	LWDAGVQLDI
	151				
APOBEC3C-A	MSCDDFKHCW	DNFVDHKGMR	FQRNLLKDY	DFLAAELQEI	LR
APOBEC3C-B	MSCDDFKHCW	DNFVDHKGMR	FRRNLLKGY	DFLAAELQEI	LR
APOBEC3C-C	MSCDDFEHCW	DNFVDHKGMR	FQRNLLKDY	DFLAAELQEI	LR
FE3-CONSENSUS	MSCDDFKHCW	DNFVDHKGMR	FQRNLLKDY	DFLAAELQEI	LR

Abb. 4.5: Die beiden homologen feA3C-b- und -c-Proteine unterschieden sich in sechs bzw. sieben AS von feA3C-a. Die Lokalisationen der AS Unterschiede sind weiß hervorgehoben. Die katalytische Region und weitere konservierte Sequenzen sind rot umrahmt.

Die beiden homologen feA3C-b und -c-Proteine sind in sechs bzw. sieben AS von feA3C-a verschieden. Dabei ist keiner der AS-Unterschiede in der katalytischen Deaminase-Region der feA3-Proteine lokalisiert. Besonders auffällig ist, dass sich das feA3C-b-Protein hauptsächlich im N-terminalen Abschnitt (AS 1-73) relativ zur katalytischen Region von dem feA3C-a Protein unterscheidet, während AS-Unterschiede im feA3C-c-Protein relativ zu feA3C-a vorwiegend im C-terminalen Abschnitt (AS 74-183) auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter anderem in Aktivitäts- und Proteininteraktionsstudien phänotypische, funktionelle Unterschiede der drei feA3-Formen ermittelt und die Proteine miteinander verglichen.

4.2 Antivirale Aktivität der feA3-Formen gegen wt FFV im Vergleich zu FFVBBtr

In vorausgegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass das feA3C-a-Protein ein potenter Inhibitor von Bet-trunkiertem FFV (FFVBBtr) ist (Löchelt et al., 2005). Aufbauend auf diesen Befund wurden im Rahmen dieser Arbeit die antiviralen Aktivitäten der bekannten feA3c-Proteine (-a-, -b-, -c-, -H- und -CH) in Reportersystemen für FFV und dem *bet*-defizienten FFVBBtr untersucht. Die Beschreibung der CMV-basierten Plasmide pCF7 sowie pCF7BBtr zur

Expression von FFVBBtr (Bet-defizients FFV); erfolgte in Abschnitt 2.4.1. Parallel wurde die antivirale Aktivität von caninem APOBECA3A und -H-Proteinen (entsprechende Expressionsplasmide: *pcaA3A*, *pcaA3H*) zum Vergleich untersucht. Das Massenverhältnis von foamyviraler- zu feA3-Plasmid-DNA wurde in den folgenden Experimenten 3:1 eingesetzt, um ein molares Verhältnis von 1:1 zu erhalten. 293T-Zellen wurden in je acht Ansätzen (in 6 cm Zellkulturschalen) mit 6 µg pCF7 bzw. pCF7BBtr und folgenden Effektorplasmiden cotransfiziert.

- (1) 2 µg *pfeA3C-a*
- (2) 2 µg *pfeA3C-b*
- (3) 2 µg *pfeA3C-c*
- (4) 2 µg *pfeA3H*
- (5) 2 µg *pfeACH*
- (6) 2 µg *pcaA3A*
- (7) 2 µg *pcaA3H*
- (8) 2 µg pcDNA3.1

Zwei Tage nach Cotransfektion wurden die viralen Titer der FFV-haltigen Zellkulturüberstände (ZKÜ) mittels FeFAB-basierten Titrationsassay entsprechend Abschnitt 3.5.5 gemessen. Dabei wurden Verdünnungen der zu analysierenden infektiösen ZKÜ auf FeFAB-Reporterzellen gegeben (1:10 Verdünnungsreihe) und die Zellen zwei bis drei Tage mit dem infektiösen Überstand inkubiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen, die Zellen fixiert und mit einem Substrat der β -Galactosidase gefärbt. Die Auswertung blau gefärbter Zellen wurde unter dem Mikroskop vorgenommen, wobei der virale Titer in FFU/ml (*focus forming units/ ml*) angegeben.

Abb. 4.6 zeigt die Ergebnisse der antiviralen Aktivitäten der fe- und ca-A3-Proteine gegen wt und *bet*-defizientes FFV sowie den Nachweis der transfizierten FFV- und APOBEC3-Proteine im Immunoblot.

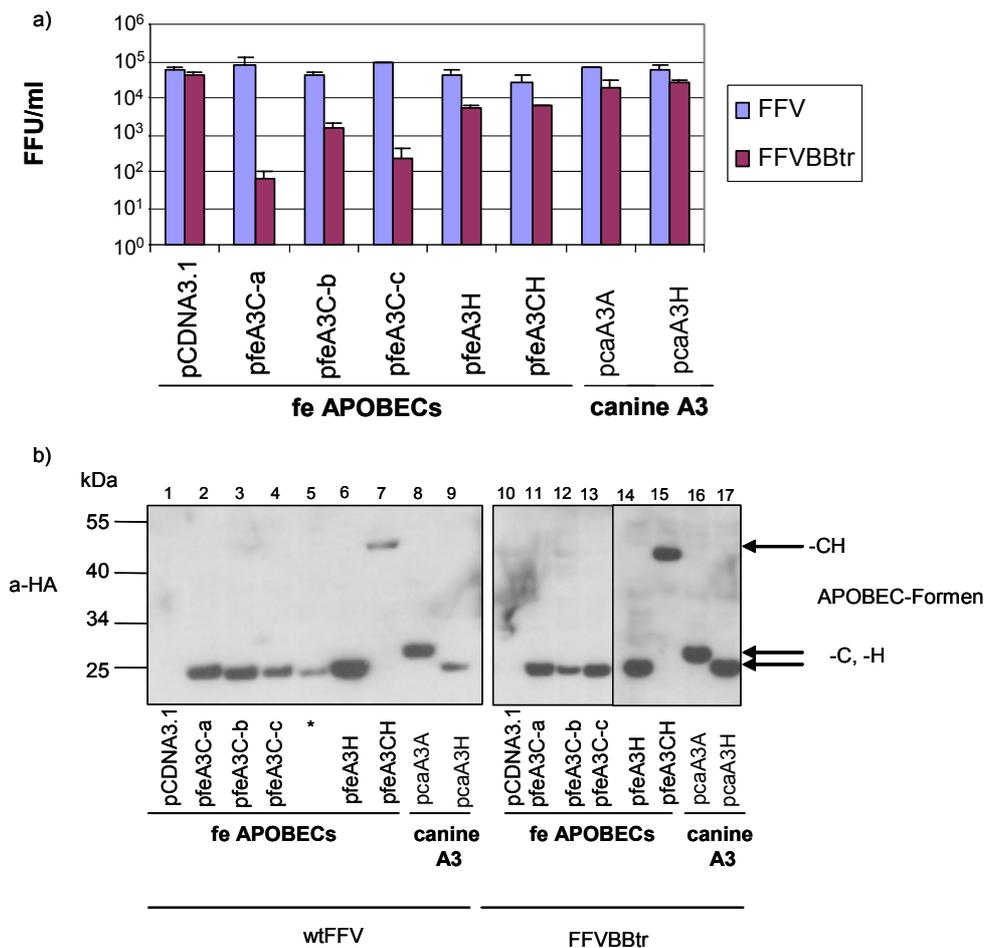


Abb. 4.6: FeA3C-a zeigt starke, feA3C-b und -c moderate antivirale Aktivität gegen FFVBBtr. 293T-Zellen wurden in jeweils 8 Ansätzen mit 6 µg pCF7 bzw. pCF7BBtr transfiziert. Zusätzlich wurden diese Ansätze mit 2 µg pfeA3-, bzw. pcaA3-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor cotransfiziert. 2 Tage nach der Cotransfektion wurden die ZKÜs geerntet, geklärt und für die Titration auf FeFAB-Zellen eingesetzt. Die 293T-Zellen wurden lysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die transfizierten feA3- bzw. caA3-Proteine wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop im Immunoblot nachgewiesen. Die mit einem Stern markierte Spur zeigt die Bande eines defekten feA3C-b-Proteins, das in dieser Arbeit nicht weiter benutzt wurde. Unterhalb des Immunoblots sind die detektierten fe- und caA3-Proteine markiert. Die Pfeile auf der rechten Seite zeigen das jeweils detektierte Protein an. Auf der linken bzw. rechten Seite ist der Antikörper zur Detektion des entsprechenden HA-markierten Proteins sowie der Proteinmarker angegeben.

Die Cotransfektion von feA3C-a reduziert nicht den Titer von wt FFV (Abb. 4.6 a). Hingegen induziert in dieser Untersuchung die feA3C-a-Expression eine etwa 700-fache Titerreduktion des *bet*-trunkierten FFV, was den publizierten Ergebnissen entspricht (Löchelt et al., 2005). Auch feA3C-b und feA3C-c inhibieren wt FFV nicht, reduzieren aber andererseits den Titer von FFVBBtr um das 70- bzw. 200-fache. Die feA3H- und feA3CH-Proteine zeigen eine vergleichbar niedrige antivirale Aktivität gegen FFVBBtr (10-fache Suppression) und keine messbare Aktivität gegen wt FFV. Keine inhibitorische Aktivität sowohl gegen wt FFV als auch

gegen FFVBBtr wurde mit caA3A und -A3H gemessen. Der zugehörige Immunoblot deutet an, dass die fe- und caA3-Proteine nicht durch die Bet-Expression im foamyviralen Kontext destabilisiert werden (Abb. 4.6b).

Zusammenfassend ist eine antivirale Aktivität der drei feA3C-Proteine mit deutlich verschiedener Effizienz gegen *bet*-trunkiertes FFV zu beobachten, wobei feA3C-a die stärkste antivirale Aktivität aufweist. FeA3H und -CH zeigen schwache aber detektierbare antivirale Aktivitäten gegen FFVBBtr, dagegen zeigen caA3A und -H keine antivirale Aktivität gegen Bet-trunkiertes FFV. Bet inhibiert die antivirale Aktivität der feA3C-Proteine und stellt so den Titer von wt FFV wieder her. Trunkiertes Bet interferiert hingegen nicht mit der antiviralen Aktivität der feA3-Proteine und stabilisiert daher auch nicht den viralen Titer von *bet*-trunkiertem-FFV. Im Gegensatz zu FIV-Vif scheint FFV-Bet nicht mit der stationären Menge der feA3C-Proteine zu interferieren (Münk et al., 2008).

4.2.1 Vergleich der Titer Bet-deletierter und Bet-trunkierter FFV-Titer nach Cotransfektion mit feA3C-a

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde als nächstes die antivirale Aktivität des feA3C-a-Proteins gegen Bet-trunkiertes im Vergleich zu Bet-freiem FFV untersucht, um phänotypische Unterschiede eines Bet-trunkierten zu einem Bet-freiem FFV ausschließen zu können. Daher wurden 293T-Zellen in acht Ansätzen (6 cm Zellkulturschalen) nach folgendem Schema cotransfiziert:

- (1) 4 µg pCF7UbiLacZ
- (2) 4 µg pCF7UbiLacZ + 1 µg pFFVBet
- (3) 4 µg pCF7UbiLacZ + 1 µg pfeA3C-a
- (4) 4 µg pCF7UbiLacZ + 1 µg pFFVBet + 1 µg pfeA3C-a
- (5) 4 µg pCF7BBtr
- (6) 4 µg pCF7BBtr + 1 µg pfeA3C-a
- (7) 4 µg pCF7
- (8) 4 µg pCF7 + 1 µg pfeA3C-a

Die pCF7UbiLacZ-Vektoren wurden mit einem pFFV-*env*-Plasmid für die Gewährleistung der Infektiosität transkomplementiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit einem Bet-exprimierenden pFFVBet-Expressionsplasmid cotransfiziert um eine mögliche Wiederherstellung des viralen Titers von FFVUbiLacZ in Anwesenheit von feA3C-a zu untersuchen. Ungleiche Mengen transfizierter Plasmide wurden mit entsprechenden Mengen pCDNA3.1-Kontrollvektor

komplementiert, um gleiche Mengen transfizierter DNA zu gewährleisten. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Überstände der transfizierten Zellen auf FeFAB-Zellen austitriert. Die Infektiosität der FFV-Vektoren wurde mit Hilfe FeFAB-basierter Titrationsassay ermittelt. Abb. 4.7 stellt die viralen Titer der beschriebenen Vektoren graphisch dar.

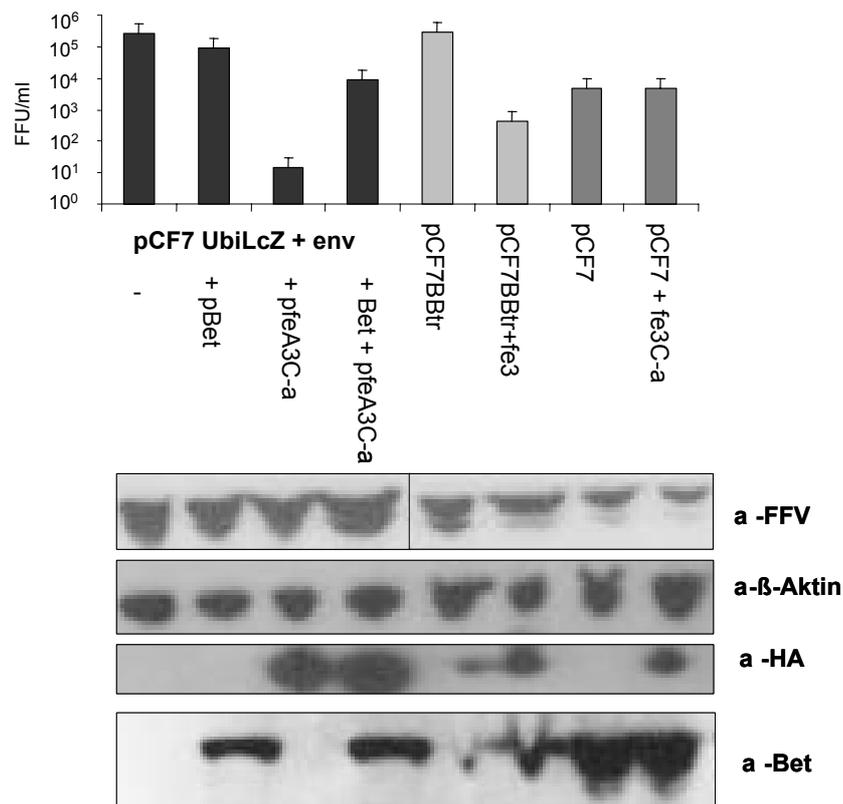


Abb. 4.7: Transkomplementierung mit Bet stellt den Titer von Bet-freiem FFV wieder her. 293T-Zellen wurden in vier Ansätzen mit 4 µg pCF7UbiLacZ, pFFVenv, und in je zwei weiteren Ansätzen mit jeweils 4 µg pCF7BBtr und 4 µg pCF7 transfiziert. Zusätzlich wurden zu den Ansätzen 1 µg pfeA3C-a-Expressionsplasmid bzw. 1 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor cotransfiziert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz des pCF7UbiLacZ-Vektors mit 1 µg pFFVBet transkomplementiert. 2 Tage nach der Cotransfektion wurden die ZKÜs geerntet, geklärt und für die Titration auf FeFAB-Zellen eingesetzt. Die 293T-Zellen wurden lysiert und die transfizierten feA3C-a-Proteine mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop in Immunoblots nachgewiesen. Über den Immunoblots sind die exprimierten Proteine aufgelistet. Auf der rechten Seite sind die Antikörper zur Detektion der entsprechenden zellassozierten Antigene angegeben.

Die Anwesenheit von feA3C-a reduzierte den Titer von FFVUbiLacZ um das ca. 10.000-fache, von ca. 10⁵ FFU/ml auf ca. 10 FFU/ml (Abb. 4.7). Der Titer konnte jedoch durch Transkomplementation mit FFVBet auf einen Wert von ca 10⁴ FFU/ml wiederhergestellt werden. FeA3C-a reduzierte auch den Titer von FFVBBtr um das 1.000-fache von ca. 10⁵ FFU/ml auf

über 10^2 FFU/ml, nicht jedoch von wt FFV. Dies bestätigt das Ergebnis der Cotransfektion von wt bzw. Bet-defizienter FFV-Genome mit feA3C-a in Abschnitt 4.2.

Zusammenfassend zeigt dieses Ergebnis, dass feA3C-a sowohl gegen Bet-trunkiertes, als auch gegen Bet defizientes FFV-Genom antiviral Aktiv ist. Des Weiteren kann Bet-defizientes FFV durch Transkomplementation mit Bet zumindest teilweise in seiner Infektiosität wieder hergestellt werden. Die Transkomplementierung Bet-trunkierter FFVBBtr Genome mit Bet wird in Abschnitt 4.3.3 beschrieben.

4.3 FeA3C-a, -H und -CH sind in Anwesenheit von FFV-Bet stabil dagegen nicht in Anwesenheit von FIV-Vif

Die Ergebnisse des FeFab-basierten Titrationsassays zeigten, dass FFV-Bet analog zu FIV-Vif die Aktivität der feA3C-, -H- und -CH-Proteine supprimiert (Münk et al., 2008). Daher wurde in der nachfolgenden Studie zunächst die Stabilität der feA3-Proteine in Anwesenheit von FIV-Vif untersucht. Anschließend wurde die Stabilität des feA3C-a-Proteins vergleichend in Anwesenheit von FIV-Vif und FFV-Bet im foamyviralen Kontext untersucht. Abschließend wurde untersucht, ob die Anwesenheit von FIV-Vif den Titer von FFVBBtr in Anwesenheit von feA3C-a wiederherstellt.

4.3.1 Nachweis der proteasomalen Degradation von feA3C-a, feA3H, feA3CH in Anwesenheit von FIV-Vif

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob FIV-Vif die reduzierte stationäre Menge der feA3C-a-, -H- und -CH-Proteine induziert. Dieser Mechanismus wäre analog den HIV-Vif-induzierten Degradation der humanen APOBEC3-Proteine (Kao, 2003; Mariani, 2003; Sheehy, Gaddis, and Malim, 2003; Stopak et al., 2003). Der durch FIV-Vif ausgelöste Mechanismus der proteasomalen Degradation wurde mithilfe des Proteasominhibitors MG132 überprüft (Lee and Goldberg, 1998). MG132 ist ein Peptid-Aldehyd, das an das 20S und 26S Proteasom bindet und so die proteasomale Degradation zellulärer oder viraler Proteine inhibiert. Daher ist zu erwarten, dass die feA3-Proteine in Anwesenheit von FIV-Vif und MG132 nicht degradiert werden.

293T-Zellen wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert und im doppelten Ansatz mit 3 µg pfeA3C-a-, -H- und -CH-Expressionsplasmiden sowie mit jeweils 3 µg pFFV-Bet-, pFIV-Vif-Expressionsplasmiden oder einem Kontrollvektor cotransfiziert. Zusätzlich wurden alle Proben mit pGFP als Expressionskontrolle transfiziert. Es wurde ein kodonoptimiertes pFIV-Vif-Expressionsplasmid genutzt, um die Vif-Expression in der Zelle zu erhöhen, die ansonsten

minimal ist⁶. Um die mögliche proteasomale Degradation der feA3-Proteine durch FIV-Vif zu untersuchen, wurden eine Hälfte der transfizierten Zellkulturen 6 h nach der Transfektion mit 10 μ M des Proteasominhibitors MG132 versetzt und 24 h inkubiert. Die Expression der transfizierten Proteine wurde im Immunoblot nachgewiesen (Abb. 4.8).

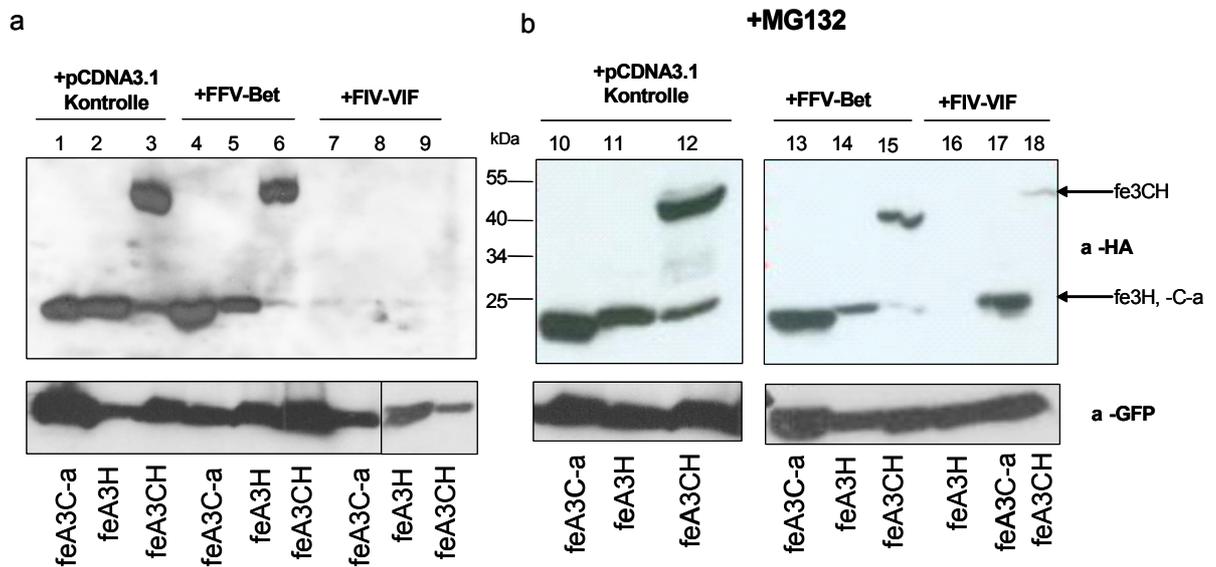


Abb. 4.8 FIV-Vif führt zur proteasomalen Degradation von feA3C-a, -H und -CH nicht jedoch FFV-Bet. 293T-Zellen wurden in zwei Ansätzen mit jeweils 3 μ g *pfeA3C-a*, *-H*, *-CH*-Expressionsplasmiden und 3 μ g *pFFV-Bet*, *pFiv*-Expressionsplasmiden oder *pcDNA3.1* Kontrollvektor cotransfiziert. 6 h nach der Transfektion und Mediumwechsel wurde jeweils ein Ansatz der Zellen mit 10 μ M des Proteasominhibitors MG132 versetzt und für weitere 24 h inkubiert. Die Zelllysate wurden auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und 10 μ l der jeweiligen Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die HA-markierten feA3C-a-Proteine wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop nachgewiesen. Das V5-markierte FIV-Vif wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das V5-Epitop und FFV-Bet mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bet detektiert. Zur Mengenkontrolle der Zelllysate wurde zusätzlich β -Aktin mit einem monoklonalen β -Aktin-Antikörper in allen Proben nachgewiesen. Über den Immunoblots ist jeweils angegeben, ob *pFFV-Bet*, *pFiv-Vif* oder das Kontrollplasmid cotransfiziert wurden. Auf der rechten Seite sind die eingesetzten Antikörper zur Detektion der entsprechenden Proteine angegeben.

Alle drei feA3-Proteine wurden sowohl separat als auch in Anwesenheit von FFV-Bet detektiert (Abb. 4.6 a, Spur 1 bis 6), während keines der drei feA3-Proteine in Anwesenheit von FIV-Vif nachweisbar war (Spur 7 bis 9). Nach Inkubation der Ansätze mit 10 μ M des Proteasominhibitors MG132 (b) wurde feA3C-a und feA3CH auch in Anwesenheit von FIV-Vif detektiert (Abb. 4.8 b, Spur 16 und 18). Nach Überexposition des Immunoblots waren auch geringe Mengen von feA3H nachweisbar.

⁶ persönliche Kommunikation mit Dr. C. Münk

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch die Inhibition des Proteasomenkomplexes die feA3-Proteine nicht mehr durch FIV-Vif, analog der HIV-Vif-vermittelten Degradation humaner A3G- und F-Proteine, zur proteasomalen Degradation geleitet werden. Dagegen trifft dieser Inhibitionsmechanismus der zellulären feA3-Proteine auf das FFV-Bet zu. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten untersucht, mittels welchem Mechanismus das foamyvirale Bet die antivirale Aktivität der feA3-Moleküle inhibiert (siehe Abschnitt 4.4).

4.3.2 Untersuchung der Inhibition von feA3C-a im foamyviralen Kontext

Zur Bestätigung der vorherigen Ergebnisse und um die Bedeutung des Proteasoms im viralen Kontext zu bestimmen, wurde die Stabilität des feA3C-a-Proteins in Anwesenheit des FIV-Vif-Proteins im Vergleich zur FFV-Bet Anwesenheit im foamyviralen Kontext untersucht. Hierzu wurden 293T-Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und in drei Ansätzen mit 3 µg *pCF7BBtr* und 1 µg *pfeA3C-a* cotransfiziert. Zudem wurden diese Zellen jeweils mit:

- (1) 1 µg *pFFV-Bet*-Expressionsplasmid
- (2) 1 µg *pFIV-Vif*-Expressionsplasmid
- (3) 1 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor

transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und gleiche Aliquots elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression der transfizierten Proteine wurde im Immunoblot analysiert.

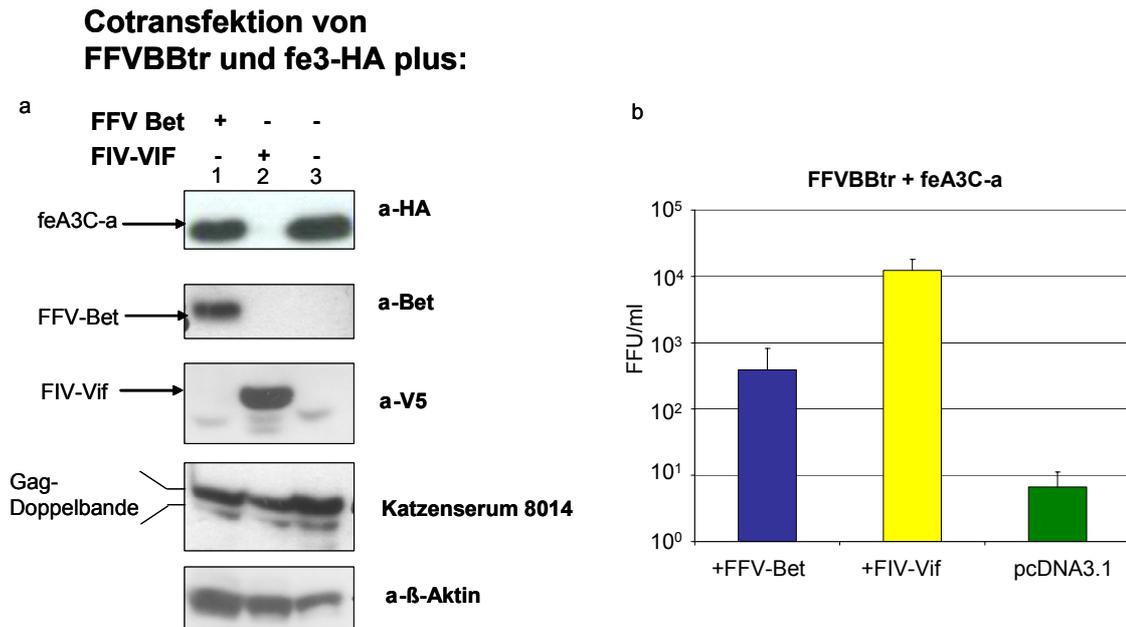


Abb. 4.9: FIV-Vif aber nicht FFV-Bet führt zu einer Degradation von feA3C-a. a Die Cotransfektion der 293T-Zellen erfolgte in drei Ansätzen mit 3 µg pCF7BBtr, 1 µg pfeA3C-a. Zusätzlich wurden diese drei Ansätze jeweils mit 1 µg pFFV-Bet, 1 µg pFIV-Vif Expressionsplasmiden bzw. 1 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert. Nach Einstellung der Proteinkonzentrationen wurden 10 µl der jeweiligen Lysate zur elektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. V5-getaggetes FIV-Vif wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das V5-Epitop und FFV-Bet mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bet detektiert. FFV-spezifische Gag-Proteine wurden mit dem FFV-Katzenserum 8014 detektiert. Zur Mengenkontrolle der Zellysate wurde zusätzlich β-Aktin mit einem monoklonalen β-Aktin-Antikörper in allen Proben nachgewiesen. Über den Immunoblots ist jeweils angegeben, ob FFV-Bet oder FIV-Vif cotransfiziert wurde. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen das jeweils detektierte Protein an. Auf der rechten Seite sind die eingesetzten Antikörper zur Detektion der entsprechenden Proteine angegeben. b Graphische Darstellung der viralen Titer. Zwei Tage nach Cotransfektion wurden die ZKÜs geerntet, geklärt und die Titer auf FeFAB-Zellen bestimmt.

Abb. 4.9 zeigt, dass feA3C-a sowohl in Anwesenheit von FFVBBtr auch nach Transkomplementierung mit FFV-Bet detektiert wurden (Spur 1 und 3). Dies deutet darauf hin, dass weder FFV-Bet selbst, noch FIV-Vif in Anwesenheit von MG132 die stationäre Menge an feA3C-a beeinflusst. Dagegen wird deutlich, dass die Anwesenheit von FIV-Vif die proteasomale Degradation von feA3C-a einleitet (Spur 2). Weder FIV-Vif noch FFV-Bet ändern die Expression der anderen viralen Proteine, wie z.B. Gag. Die Cotransfektion von FFVBBtr und feA3C-a zeigte einen reduzierten Titer von unter 100 FFU/ml, was das Ergebnis von Abschnitt 4.2 bestätigt. Dagegen konnte der virale Titer nach zusätzlicher Transfektion von FIV-Vif um das 1000-fache und nach Transkomplementation mit der gleichen Menge FFV-Bet um das 50-fache erhöht werden.

4.3.3 Transkomplementation Bet-defizienter FFV durch FIV-Vif

Die Ergebnisse des Abschnitts 4.3.1 zeigen, dass FIV-Vif, nicht aber FFV-Bet, die Degradation des feA3C-a induziert. Daher war es nun von großem Interesse zu untersuchen, ob FIV-Vif Bet-defiziente FFV-Genome transkomplementieren und somit den Titerverlust durch feA3C-a verhindern kann. Die Transfektion der 293T-Zellen erfolgte in vier Ansätzen (6 cm Zellkulturschalen) mit 5 µg pCF7BBtr. Davon wurden drei Ansätze mit 1 µg pfeA3C-a-Expressionsplasmid und zudem jeweils mit:

- (1) 1 µg pFFV-Bet-Expressionsplasmid
- (2) 1 µg pFIV-Vif-Expressionsplasmid
- (3) 1 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor

cotransfiziert. Der vierten Probe wurde keine weitere DNA zugesetzt. Gleichzeitig wurden als Kontrolle 293T-Zellen in drei Ansätzen mit 5 µg pCF7 transfiziert. Zwei der Ansätze wurden zudem mit:

- (1) 1 µg pFIV-Vif und 1 µg pfeA3C-a
- (2) 1 µg pcDNA3.1 und 1 µg pfeA3C-a

cotransfiziert. Zu allen sieben Ansätzen wurde 1 µg pGFP als Transfektionskontrolle transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, gleiche Aliquots elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Infektiosität der FFVBBtr Titer mittels eines FeFab-basierten Titrationsassays gemessen.

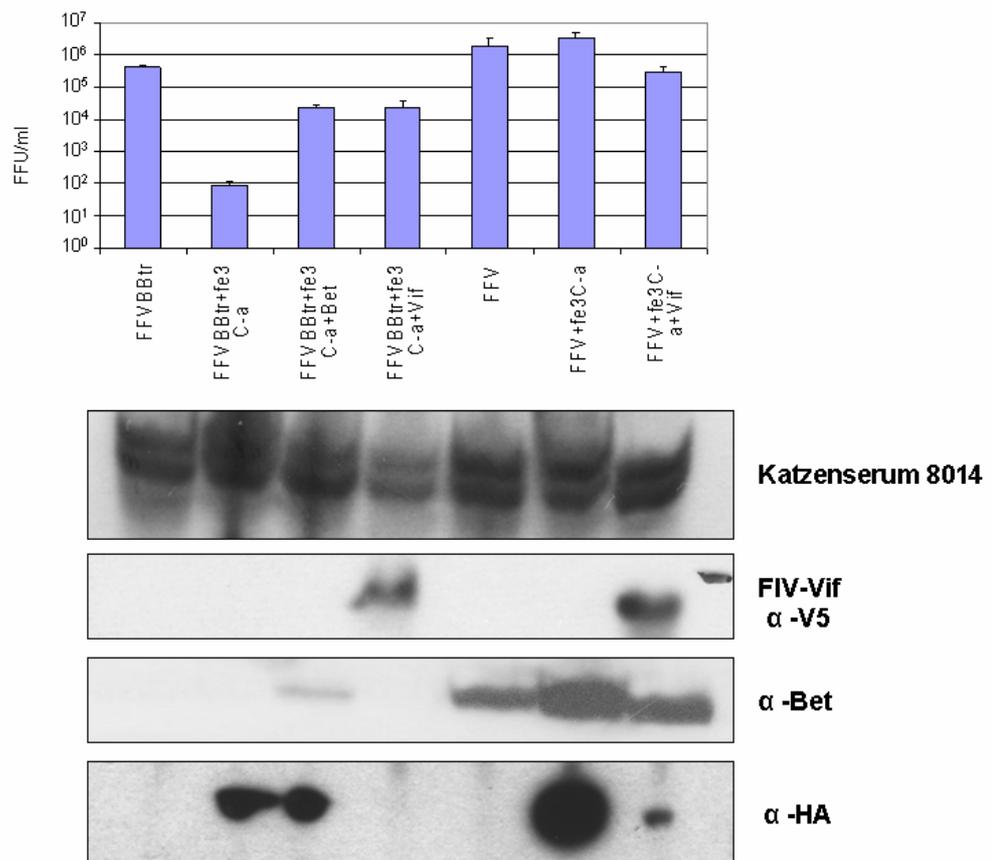


Abb. 4.10: FFV-Bet und FIV-Vif stellen den Titer von FFVBBtr in Anwesenheit von feA3C-a wieder her. 293T-Zellen wurden in sieben Ansätzen mit 5 μ g pCF7 bzw. pCF7BBtr transfiziert. Zudem wurden die einzelnen Ansätze mit 1 μ g pfeA3C-a und entsprechend 1 μ g pFFV-Bet oder pFIV-Vif Expressionsproteinen cotransfiziert. Zur Expressionskontrolle wurde zusätzlich in allen Ansätzen 1 μ g pGFP mit transfiziert. Die Virustiter wurden 2 Tage nach Infektion mittels des FeFab Titrationsassays ermittelt. Transfizierte 293T-Zellen wurden lysiert und die HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop im Immunoblot nachgewiesen. Über den Immunoblots sind die jeweils exprimierten Proteine dargestellt. Rechts der Immunoblots sind die entsprechenden Antikörper zum Nachweis der einzelnen Proteine angegeben.

Die Ergebnisse der Titeranalysen sind in Abb. 4.10 dargestellt. Der Vergleich der Titer von FFVBBtr und feA3C-a cotransfiziertes FFVBBtr zeigt, dass dieser in Anwesenheit von feA3C-a um mehr als das 1000-fache supprimiert wurde. Dies korreliert mit dem Ergebnis von Abschnitt 4.2. Sowohl in Anwesenheit von cotransfiziertem FFV-Bet, als auch von FIV-Vif wird der Titer von FFVBBtr nur noch ca. zehnfach supprimiert. FFV-Bet, wie auch FIV-Vif inhibieren beide die antivirale Aktivität von feA3C-a, wobei zu beobachten ist, dass feA3C-a durch FIV-Vif degradiert wird und dieses somit nicht in Spur 4 und nur stark reduziert in Spur 7 im Immunoblot detektierbar ist. Keine signifikante Titerveränderung ist beim Vergleich von wt FFV und wt FFV im Verbund mit feA3C-a, FFV-Bet oder FIV-Vif zu beobachten. Auch dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis von Abschnitt 4.2. Eine nur geringe Titerveränderung ist bei wt FFV cotransfiziert mit feA3C-a und FIV-Vif im Vergleich zu wt FFV allein zu beobachten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass FIV-Vif, wie auch FFV-Bet den Titer von *bet*-defizientem FFV in Anwesenheit von feA3C-a zu 90 % des Originaltiters wiederherstellen.

4.4 Interaktionsstudien von wt FFV-Bet und mutiertem FFV-Bet mit den feA3-Proteinen

Obschon nur feA3C-Isoformen den Titer Bet-defizienter Viren supprimieren, wurden mithilfe von Co-Immunopräzipitationsstudien die Interaktionen von FFV-Bet mit allen bekannten feA3-Proteinen (feA3C-a, -b, -c, -H, -CH) auf molekularer Ebene untersucht. Diese Co-immunopräzipitationsstudien wurden für das zu der Zeit einzig bekannte feA3C-a bereits durchgeführt (Löchelt et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigten, dass feA3C-a mit wt Bet, nicht aber mit BetMCS, einer funktionsdefizienten Mutante (in Abschnitt 2.4.1 erläutert), im foamyviralen Kontext interagiert. Aufbauend auf diesen Resultaten wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion aller weiteren feA3-Proteine mit wt und mutiertem Bet untersucht.

4.4.1 Co-Immunopräzipitationsstudien von wt FFV-Bet und mutiertem FFV-BetMCS mit feA3C-a, -H und -CH

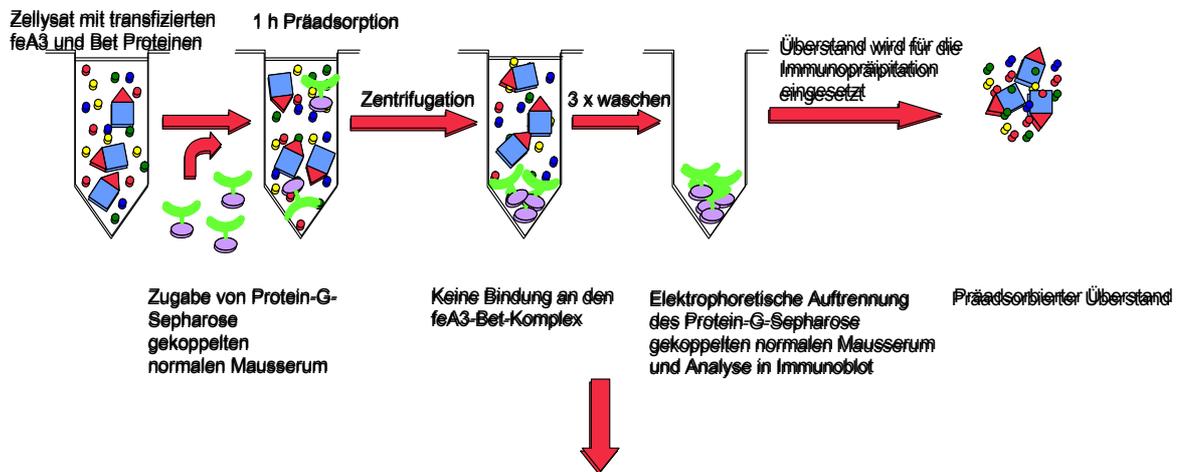
Für die Untersuchung der Interaktion von feA3C-a, -H und -CH mit FFVBet und FFVBetMCS wurden je vier Ansätze von 293T-Zellen (in 10 cm Zellkulturschalen) mit jeweils 15 µg pCF7 bzw. pCF7BetMCS transfiziert. Ein Massenverhältnis von foamyviraler- zu feA3-Plasmid-DNA wurde in den folgenden Experimenten auf 3:1 eingesetzt, um ein molares Verhältnis von 1:1 zu erhalten. Zu diesen Ansätzen wurden jeweils folgende Expressionsvektoren cotransfiziert:

- (1) 5 µg pfeA3C-a
- (2) 5 µg pfeA3H
- (3) 5 µg pfeA3CH
- (4) 5 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor

Alle pfeA3-Expressionsplasmide enthalten ein HA-Epitop C-terminal zum feA3-Gen. Wie in Abschnitt 2.4.1 dargelegt wurde, enthält das Bet einen kurzen Sequenzaustausch (AS: 117-119) in pCF7BetMCS (Alke et al., 2000). Diese Mutation in der *Bet* deletiert ein putatives Leucin-Zipper-Motiv, das möglicherweise eine bedeutsame Rolle bei der Inhibition der antiviralen Aktivität der feA3C-Proteinfamilie ausübt (Löchelt et al., 2005).

Der Versuchsablauf der Co-Immunopräzipitation sowie der Kontrollpräzipitation ist in Abb. 4.11 graphisch dargestellt und wird in Abschnitt 3.4.7 detailliert erläutert.

Kontrollimmunopräzipitation und Präadsorption



Immunopräzipitation

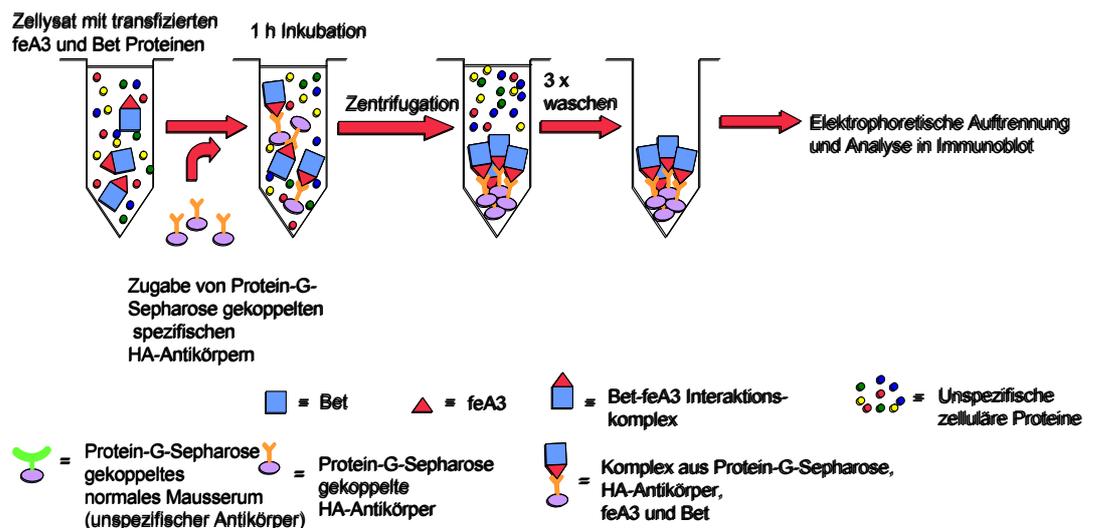


Abb. 4.11 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Immunopräzipitation. Detaillierte Erläuterungen sind im Text von Abschnitt 4.4 und in Abschnitt 3.4.7 zu finden.

2 Tage nach Cotransfektion wurden 293T-Zellen mit nicht-ionischen Detergenzpuffer lysiert und zunächst mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen und Normalem Maus Serum (NMS) anstelle des monoklonalen HA-Antikörpers zur Spezifitätskontrolle inkubiert. Des Weiteren dient diese Inkubation der Präadsorption unspezifisch bindender Proteine. Anschließend wurde nach Sedimentation der Sepharose-Kügelchen der Überstand abgenommen und mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen und monoklonalen HA-Antikörpern inkubiert. Dabei wurden die HA-markierten feA3-Proteine an HA-spezifische Protein-G-Sepharose-Kügelchen zusammen mit dem interagierenden Bet gebunden. Diese Komplexe wurden dann durch Zentrifugation

sedimentiert und gewaschen. Die Proben sowie die Negativkontrollen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und FFV-Bet sowie HA-markiertes feA3 im Immunoblot detektiert.

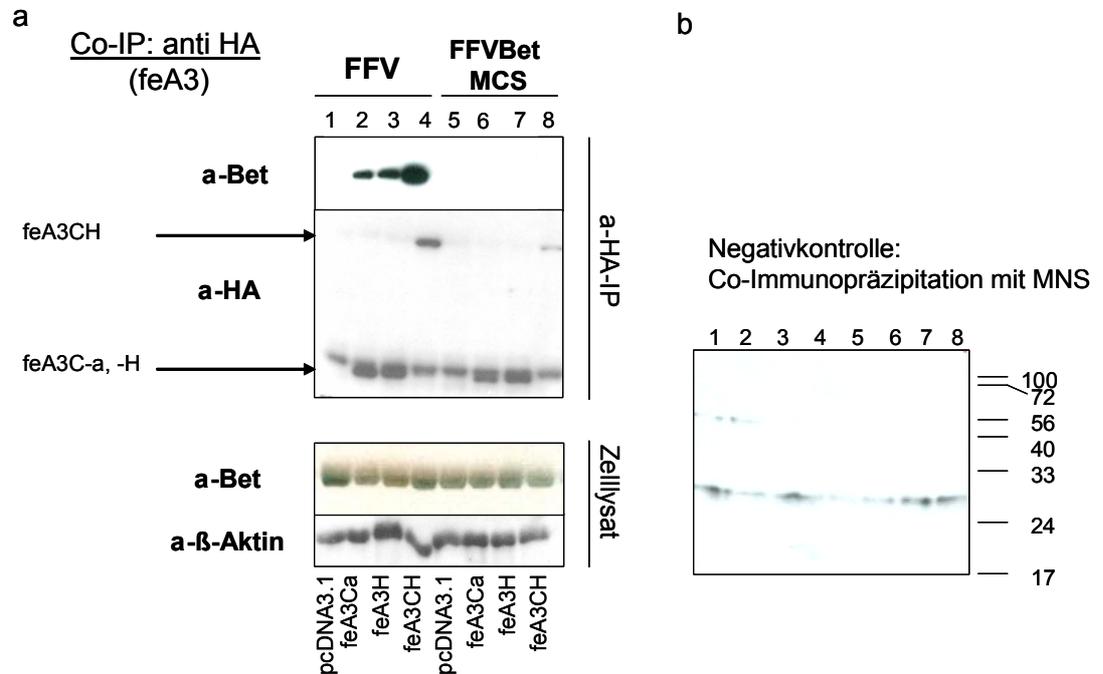


Abb. 4.12: Wt Bet bindet alle drei bekannten feA3-Hauptformen. 293T-Zellen wurden in je vier Ansätzen mit 15 µg pCF7 oder pCF7BetMCS transfiziert. Zusätzlich wurden diese Ansätze mit 5 µg pfeA3C-a, -H, -CH-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor cotransfiziert. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Zellen geerntet und die feA3-Proteine mit den FFV-Bet Proteinen entsprechend Punkt 3.4.7 co-immunopräzipitiert. Als Positivkontrolle wurden die Proteine in den Ganzzelllysaten mithilfe eines Immunoblots nachgewiesen. Dabei wurde Bet mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bet detektiert. Zur Mengenkontrolle der Zelllysate wurde β-Aktin mit einem monoklonalen β-Aktin-Antikörper in allen Proben nachgewiesen. HA-immunopräzipitierte feA3-Proteine wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop nachgewiesen. Die im anti-HA-Immunoblot nachgewiesenen feA3C-a und -H sind zum Teil durch eine leichte Kette des HA-Antikörpers überlagert. Über der Abb. sind die Spuren von FFV und FFVBetMCS angezeigt. Links neben dem Immunoblot sind die Antikörper zur Detektion der entsprechenden Proteine angegeben b Spezifitätskontrolle der Co-Immunopräzipitation mit dem Kontrollserum NMS anstelle des monoklonalen HA-Antikörpers nach Inkubation mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bet.

Wie die Ergebnisse in Abb. 4.12 a Spuren 1 und 2 zeigen, interagiert feA3C-a mit FFV-Bet, was die publizierten Ergebnisse bestätigt (Löchelt et al., 2005). Zusätzlich ist zu sehen, dass FFV-Bet auch mit feA3H und feA3CH-Proteinen co-präzipitiert wird (Spuren 3 und 4), wobei die Bindung zu feA3CH am stärksten ist. Gleichzeitig wurde keine Co-Immunopräzipitation von mutierten FFV-Bet-Proteinen mit den drei feA3-Proteinen nachgewiesen (Spuren 5 bis 8), was die Spezifität der Reaktion bestätigt und mit der fehlenden biologischen Funktion von Bet-MCS korreliert. Die Positivkontrolle zeigt, dass nach Co-Immunopräzipitation die feA3-Proteine in

allen Proben in adäquaten Mengen vorhanden sind. Die unspezifischen Banden in allen Proben sind auf die leichte Immunglobulinkette der eingesetzten HA-Antikörper zurückzuführen. Abb. 4.12 b zeigt, dass nach Co-Immunopräzipitation der gleichen Proben mit Normalen Maus Serum (NMS) anstelle von monoklonalen HA-Antikörpern kein FFV-Bet präzipitiert wurde und so im Immunoblot detektierbar war, was zudem die Spezifität der Reaktion bestätigt.

Die experimentellen Daten zeigen, dass wt FFV-Bet mit allen drei feA3-Proteinen interagiert, während die Zerstörung des putativen Leuzin-Zipper-Motivs in der *bel* 2-Region die Interaktion von FFV-Bet mit den feA3-Formen inhibiert.

4.4.2 Co-Immunopräzipitation von feA3C-a-, -H- und -CH-Proteinen mit FFV-Bet im proviralen Kontext

Aufbauend auf den Ergebnissen von Abschnitt 4.4 wurde im Folgenden untersucht, ob die Interaktion von FFV-Bet und den feA3-Proteinen von weiteren foamyviralen Faktoren abhängig ist. Dazu wurden 293T-Zellen in jeweils vier Ansätzen (in 10 cm Zellkulturschalen) mit je 15 µg pCF7 oder mit 5 µg pFFV-Bet transfiziert. Zu diesen Ansätzen wurden wieder die drei feA3-Expressionsplasmide (-C-a, -H und -CH) und das Kontrollplasmid cotransfiziert. Die Zellen wurden 2 Tage nach Cotransfektion lysiert und die Proteine entsprechend Abschnitt 3.4.7 co-immunopräzipitiert.

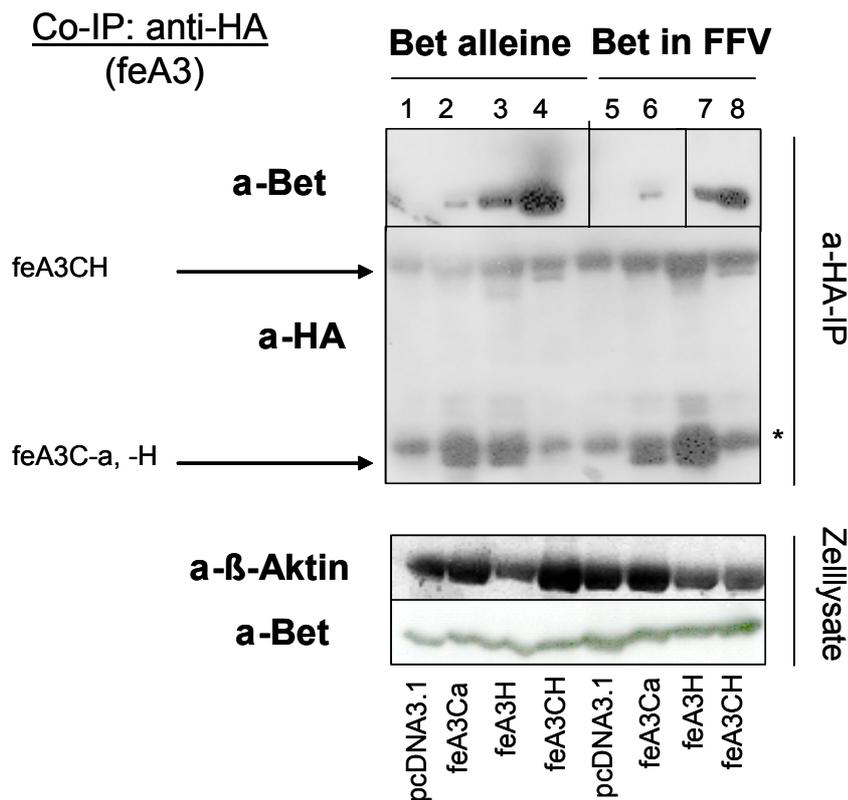


Abb. 4.13: Interaktion von FFV-Bet mit feA3-Proteinen ist unabhängig von weiteren viralen Faktoren. 293T-Zellen wurden in je vier Ansätzen mit entweder mit 5 µg pFFV-Bet oder 15 µg pCF7 transfiziert. Zusätzlich wurden diese Ansätze mit 5 µg pfeA3C-a, -H, -CH-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor cotransfiziert. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Zellen geerntet und die feA3-Proteine mit den FFV-Bet-Proteinen entsprechend Abschnitt 3.4.7 co-immunopräzipitiert. Als Positivkontrolle wurden die Proteine in den Zelllysaten mithilfe eines Immunoblots nachgewiesen. Zur Mengenkontrolle der Zelllysate wurde β-Aktin mit einem monoklonalen β-Aktin-Antikörper in allen Proben nachgewiesen. In den Spuren 1-4 wurde nur FFV-Bet, in 5-8 das komplette FFV-Genom coexprimiert. Unter der Abb. sind die jeweils coexprimierten Proteine gekennzeichnet. Über der Abb. ist Bet separat oder im Kontext mit FFV gekennzeichnet. Links neben dem Immunoblot sind die Antikörper zur Detektion der entsprechenden Proteine angegeben.

Das in Abb. 4.13 dargestellte Ergebnis zeigt eine Co-Immunopräzipitation von FFV-Bet mit allen drei feA3-Formen (Banden 2 bis 4), wobei entsprechend Abb. 4.12 die größte Menge FFV-Bet durch feA3CH co-immunopräzipitiert wurde. Des Weiteren zeigen die Banden 6 bis 8, dass FFV-Bet auch in Abwesenheit weiterer foamyviraler Faktoren mit den feA3-Proteinen copräzipitiert wird. HA-markierte feA3-Proteine wurden in allen Spuren des Immunoblots mithilfe eines monoklonalen HA-Antikörpers nachgewiesen. Die Analyse der Zellextrakte zeigt, dass Bet und die feA3-Formen in den erwarteten Mengen in den Proben exprimiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FFV-Bet mit allen drei feA3-Proteinen unabhängig von weiteren foamyviralen Faktoren interagiert.

4.4.3 Vergleichende Interaktionsstudien von FFV-Bet und FFV-BetMCS mit den feA3-Isoformen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Studien zur feA3 und Bet-Interaktion auf die neu identifizierten feA3-Proteine ausgeweitet und die Spezifität der Interaktion molekular charakterisiert. Dazu wurden 293T-Zellen in jeweils vier Ansätzen (in 10 cm Zellkulturschalen) mit 15 µg pCF7 oder pCF7BetMCS transfiziert. Zu diesen Ansätzen wurden jeweils folgende Expressionsvektoren cotransfiziert:

- (1) 5 µg pfeA3C-a
- (2) 5 µg pfeA3C-b
- (3) 5 µg pfeA3C-c
- (4) 5 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor

Alle pfeA3C-Expressionsplasmide enthalten ein HA-Epitop C-terminal zum feA3-Gen, welches zur Co-IP mit einem HA-spezifischen monoklonalen Antikörper genutzt wurde. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Zellen lysiert und die transfizierten Proteine entsprechend Abschnitt 3.4.7 co-immunopräzipitiert.

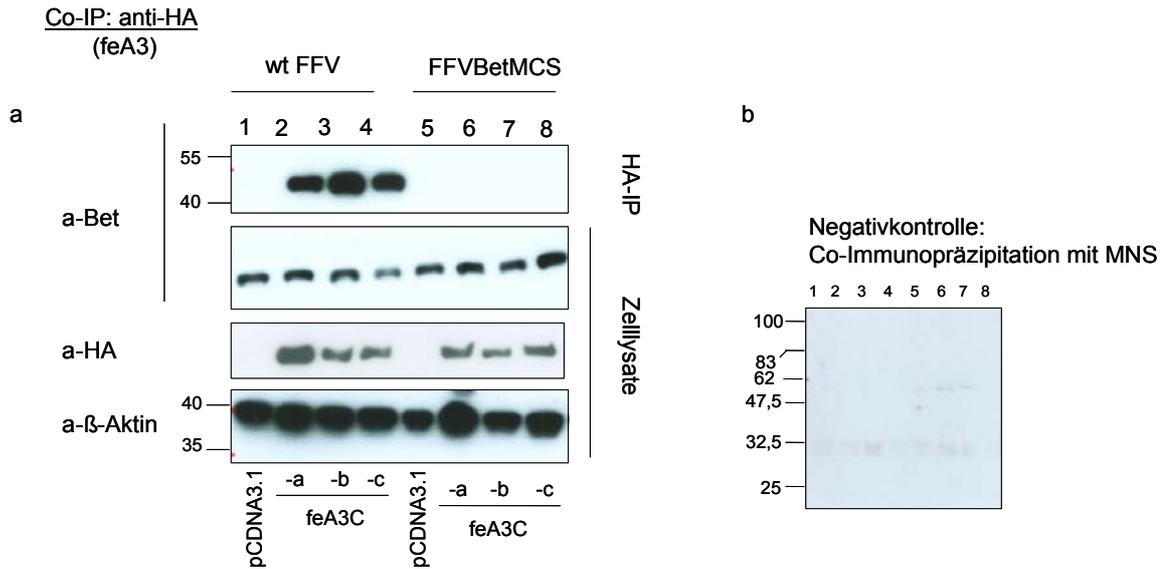


Abb. 4.14: FFVBet bindet alle feA3C-Proteine, während nicht-funktionelles Bet keine feA3-Bindungsaktivität hat. a 293T-Zellen wurden in je vier Ansätzen mit 15 µg pCF7 oder pCF7BetMCS transfiziert. Zusätzlich wurden diese Ansätze mit 5 µg pfeA3C-a, -b, -c-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor cotransfiziert. Als Positivkontrolle wurden die feA3C- und FFVBet-Proteine in den Ganzzelllysaten im Immunoblot nachgewiesen. Dabei wurde Bet mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bet detektiert. Zur Mengenkontrolle der Zelllysate wurde β-Aktin mit einem monoklonalen β-Aktin-Antikörper in allen Proben nachgewiesen. Unterhalb der Abb. sind die jeweils exprimierten Proteine angegeben. Über der Abb. sind die Spuren von wt FFV und FFVBetMCS angezeigt. b Spezifitätskontrolle der Co-Immunopräzipitation mit MNS anstelle von monoklonalen HA-Antikörpern nach Inkubation mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bet. Links neben dem Immunoblot sind die Antikörper zur Detektion der entsprechenden Proteine angegeben.

Die feA3-Bet Co-Immunopräzipitationsstudien zeigen, dass Bet alle bekannten feA3-Proteine spezifisch bindet und dass dies unabhängig von der anti-FFV-Aktivität der einzelnen feA3-Proteine geschieht (Abb. 4.16). Das wt Bet-Protein im foamyviralen Kontext wurde mit den HA-markierten feA3C-a-, -b- und -c-Proteinen co-präzipitiert (Spur 2 bis 4), nicht jedoch das BetMCS-Protein (Spuren 6 bis 8). Die Analyse der Zelllysate zeigt, dass alle Proteine adäquat exprimiert waren. Gleichzeitig wurde die Expression von FFV-Bet in den Zelllysaten und β-Aktin als Ladekontrolle nachgewiesen (Spuren 1-8). Dieses Ergebnis zeigt, dass alle drei feA3C-Proteine mit dem wt Bet-Protein, nicht aber mit BetMCS-Protein interagieren.

Im Folgenden sollte deshalb bestimmt werden, ob die feA3-Proteine mit FFV-Gag interagieren, in Virionen Bet-defizienter FFV-Genome integriert werden und ob diese Interaktion dem inhibitorischen Spektrum der Bet-Proteine entspricht.

4.5 Untersuchung der Interaktion von feA3C-a, feA3H und feA3CH mit FFV-Gag

Vorangegangene Studien ergaben, dass feA3C-a in Virionen Bet-trunkierter FFV-Genome (FFVBBtr) inkorporiert wird, sofern kein funktionelles Bet exprimiert ist (Löchelt et al., 2005). Bevor diese Ergebnisse durch vergleichende Inkorporationsstudien aller bekannten feA3-Proteine in Viruspartikel Bet-defizienter Genome (pCF7BBtr, pCF7BetMCS) ausgeweitet wurden, wurde zunächst die molekulare Interaktion der feA3-Proteine mit FFV-Gag in Proteininteraktions-Assays, sog. Pull-down-assays, untersucht. Der Versuchsablauf des Proteininteraktions-Assays ist in

Abb. 4.15 schematisch dargestellt und in Abschnitt 3.4.8 erläutert.

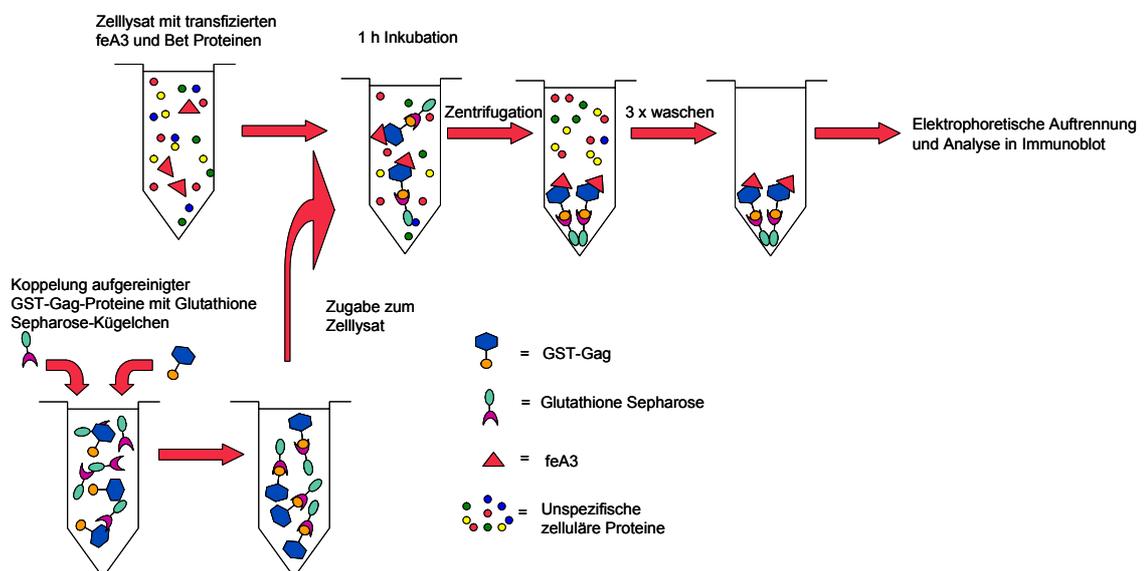


Abb. 4.15: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zum Proteininteraktions-Assay (Pull-Down-Assay). Detaillierte Erläuterungen sind im Text von Abschnitt 4.5 und in Abschnitt 3.4.8 zu finden.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Interaktion der feA3-Proteine mit FFV-Gag abhängig von der Anwesenheit viraler RNA ist.

4.5.1 RNA-unabhängige Interaktion von FFV-Gag mit feA3C-a, -H- und -CH

In Analogie zur Inkorporation humaner A3-Proteine in Viruspartikel Vif-defizienter HIV-Genome sollte die Interaktion der feA3-Proteine mit FFV-Gag die wesentliche Voraussetzung für die Inkorporation in Virionen Bet-defizienter FFV-Genome sein. Um diese Interaktion zu

untersuchen, wurden 293T-Zellen in vier Ansätzen mit 10 µg *pfeA3C-a*-, *H*- und *-CH*-Expressionsplamiden oder einem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert und 2 Tage nach Transfektion lysiert. Die Zelllysate wurden in An- und Abwesenheit von 50 µg RNaseA für 1 h bei Raumtemperatur mit aufgereinigten GST-Gag- (und GST-Proteinen als Negativkontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen drei Mal gewaschen und die gebundenen und copräzipitierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die HA-markierten feA3-Proteine wurden im Immunoblot mittels eines monoklonalen HA-Antikörpers detektiert.

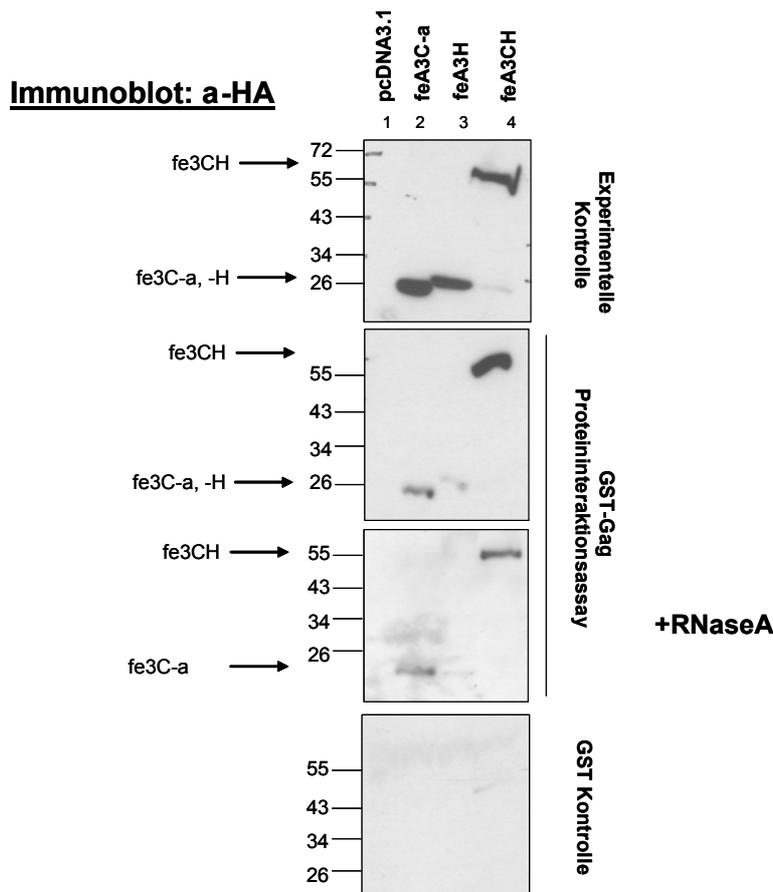


Abb. 4.16: Die Gag-Interaktionsstelle des feA3 ist in der feA3C-Domäne lokalisiert. 293T-Zellen wurden mit 10 µg *pfeA3C-a*, *-H*, *-CH*-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate in An- oder Abwesenheit von 50 µg RNaseA entsprechend Abschnitt 3.4.8 einem Proteininteraktions-Assay mit GST-Gag unterzogen. Als Negativkontrolle wurden die Zelllysate mit GST allein inkubiert. Die präzipitierten Proben und die unbehandelten Zelllysate wurden auf einem Proteingel aufgetrennt und anschließend im Immunoblot analysiert, wobei die HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper nachgewiesen wurden. Über den Blots sind die jeweils transfizierten feA3-Proteine angegeben. Der erste Immunoblot zeigt die Analyse der Zelllysate, gefolgt von den Ergebnissen der Proteininteraktions-Assays in Ab- und Anwesenheit von RNaseA wie angegeben und der GST-Negativkontrolle. Die Pfeile auf der linken Seite kennzeichnen die detektierten feA3-Proteine. Ferner sind auf der linken Seite jeweils die Banden des parallel aufgetrennten Markers angezeigt.

Die feA3C-a- und feA3CH-Proteine wurden in Anwesenheit von GST-Gag-Proteinen im Immunoblot bei An- wie auch bei Abwesenheit von RNaseA nachgewiesen (Abb. 4.16, Spuren 2 und 4). FeA3H ist in der Abwesenheit von RNaseA sehr schwach und bei Anwesenheit gar nicht detektierbar (Spur 3). Die Spur der Negativkontrolle zeigt deutlich, dass keines der drei feA3-Proteine im Immunoblot nach Interaktion mit dem GST-Protein präzipitiert wurde. Zusammenfassend lassen sich aus dem Interaktionsversuch folgende Schlüsse ziehen:

- FeA3C-a- und feA3CH-Proteine reagieren stark mit GST-Gag, die Anwesenheit von RNA hat hierauf keinen Einfluss.

- Die Interaktion zwischen GST-Gag und feA3H-Proteinen ist sehr schwach und kann durch RNA stabilisiert werden.

4.5.2 Untersuchung der Interaktion der drei feA3C-Isoformen mit FFV-Gag

Aufbauend auf den Ergebnissen des Abschnitts 4.5.1 wurden weitere Proteininteraktionsstudien mit FFV-GST-Gag und den feA3C-Isoformen durchgeführt. 293T-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 µg *pfeA3C-a*-, *-b*-, *-c*-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert und entsprechend Abschnitt 4.5 in An- oder Abwesenheit von 50 µg RNaseA mit aufgereinigtem GST-Gag-Protein und GST als Negativkontrolle gefällt.

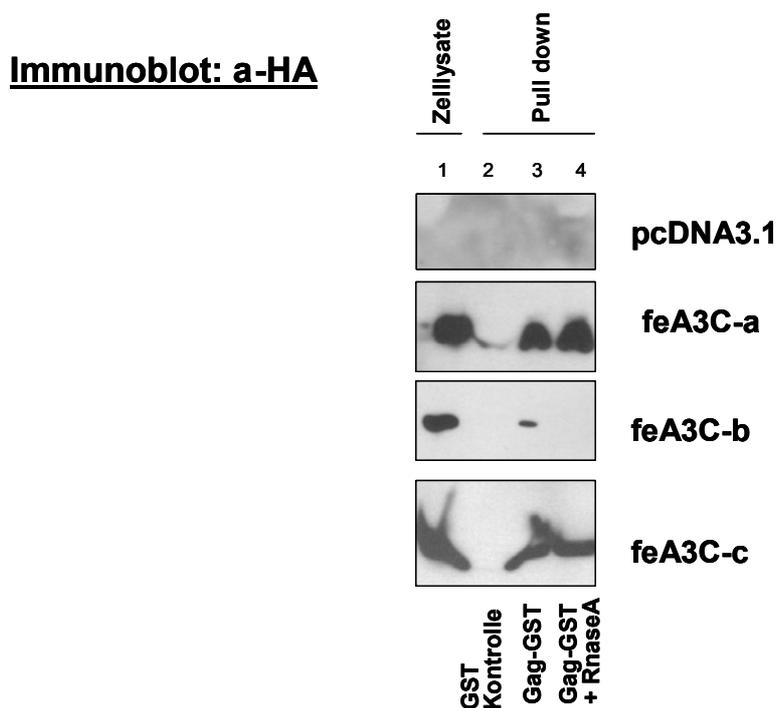


Abb. 4.17: Schwache und RNaseA-empfindliche Interaktion von feA3C-b mit FFV-Gag. 293T-Zellen wurden mit 10 µg *pfeA3C-a*-, *-b*-, *-c*-Expressionsvektoren oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Zellen geerntet. Die Lysate wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 50 µg RNaseA entsprechend Abschnitt 3.4.8 einem Proteininteraktions-Assay mit GST-Gag unterzogen. Als Negativkontrolle wurden die Zelllysate mit GST allein inkubiert. Die gefällten Proben und die Zelllysate wurden auf einem Proteingel aufgetrennt und anschließend im Immunoblot analysiert, wobei die HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper nachgewiesen wurde. Rechts neben den Blots sind die jeweils exprimierten feA3-Proteine angegeben. Über den Blots ist jeweils angegeben, ob es sich um Zelllysate oder Proteininteraktions-Präzipitate handelt. Unter den Blots ist die GST-Negativkontrolle und GST-Gag bzw. GST-Gag in Anwesenheit von RNaseA angegeben.

Die feA3C-a- und -c-Proteine waren nach dem Proteininteraktions-Assay mit aufgereinigten FFV-GST-Gag-Proteinen im Immunoblot mittels des HA-Antikörpers klar, das feA3C-b-Protein hingegen nur schwach detektierbar (Abb. 4.17). Die feA3C-a- und -c-Proteine wurden nach dem Proteininteraktions-Assay im Immunoblot auch in Anwesenheit von RNaseA nachgewiesen, während keine feA3C-b-Gag-Interaktion in Anwesenheit von RNaseA erzielt wurde.

Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die feA3C-a- und -c-Proteine stark mit GST-FFV-Gag interagieren und diese Interaktion RNA-unabhängig ist. Allein das feA3C-b-Protein zeigt ähnlich wie feA3H eine nur sehr schwache Interaktion mit FFV-Gag-Proteinen, die durch die Abwesenheit von RNA ganz beeinträchtigt wird.

4.5.3 Wt FFV-Bet verhindert die Inkorporation von feA3C-a, feA3H und feA3CH in FFV-Viruspartikel

Wie im Abschnitt 4.2 und 4.2.1 erläutert wurde, besitzen FFV-Vektoren mit Trunkationen oder Mutationen in Bet einen feA3C-typabhängigen defekten Phänotyp. Außerdem wurde in Abschnitt 4.3.1 gezeigt, dass in Anwesenheit von FFV-Bet im Gegensatz zu FIV-Vif der zelluläre feA3-Expressionslevel konstant bleibt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde nun untersucht, ob Bet durch Bindung an die feA3-Formen die Inkorporation der feA3-Proteine in FFV-Virionen inhibiert. Hierzu wurden je vier Ansätze (in 10 cm Zellkulturschalen) von 293T-Zellen mit jeweils 15 µg *pCF7*, *pCF7BetMCS* bzw. *pCF7BBtr* transfiziert. Zu diesen Ansätzen wurden jeweils folgende Expressionsvektoren cotransfiziert:

- (1) 5 µg *pfeA3C-a*
- (2) 5 µg *pfeA3H*
- (3) 5 µg *pfeA3CH*
- (4) 5 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor

Die transfizierten Zellen sowie die virushaltigen Überstände wurden 2 Tage nach Cotransfektion geerntet. Nach Isolation der Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand entsprechend Abschnitt 3.5.6 wurden diese wie auch reguläre Aliquots der Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, gebロットet und die FFV-spezifischen Gag-Proteine in der Viruspartikelfraktion mit dem Katzenserum 8014 detektiert. Die HA-markierten feA3-Proteine wurden mithilfe eines monoklonalen HA-Antikörpers in der Zelllysate- und der Viruspartikelfraktion detektiert.

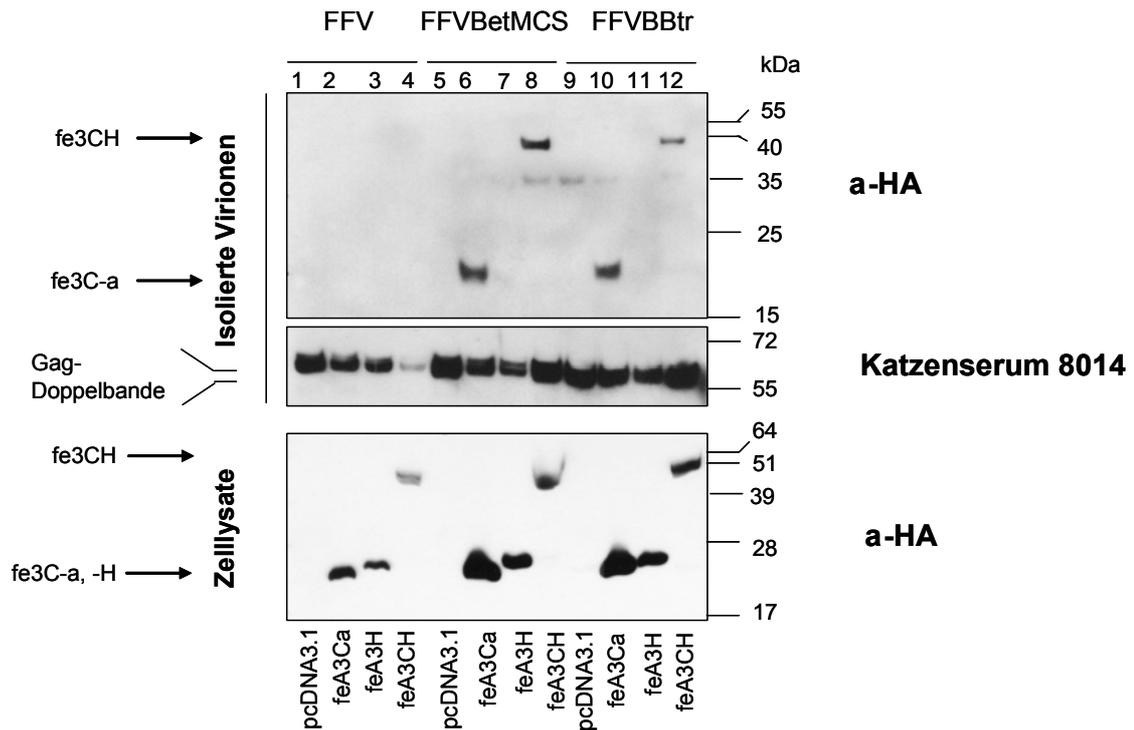


Abb. 4.18: feA3C-a-, -CH- aber nicht feA3H-Proteine werden in FFV-Virionen Bet-defizienter Genome inkorporiert. 293T-Zellen wurden in je vier Ansätzen mit 15 µg pCF7 oder pCF7BetMCS und pFFV-BBtr transfiziert. Zusätzlich wurden diese Ansätze mit 5 µg pfeA3C-a-, -H- oder -CH-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor cotransfiziert. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die transfizierten Zellen und der virushaltige Überstand geerntet und die Virionen entsprechend Abschnitt 3.5.6 aus dem Überstand isoliert. Gleiche Aliquots der Virionen und Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunoblot wurden die Gag-Proteine mit dem FFV-spezifischen Katzenserum 8014 und die HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper detektiert. Unter dem Blot sind die jeweils cotransfizierten feA3-Formen angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die detektierten feA3- und FFV-Gag-Proteine. Auf der gegenüberliegenden Seite sind jeweils die Banden des parallel aufgetrennten Markers sowie die zur Detektion der entsprechenden Proteine verwendeten Antikörper angezeigt.

Beim Vergleich der Zelllysate mit den aufgereinigten Virionen wurde deutlich, dass keines der drei feA3-Proteine in wt FFV-Virionen nachweisbar ist (Abb. 4.18). Dagegen zeigte sich, dass feA3C-a- und -CH-, nicht aber feA3H-Proteine in Virionen der FFV-Genome mit BBtr oder BetMCS detektierbar waren.

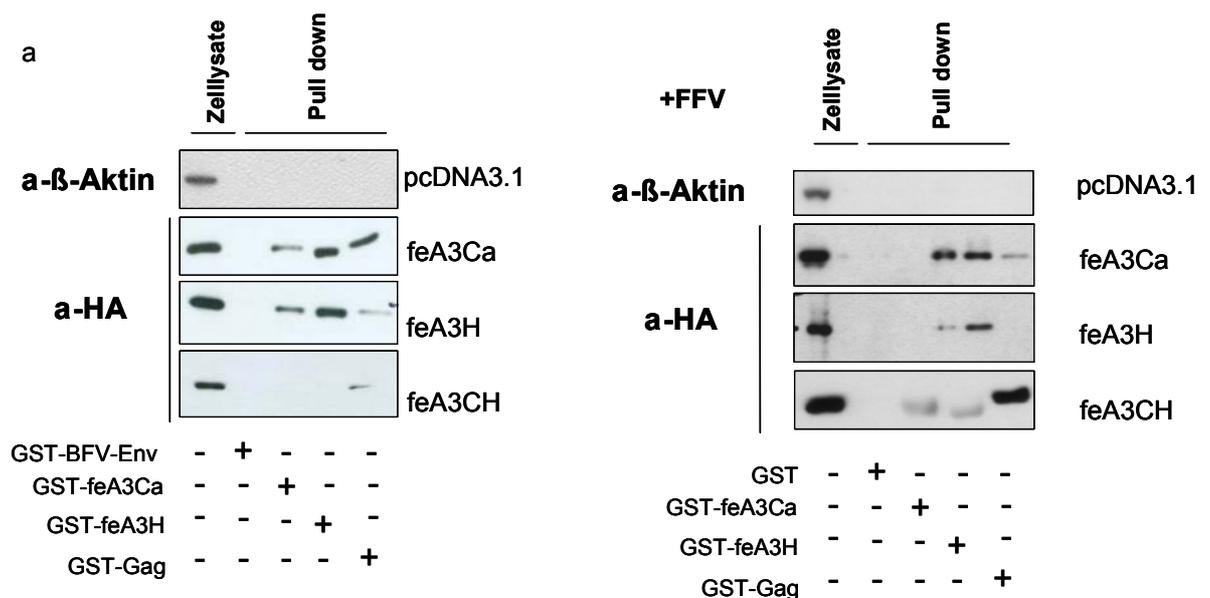
Diese Daten zeigen, dass wt FFV-Bet die Inkorporation von feA3C-a und -CH inhibiert, während nach einer Trunkation oder Mutation von Bet in der putativen Leucin-Zipper-Region eine Inkorporation der feA3C-a- und -CH-Proteine in Virionen erfolgt. FeA3H wird hingegen nicht in FFV-Virionen inkorporiert, was im Konsens mit der niederaffinen Interaktion von feA3H mit FFV-Gag steht (siehe Abschnitt 4.5.1).

4.6 Dimerisierung der feA3-Proteine in Anwesenheit von FFV

Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass für die antivirale Aktivität gegen HIV Δ Fiv humanes A3G in homo- oder heterodimerisierter Form vorliegen muss (Cho et al., 2003; Prochnow et al., 2007; Shindo et al., 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Anwesenheit von FFV-Bet im FFV-Kontext einen Einfluss auf die Dimerisierung der feA3-Proteine hat. Initial werden hierfür 293T-Zellen zweimal in vier Ansätzen (in 10 cm Zellkulturschalen) mit jeweils 15 μ g pCF7 bzw. einem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert. Zu diesen Ansätzen wurden jeweils folgende Expressionsvektoren cotransfiziert:

- (1) 5 μ g pfeA3C-a
- (2) 5 μ g pfeA3H
- (3) 5 μ g pfeA3CH
- (4) 5 μ g pcDNA3.1 Kontrollvektor

Die Proben wurden 2 Tage nach Cotransfektion lysiert und mit aufgereinigten GST-feA3C-a-, -H- und GST-FFV-Gag-Fusionsproteinen im Proteininteraktions-Assay entsprechend Abschnitt 3.4.8 gefällt. Als Negativkontrolle wurde GST-BFV-Env eingesetzt. Die präzipitierten Proben wurden zusammen mit den Zelllysaten elektrophoretisch aufgetrennt und die transfizierten HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper detektiert.



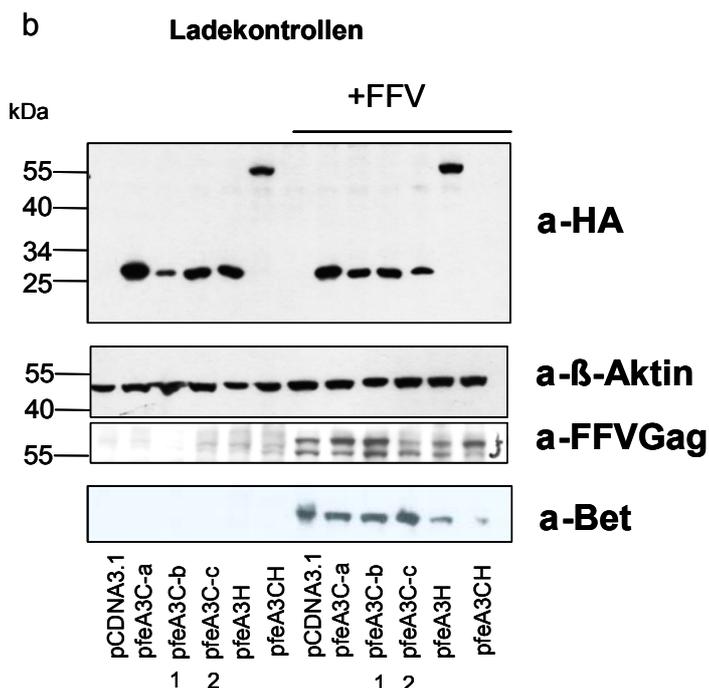


Abb. 4.19: Dimerisierung von feA3C-a und -H aber nicht von -CH. a 293T-Zellen wurden in je vier Ansätzen mit 15 µg pCF7 oder einem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert. Zusätzlich wurden diese Ansätze mit 5 µg pfeA3C-a, -H, -CH-Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor cotransfiziert. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate entsprechend Abschnitt 3.4.8 einem Pull-down-Assay mit aufgereinigten GST-feA3C-a-, -H- oder -Gag-Proteinen unterzogen. Als Negativkontrolle wurden die Zelllysate mit aufgereinigten GST-BFV-Env-Proteinen oder GST-Proteinen inkubiert. Die Proben und Zelllysate wurden auf einem Proteingel aufgetrennt und anschließend im Immunoblot analysiert, wobei die HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper nachgewiesen wurden. Rechts neben den Blots sind die jeweils transfizierten feA3-Proteine angegeben. Über den Blots ist jeweils angegeben, ob es sich um Zelllysate oder Proteininteraktions-Assays handelt. Unter den Blots sind die Spuren der GST-BFV-Env-Negativkontrolle, GST-feA3C-a, -H und -FFV-Gag als Positivkontrolle für die starke Interaktion mit feA3C-a und feA3CH angegeben. b Expressionskontrolle der für den Pull-down-Assay eingesetzten transfizierten Proteine. Links neben den Blots sind die Proteinmarker angegeben. Unter den Blots sind die transfizierten feA3-Proteine angegeben. Die mit feA3C-b- und -c transfizierten Proben (mit 1 und 2 markiert) wurden nicht für den Pull-down-Assay eingesetzt und werden im Folgenden nicht weiter besprochen. Über den Blots ist die Reihe der FFV-transfizierten Proben angegeben. Rechts neben den Blots sind die für den Nachweis der zellassoziierten Antigene eingesetzten Proteine dargestellt.

Die Analyse der Immunoblots in Abb. 4.19 bestätigte zunächst die Ergebnisse der GST-Gag-Interaktionen (Abschnitt 4.5) und zeigte, dass die Dimerisierungsstudien unter geeigneten Bedingungen erfolgten. Es wurde wiederholt gezeigt, dass feA3C-a und -CH nach dem Proteininteraktions-Assay mit GST-FFV-Gag detektiert wurden (Abb. 4.19 a), während die Detektion von feA3H nur sehr schwach war. Auch in Anwesenheit von wt FFV blieb diese Interaktion erhalten (Abb. 4.19 b). Dagegen wurde unabhängig von der Expression des FFV-Genoms nur feA3C-a und -H durch GST-feA3C-a und GST-feA3H copräzipitiert und somit im

WB nachgewiesen, während feA3CH keine Interaktion mit feA3Ca oder -H einging (Abb. 4.19 a + b).

Dieses Experiment zeigt somit, dass feA3C-a und -H sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können und dass diese Dimerisierung nicht durch Bet oder eine andere FFV-Komponente inhibiert wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass feA3CH keine Heterodimere mit feA3C-a und -H bildet, was ebenfalls unabhängig von der FFV-Anwesenheit ist. Die Ergebnisse zeigen, dass eine intermolekulare Dimerisierung nur innerhalb von ein-Domänen feA3-Proteinen stattfindet, deren Dimerisierungsseite noch nicht durch eine weitere Domäne intrinsisch abgedeckt wurde, wie es für das zwei-Domänen feA3CH zutrifft.

4.6.1 Keines der feA3C-Proteine zeigt trans-dominant-negative antivirale Effekte in Coexpressionsstudien

Wie im vorangegangenen Versuch gezeigt wurde, können die ein-Domänen feA3C-a, und -H heterodimerisieren. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte im Folgenden untersucht werden, ob in Coexpressionsstudien zweier unterschiedlicher feA3-Proteine trans-dominant negative Effekte auf die antivirale Aktivität bezüglich des Titers von FFVBBtr nachweisbar sind. Für diese Cotransfektionsuntersuchungen des Effektes zweier verschiedener feA3-Proteine auf den FFVBBtr-Titer wurden 293T-Zellen in 15 Ansätzen (in 6 cm Zellkulturschalen) mit je 1 µg der verschiedenen *pfeA3*-Expressionsplasmide entsprechend Tabelle 4.2 cotransfiziert. Die Versuche in denen jeweils nur eine feA3-Form exprimiert ist (Kontrolle der verschiedenen feA3-Isoformen), sind in der Tabelle schattiert unterlegt.

Tabelle 4.2 Transfektionsschema der verschiedenen feA3-Formen.

FFVBBtr	fe3C-a	fe3C-b	fe3C-c	fe3H	fe3CH
fe3C-a	+	+	+	+	+
fe3C-b		+	+	+	+
fe3C-c			+	+	+
fe3H				+	+
feA3CH					+

Zu diesen Ansätzen wurde 6 µg *pCF7BBtr* und 1 µg *pGFP* cotransfiziert. Zusätzlich wurde zu einem weiteren 293T-Zellansatz 6 µg *pCF7BBtr* und 1 µg *pcDNA3.1* als Negativkontrolle cotransfiziert.

2 Tage p.t. wurden die Zellen lysiert, gleiche Aliquots elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die HA-markierten feA3-Proteine wurden mithilfe eines monoklonalen

HA-Antikörpers detektiert. Zusätzlich wurde noch cotransfiziertes GFP als Transfektionskontrolle mit einem monoklonalen GFP-Antikörper detektiert. Die Überstände wurden abgenommen und die FFVBBtr Titer gemessen.

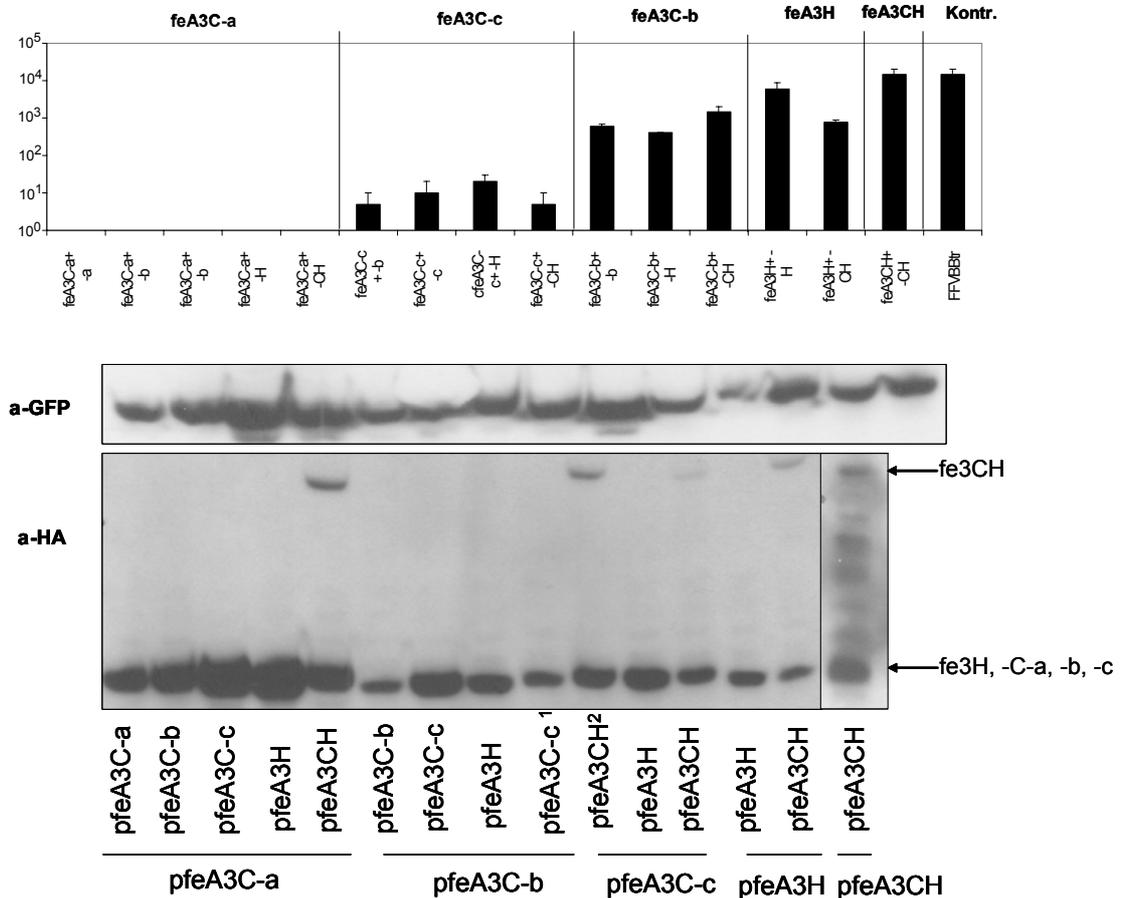


Abb. 4.20 Kein trans-dominant-negativer Effekt auf die antivirale Aktivität nach Cotransfektion der einzelnen feA3-Proteine. Gezeigt sind die inhibitorischen Aktivitäten der cotransfizierten feA3C-a-, -b-, -c-, -H- und -CH-Proteine gegen FFVBBtr. 293T-Zellen wurden mit 6 µg pCF7BBtr und jeweils 1 µg der beiden pfeA3-Expressionsplasmide cotransfiziert, die entsprechend unter dem Diagramm angegeben sind. Die Titer wurden 2 Tage nach Infektion ermittelt. 293T-Zellen wurden lysiert und die exprimierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen Antikörper gegen den HA-Epitop in einem Immunoblot nachgewiesen. In den mit 1 und 2 markierten Spuren sind die Proben bei der Auftragung vertauscht worden.

Abb. 4.20 zeigt die Titer von FFVBBtr in Anwesenheit der verschiedenen cotransfizierten feA3-Proteine. FeA3C-a zeigte in diesem Experiment eine maximale antivirale Aktivität in Anwesenheit sämtlicher weiterer feA3-Proteine, so dass kein FFVBBtr-Titer mehr detektierbar war. Bei den weiteren Cotransfektionen mit feA3C-c supprimierte dieser den Titer um drei Zehnerpotenzen unabhängig von weiteren feA3-Proteinen ohne trans-dominant-negative Effekte. Bei den restlichen feA3C-b-Cotransfektion war eine Suppression des FFVBBtr-Titers

um mehr als eine Zehnerpotenz zu beobachten. FeA3H und -CH induzierten eine geringe Suppression des Titers um den Faktor 10.

Die Daten belegen, dass die Coexpression der verschiedenen schwach antiviralen feA3-Proteine keinen trans-dominant-negativen Effekt auf die stärker inhibitorischen feA3C-Formen bezüglich der antiviralen Aktivität gegen FFVBBtr aufweisen. Ebenso wenig wird die intermediäre Aktivität von feA3C-c durch Coexpression von weniger aktivem feA3H und -CH inhibiert.

4.7 Klonierung und Charakterisierung katalytischer und struktureller feA3C-a-Mutanten

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente zeigten, dass feA3C-a die stärkste antivirale Aktivität gegen Bet-trunkiertes FFV aufweist. In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse zu untersuchen, in welcher Weise die antivirale Aktivität von feA3C-a mit der Deaminase-Aktivität korreliert. Aus diesem Grund wurden in feA3C-a Aminosäureaustausche des katalytisch essentiellen Glutamat 70 (E) nach Glutamin (Q) oder des strukturell wichtigen Cysteins 72 (C) nach Serin (S) oder ein Austausch beider Aminosäuren durchgeführt.

4.7.1 Mutation der katalytischen und strukturellen Aminosäuren E70Q, C72S und E70Q/C72S in feA3C-a

Um die besprochenen Aminosäuren (AS) E70 nach Q, C72 nach S oder beide im feA3C-a-Gen auszutauschen und gleichzeitig einzig vorkommende Restriktionsseiten innerhalb des Gens einzufügen, wurde feA3C-a mittels einer PCR mit den in Abschnitt 2.14 aufgeführten Primern amplifiziert. Diese binden innerhalb von feA3C-a an den Nukleotidpositionen 1120 und 1625 und enthalten randomisierte C- nach G-Austausche an Position 26 oder T- nach A-Austausche an Position 32 oder Austausch an beiden Positionen. Abb. 4.21 zeigt die schematische Darstellung des feA3C-a-Gens und die Lokalisation der Mutationen innerhalb des aktiven Zentrums.

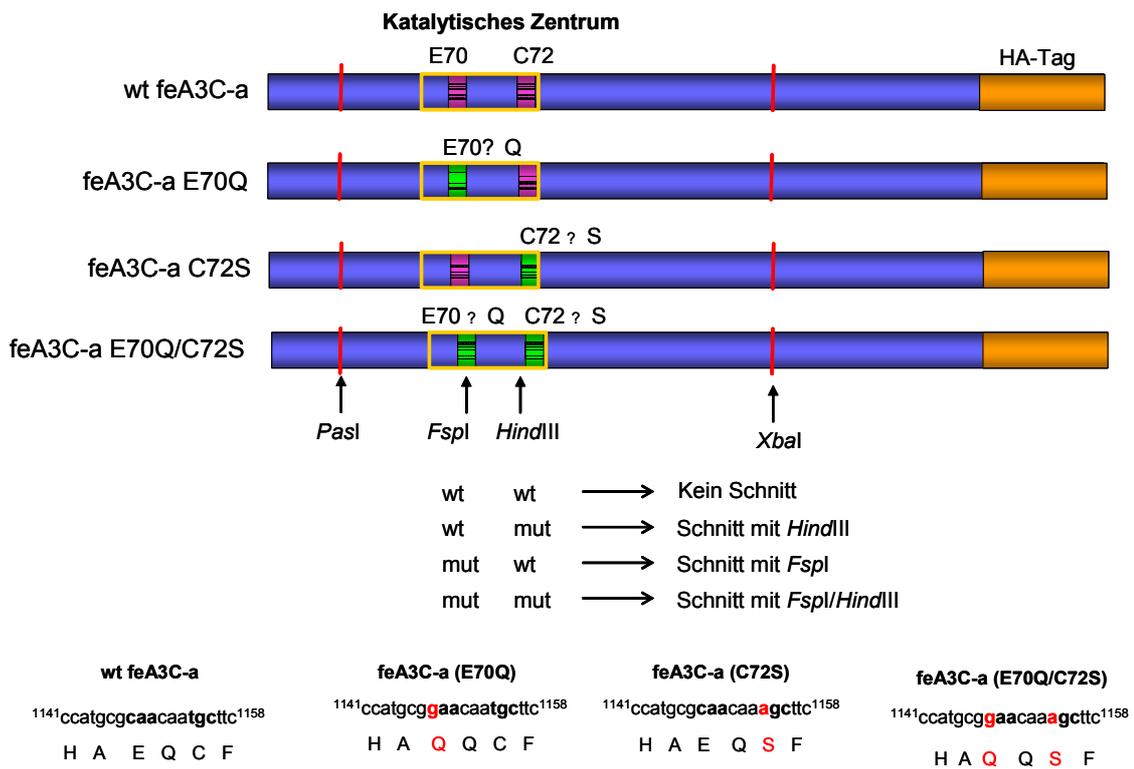


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der Mutationen im *feA3C-a*-Gen. Die Abb. stellt die Aminosäuresequenzen der verschiedenen mutierten *feA3C-a* Proteine im Vergleich zum wt dar. Abgebildet sind jeweils die katalytischen Zentren und die darin vorgenommenen Mutationen der katalytisch essentiellen Aminosäuren. Des Weiteren sind die analytischen Restriktionsseiten dargestellt, mit denen die jeweiligen Mutationen in den Sequenzen identifiziert werden können. Am rechten Ende ist des HA-Epitop abgebildet. Die gelben Balken markieren die Positionen der am katalytischen Zentrum beteiligten Aminosäuren. Wt = Wildtyp; mut = Mutant

Der C- nach G-Austausch an Position 26 erzeugt eine *FspI*-Schnittstelle, während ein T- nach A-Austausch an Position 32 eine *HindIII*-Schnittstelle erzeugt, so dass die erhaltenen Klone mithilfe eines analytischen Verdau von einander unterschieden werden können (Abb. 4.21). Anschließend wurden die Klone mittels Sequenzierung auf die eingefügten Mutationen und auf ungewollt aufgetretene Mutationen hin überprüft.

Diese als *pfeA3C-a(E70Q)*, *pfeA3C-a(C72S)* und *pfeA3C-a(E70Q/C72S)* bezeichneten Klone wiesen keine weiteren Veränderungen auf und wurden für weitere Analysen verwendet.

4.7.2 Vergleich der katalytischen *feA3C-a* Mutanten auf die antivirale Aktivität gegen FFV und FFVBBtr

Für die Analyse der antiviralen Aktivität der katalytischen und strukturellen *feA3C-a*-Mutanten im Vergleich zu wt *feA3C-a* wurden 293T-Zellen in zehn Ansätzen (in 6 cm Zellkulturschalen) nach folgendem Schema cotransfiziert: Je 5 Ansätze 293T-Zellen wurden mit 6 µg pCF7 bzw.

pCF7BBtr transfiziert. Zudem wurden diese Zellen jeweils mit den Expressionsplasmiden der feA3C-a Mutanten und wt feA3 sowie einem Kontrollvektor cotransfiziert. Die virushaltigen Transfektionsüberstände wurden 2 Tage nach Cotransfektion geerntet und die FFV Titer ermittelt. Gleiche Aliquots der entsprechenden Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die transfizierten Proteine mittels Immunoblot analysiert.

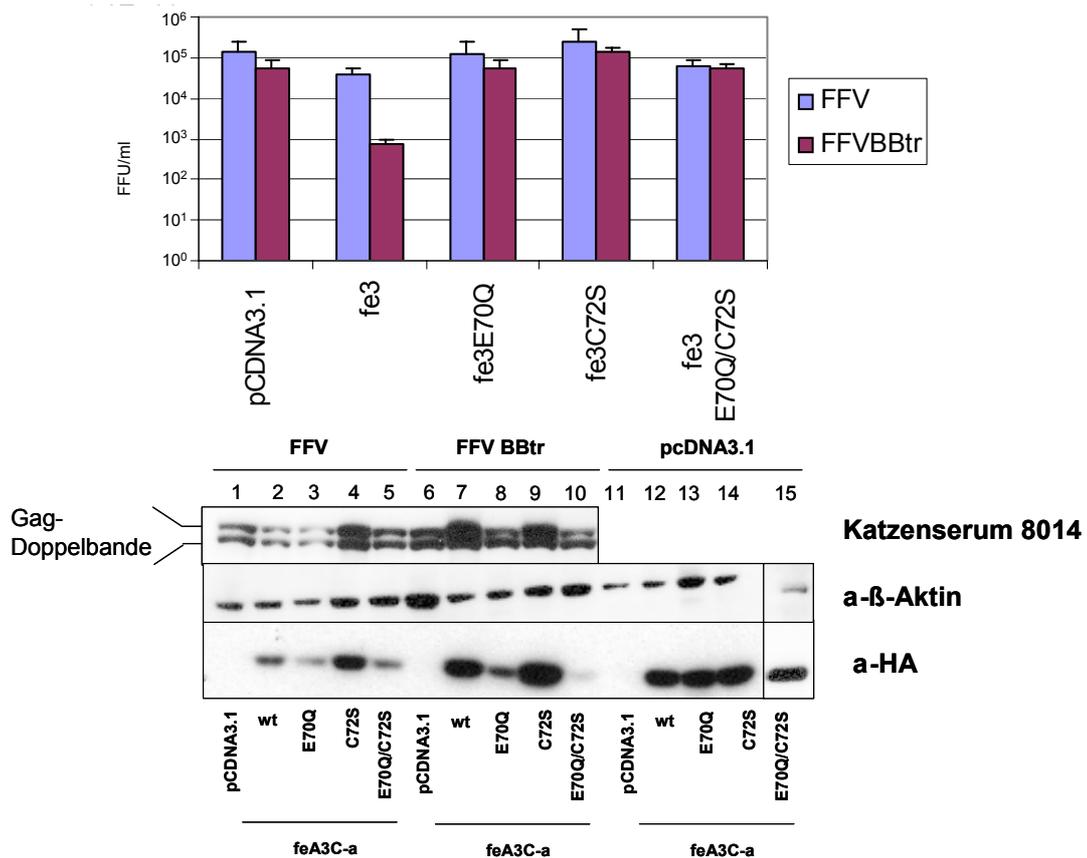


Abb. 4.22: Nicht-konservative Mutationen im katalytischen Zentrum von feA3C-a sind inaktiv gegen FFV und dem Bet-defizientem FFV. Gezeigt sind die intrinsischen Aktivitäten von cotransfiziertem wt feA3C-a, feA3C-a(E70Q), -(C72S) und -(E70Q/C72S) gegen FFVBBtr im Vergleich zu wt FFV. 293T-Zellen wurden mit 6 µg pCF7BBtr bzw. pCF7 und je 2 µg pfeA3 Expressionsplasmid transfiziert. Die Vektortiter wurden 2 Tage nach Infektion ermittelt. 293T-Zellen wurden lysiert und die exprimierten HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper in einem Immunoblot nachgewiesen. Virusspezifisches Antigen wurde mit Katzenserum 8014 nachgewiesen und β-Aktin mit einem anti-β-Aktin-Antikörper.

Wie in Abb. 4.22 zu sehen ist, zeigten weder wt feA3C-a, noch die feA3C-a-Mutanten eine starke antivirale Aktivität gegen wt FFV. Dagegen war wie erwartet eine Inhibition des FFVBBtr-Titers nur in Anwesenheit von wt feA3C-a zu beobachten, welcher den Titer um mehr als zwei Zehnerpotenzen supprimiert. Sowohl die katalytischen, als auch die strukturellen feA3C-a-Mutanten zeigten keine signifikante Aktivität gegen wt oder Bet-defizientes FFV. Des Weiteren

ist zu beobachten, dass die Expression der feA3C-a(E70Q) Strukturmutante und der feA3C-a(E70Q/C72S) Doppelmutante sowohl in Anwesenheit von wt FFV als auch von FFVBBtr signifikant geringer war als in deren Abwesenheit (vergleiche Spur 3, 5, 8, 10 mit Spur 13 und 15).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der Austausch des katalytisch wichtigen E, als auch des strukturell wichtigen C einen Verlust der antiviralen Aktivität zur Folge hat. Zusätzlich wird die Stabilität der E- nach Q-mutierten feA3C-a-Proteine durch die Anwesenheit von FFV- bzw. FFVBBtr -codierten oder induzierten Proteinen deutlich verringert.

4.7.3 Analyse der FFV-Partikel-Inkorporation und der Gag-Interaktion feA3C-a-Mutanten

Die Untersuchung der strukturellen und katalytischen feA3C-a-Mutanten auf Inkorporation in FFV-Partikel Bet-defizienter Genome war ein weiterer wichtiger Aspekt, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Dazu wurden 293T-Zellen in fünf Ansätzen (in 10 cm Zellkulturschalen) mit 15 µg pCF7BetMCS transfiziert. Zudem wurden diese Zellen noch mit den Expressionsplasmiden:

- (1) 2 µg wt feA3C-a
- (2) 2 µg pfeA3C-a(E70Q)
- (3) 2 µg pfeA3C-a(C72S)
- (4) 2 µg pfeA3C-a(E70Q/C72S)
- (5) 2 µg pcDNA3.1

cotransfiziert. Die transfizierten Zellen sowie die virushaltigen Überstände wurden 2 Tage nach Cotransfektion geerntet. Nach Isolierung der Viruspartikel entsprechend Abschnitt 3.5.6 wurden diese wie auch die Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die FFV-spezifischen Gag-Proteine in der Viruspartikelfraktion mit dem Katzenserum 8014 detektiert. Die HA-markierten feA3-Proteine wurden mithilfe eines monoklonalen HA-Antikörpers in der Zelllysate- und der Viruspartikelfraktion detektiert.

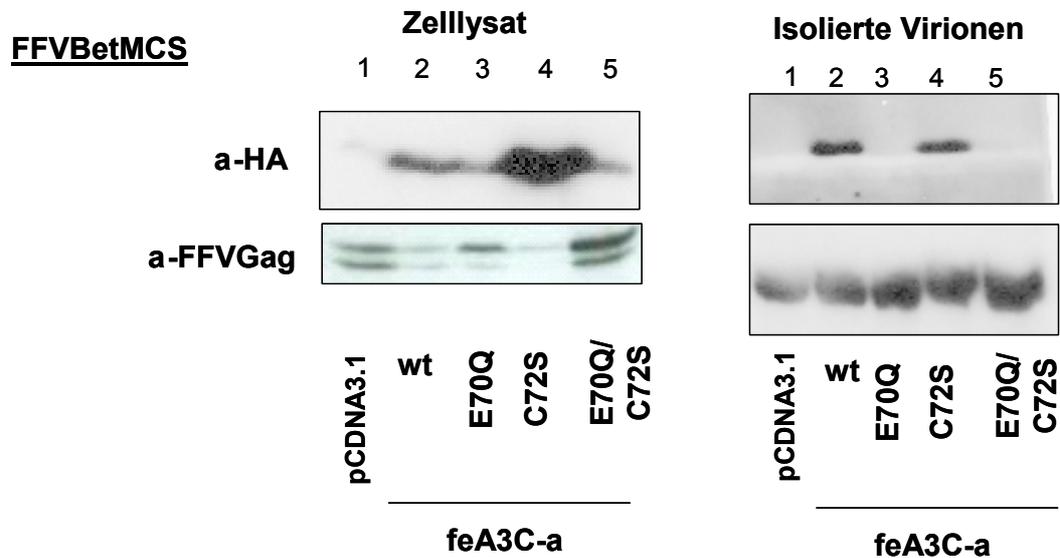
WB: a-HA

Abb. 4.23: Die Mutation des katalytischen Zentrums E70Q verhindert die Inkorporation von feA3 in Virionen Bet-defizienter FFV-Genome. 293T-Zellen wurden mit 5 µg wt *pA3C-a*, -(E70Q)-, -(C72S)- oder -(E70Q/S72S)-Expressionsplasmiden bzw. pcDNA3.1 Kontrollplasmid und je 15 µg *pCF7BetMCS* cotransfiziert. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Zellen und der virushaltige Überstand geerntet und die Virionen entsprechend Abschnitt 3.5.6 aus dem Überstand isoliert. Gleiche Aliquots Virionen und Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Immunoblot wurden die viralen Proteine mit dem FFV-spezifischen Katzenserum 8014 und die HA-markierten feA3-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper detektiert. Unter dem Blot sind die jeweils exprimierten feA3-C-a-Formen angegeben. Links neben dem Immunoblot sind die zur Detektion der entsprechenden Proteine genutzten Antikörper angegeben.

Abb. 4.23 zeigt, dass sowohl wt feA3C-a, als auch die feA3C-a Mutanten nach Transfektion in den Zelllysaten zu detektieren waren. Dabei bestätigte sich die Beobachtung, dass feA3C-a (E70Q) und -(E70Q/C72S) (Spuren 3 und 5) schwächer vorhanden waren als wt feA3C-a und feA3C-a(C72S) (Spuren 2 und 4). Gleichzeitig waren in den Proben der aufgereinigten Virionen Bet-mutierter FFV-Genome nur wt feA3C-a und feA3(C72S) detektierbar.

Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde im Folgenden untersucht, ob die katalytischen und strukturellen feA3C-a Mutanten mit Gag interagieren, was als Voraussetzung für die Virusinkorporation gelten kann. Dabei war es von Interesse zu analysieren, welchen Einfluss die Mutationen im katalytischen und strukturellen Zentrum von feA3C-a auf die Interaktion mit FFV-Gag und die daraus resultierende Inkorporation in Bet-defiziente FFV-Partikel hatten.

Zu diesem Zweck wurden 293T-Zellen in fünf Ansätzen (in 10 cm Zellkulturschalen) mit 10 µg der Expressionsplasmide wt *pfeA3C-a*, den drei *pfeA3C-a*-Mutanten oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert und 2 Tage nach Transfektion lysiert. Die Zelllysate wurden mit aufgereinigten GST-Gag- oder mit GST-Proteinen als Negativkontrolle entsprechend Abschnitt 3.4.8 inkubiert. Nach dem Proteininteraktions-Assay wurden die Proben elektrophoretisch

aufgetrennt und die HA-markierten feA3-Proteine im Immunoblot mittels eines monoklonalen HA-Antikörpers detektiert.

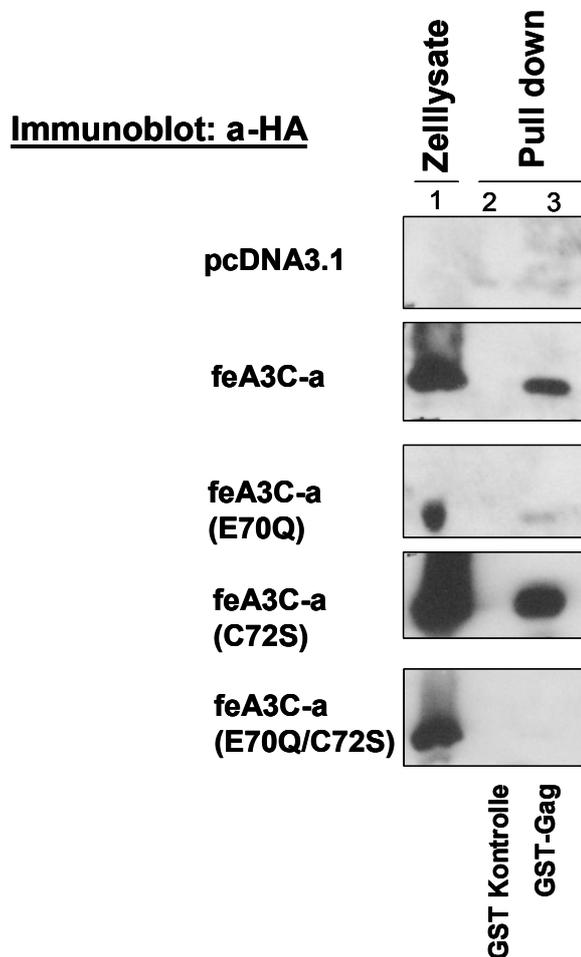


Abb. 4.24: Die Mutation der katalytischen feA3C-a(E70Q) inhibiert die Gag-Interaktion. 293T-Zellen wurden in fünf Ansätzen mit 10 µg wt *pfeA3C-a*, *-(E70Q)*, *-(C72S)*, *-(E70Q/C72S)* Expressionsplasmiden oder dem pcDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate entsprechend Abschnitt 3.4.8 einem Proteininteraktions-Assay mit GST-Gag unterzogen. Als Negativkontrolle wurden die Zelllysate mit GST inkubiert. Die Proben und Zelllysate wurden auf einem Proteingel aufgetrennt und anschließend im Immunoblot analysiert, wobei die HA-markierten feA3C-a-Proteine mit einem monoklonalen HA-Antikörper nachgewiesen wurden. Neben den Blots sind die jeweils exprimierten feA3-Proteine angegeben. Über den Blots ist jeweils angegeben, ob es sich um Zelllysate oder Proteininteraktions-Assays („Pull-downs“) handelt. Unter den Blots sind die GST-Negativkontrolle und die GST-Gag-Probe angezeigt.

Abb. 4.24 zeigt, dass wt feA3C-a und feA3C-a (C72S) nach dem Proteininteraktions-Assay im klar präzipitiert wurden, während dies im gleichen Fall nicht für feA3C-a (E70Q) und *-(E70Q/C72S)* zutraf. Dies zeigt, dass eine Mutation des katalytisch wichtigen E70, nicht aber des strukturell wichtigen C72 die Interaktion mit Gag verhindert. Die hier erhaltenen Ergebnisse

korrelieren mit den Ergebnissen der Inkorporationsstudien von feA3 in FFV-Partikel Bet-defizienter Genome und bestätigen, dass eine einzelne Mutation des katalytisch wichtigen E70 in der Inhibition der Gag-Interaktion und dem damit verbundenen Ausschluss aus FFV-Partikeln Bet-defizienter Genome resultiert.

4.8 Konstruktion eines FFV-Vif-Vektors

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente von Abschnitt 4.3.1-4.3.3 zeigten, dass FIV-Vif den protektiven Effekt von FFV-Bet in *bet*-defizienten FFV kompensiert. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein Austausch des *bet* 2-Gens durch das FIV-Vif-Gen innerhalb des Virusgenoms den viralen Titer gleichermaßen vor endogenem feA3 in CrFK-Zellen schützt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu ein chimäres pCF7-Vif-Konstrukt entwickelt, das durch partielle Deletion der *bet* 2-Region und anschließende Insertion des FIV-Vif-Gens hergestellt wurde. Abb. 4.25 zeigt die schematische Darstellung der Konstruktion des pCF7-Vif-Konstrukts sowie dessen endgültigen Aufbau.

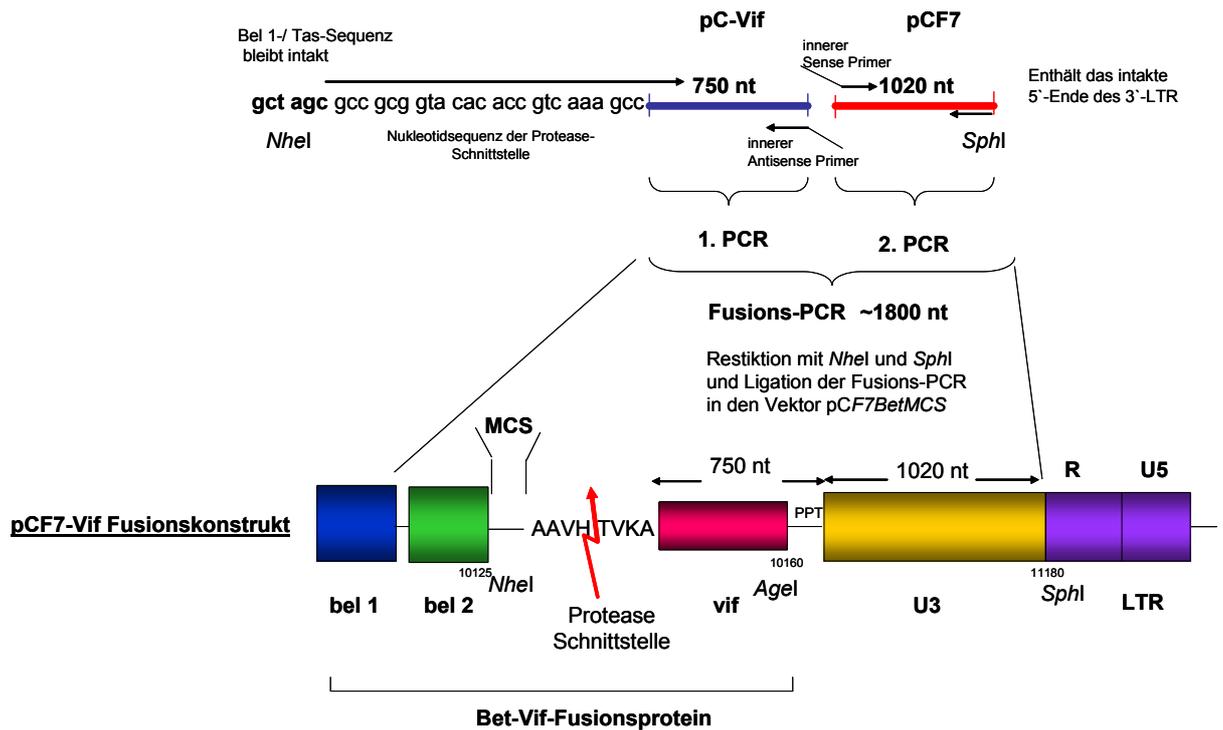


Abb. 4.25: Schematische Darstellung des pCF7-Vif-Konstrukts. Dargestellt sind die beiden PCR-Reaktionen zur Generierung der FIV-Vif-Sequenz mit N-terminaler Protease-Schnittstelle und der partiellen FFV-LTR-Region. In der Fusions-PCR wurden beide Sequenzen miteinander verknüpft. Das Fusions-Konstrukt wurde zusammen mit pCF7BetMCS mit *NheI* und *SphI* präparativ geschnitten und mit dem pCF7BetMCS-Vektor ligiert. Das chimäre pCF7-Vif-Konstrukt enthält hinter der MCS-Seite von *bel 2* eine Protease-Schnittstelle, und das FIV-Vif-Gen. Die *AgeI*-Schnittstelle wurde für Kontrollverdaue eingefügt. Nt: Nukleotide

Vif wurde vor die 3'-LTR unter Erhalt des intakten LTR-Endes und des Polypurintrakts anstelle des trunkierten C-Teils im *bet*-Gen des FFV-Genoms eingefügt. Das FIV-Vif-Gen wurde hierbei mit einer Erkennungssequenz für die FFV-Protease N-terminal fusioniert. Gleichzeitig wurde in der zweiten PCR die Amplifikation der partiellen U3-Region des pCF7-Vektors N-terminal eine *AgeI* Schnittstelle für Kontrollverdaue und C-terminal eine *SphI*-Schnittstelle angefügt. Das FIV-Vif-PCR-Produkt wurde in einer Fusions-PCR N-terminal mit dem PCR-Produkt der U3-Region fusioniert. Das Fusionsprodukt und der Vektor pCF7BetMCS (in Abschnitt 2.4.1 beschrieben) wurden mit *NheI* und *SphI* präparativ geschnitten. Plasmid und Insert wurden gereinigt und beide Komponenten miteinander ligiert. Das chimäre pCF7-Vif-Konstrukt kodiert somit für ein Fusionsprotein, das auf der N-terminalen Sequenzen von Bet der PR-Schnittstelle und des gesamten FIV-Vif-Proteins besteht und im Folgenden als Bet^{tr}-Vif-Protein bezeichnet wird.

4.8.1 Kinetik der Genexpression des FFV-Vif-Vektors in transfizierten 293T- und infizierten CrFK-Zellen

Für das chimäre pCF7-Vif-Konstrukt wurden mehrere Klone isoliert und mittels analytischem Restriktionsverdau (Daten nicht gezeigt) analysiert. Exemplarisch wurden je 10 µg der pCF7-Vif-Klone Nr. 4 und Nr. 39 sowie das wt Genom pCF7 und der pcDNA3.1 Kontrollvektor in 293T-Zellen transfiziert. Dabei war eine einheitliche Syncycienbildung in allen drei Ansätzen virustransfizierter 293T-Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Abb. 4.27 zeigt die Detektion der entsprechenden virusassoziierten Antigene FFV-Gag und FIV-Vif im Immunoblot. Auch der virale Titer der pCF7-Vif-Klone Nr. 4 und Nr. 39 wurde auf CrFK-Zellen untersucht und mit dem Titer von wt pCF7 verglichen, um die genetische Stabilität und den Titer der chimären Viren in feA3-positiven CrFK-Zellen zu untersuchen. Daher wurden jeweils 1 ml der ZKÜs der transfizierten 293T-Zellen 2 Tage nach Transfektion auf CrFK-Zellen übertragen. Der virushaltige Überstand wurde nach 6 h gegen DMEM-Medium ausgetauscht und die CrFK-Zellen 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Überstände seriell auf CrFK-Zellen titriert, die wiederum für 2 Tage inkubiert wurden. Die Virustiter der ZKÜs der einzelnen Passagen wurden mittels FeFab-basierten Titrationsassay ermittelt. Der Versuchsablauf zur Analyse der viralen Proteinexpression und der Infektiösität von pCF7-Vif-Konstrukten ist in Abb. 4.26 schematisch dargestellt.

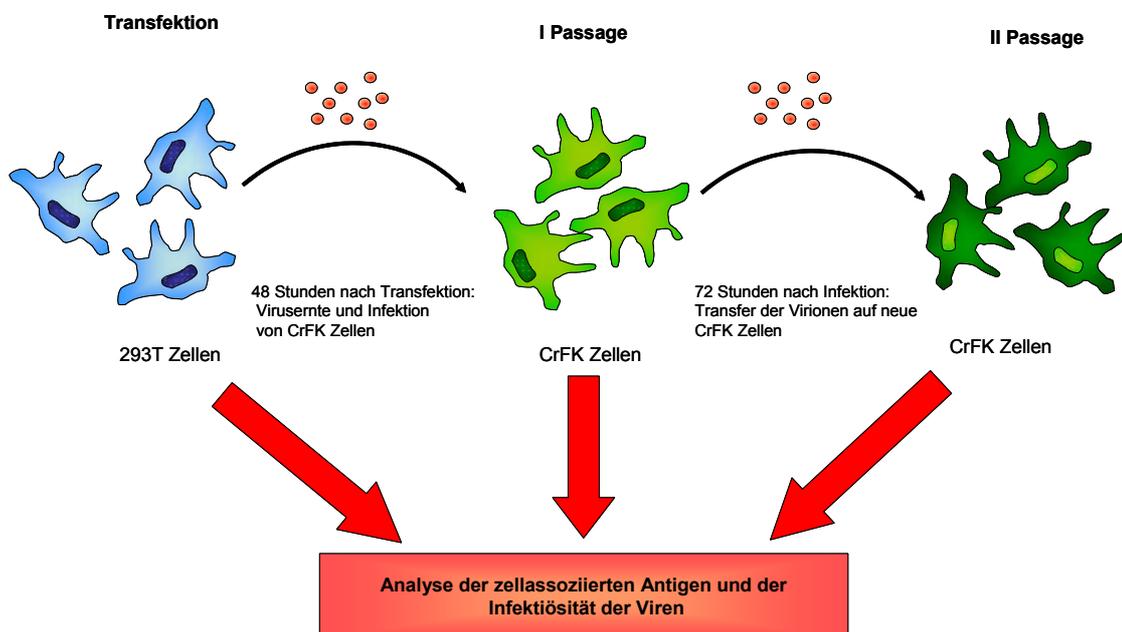


Abb. 4.26: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Untersuchung der Infektiösität der pCF7-Vif-Konstrukte. Detaillierte Erläuterungen sind im Text von Abschnitt 4.8 zu finden.

Das zellassoziierte Antigen der 293T-Zellen und der Passagen in CrFK-Zellen wurde in 1 % SDS-Puffer geerntet und nach Homogenisierung mit Proteinprobenpuffer versetzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung gleicher Aliquots der Proben erfolgte die Detektion der Proteine mittels Immunoblot (Abb. 4.27).

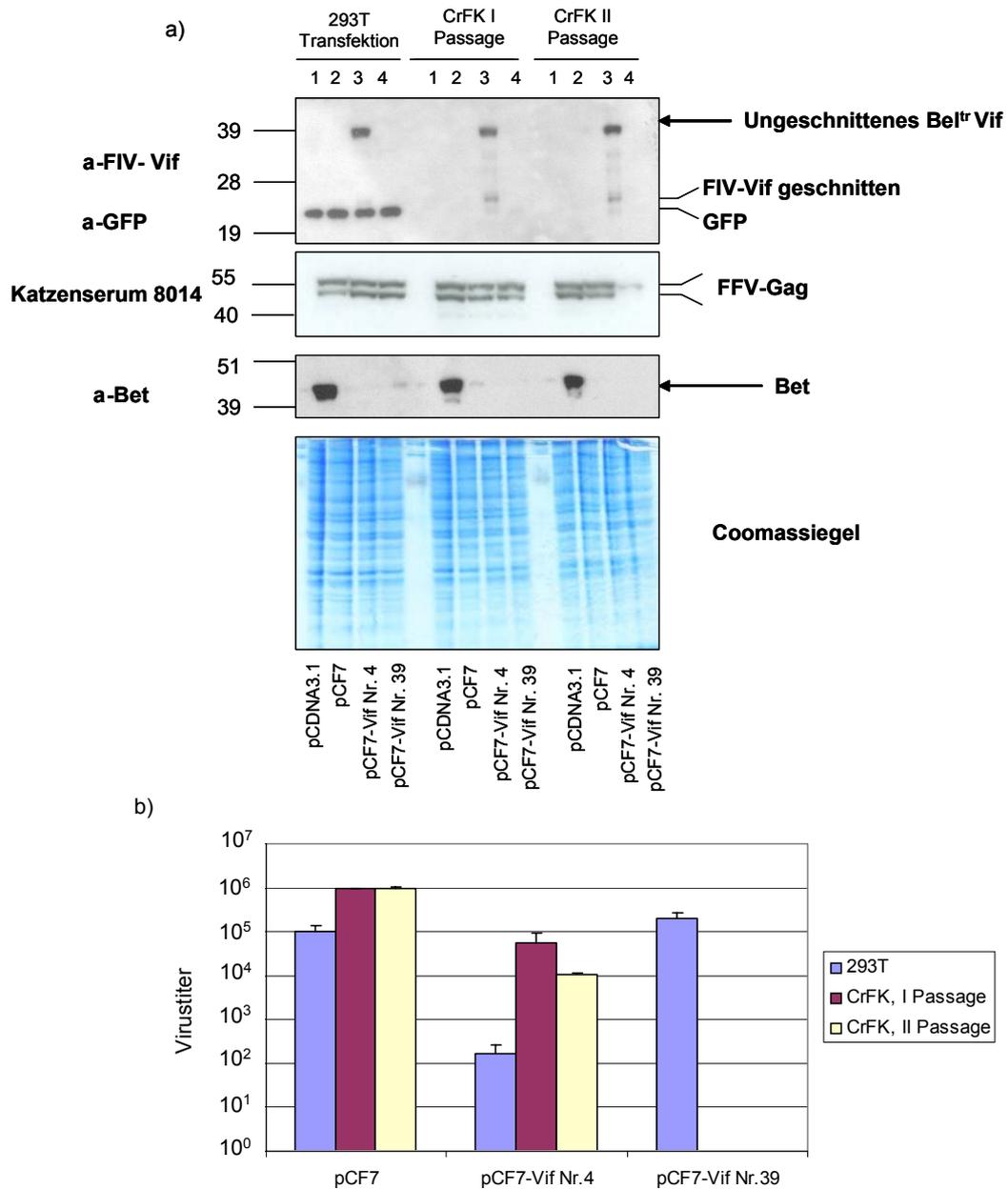


Abb. 4.27: pCF7-Vif-Klon Nr. 4 exprimiert Bet^{tr}-Vif und FIV-Vif und erlaubt die Replikation Bet-defizienter FFV in CrFK-Zellen. a) 293T-Zellen wurden mit 10 µg pCF7, pCF7-Vif Nr.4 und Nr. 39- und pCDNA3.1 Kontrollvektor transfiziert sowie mit 1 µg des pGFP-Expressionsvektors als Transfektionskontrolle. 2 Tage p.t. wurden die ZKÜs geerntet, geklärt und 1 ml ZKÜ zur Infektion subkonfluenter CrFK-Zellen verwendet. Nach zwei Passagen wurden sämtliche CrFK-Zellen sowie 293T-Zellen lysiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetragenen Proteine wurden im Coomassiegele überprüft. Die zellassoziierten Antigene wurden im Immunoblot analysiert. FIV-Vif wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen FIV-Vif und FFV-Bet mit einem polyklonalen Antiserum gegen Bet detektiert. FFV-spezifische Gag-Proteine wurden mit dem FFV-Katzenserum 8014 detektiert. GFP wurde mit einem monoklonalen GFP-Antikörper detektiert. Über den Immunoblots sind die jeweiligen Zellen angegeben. Unter dem Immunoblot sind die jeweils exprimierten Proteine abgebildet. Die Pfeile auf der rechten Seite kennzeichnen die detektierten Proteine. Auf der linken Seite sind jeweils die Banden des parallel aufgetrennten Markers sowie die Antikörper zur Detektion der entsprechenden Proteine angezeigt. b) Graphische Darstellung der Virustiter der 293T-Zell-Transfektionen und zwei

Passagen in CrFK-Zellen. Bei jeder Passage wurden die ZKÜs geerntet und die Virustiter mittels FeFab-basierten Titrationsassay ermittelt.

Wie Abb. 4.27 a zeigt, ist die Expression der FFV-Gag-Proteine von pCF7, wie auch von pCF7-Vif Nr. 4 und Nr. 39 sowohl in 293T-Zellen als auch in der ersten Passage der CrFK-Zellen gleich stark. Dagegen ist die Expression der FFV-Gag-Proteine von pCF7-Vif Nr. 39 in der zweiten CrFK-Passage deutlich reduziert. Zusätzlich zeigt Gag in dieser Passage auch keine Prozessierung. Die Ergebnisse des FeFAB-basierten Titrationsassays (Abb. 4.27 b) zeigen, dass pCF7-Vif Nr. 4 über zwei Viruspassagen einen im Vergleich zu wt FFV niedrigen aber stabilen Titer aufweist. Dieser liegt für die ZKÜs der 293T-Zellen bei 10^2 FFU/ml (engl.: focus forming units), für die ZKÜs der Passagen auf den CrFK-Zellen bei 10^5 bzw. 10^4 FFU/ml. Im Vergleich hierzu zeigt der pCF7-Vif-Klon Nr. 39 nach Transfektion auf 293T-Zellen einen Titer von 10^5 FFU/ml jedoch nach der ersten Passage auf CrFK-Zellen einen kompletten Verlust der Infektiosität.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Titer von FFV-Vif Nr. 4 niedriger als von wt FFV, jedoch über zwei Passagen auf CrFK-Zellen stabil ist. Dagegen bricht der Titer von FFV-Vif Nr. 39 nach der ersten Passage ein. Des Weiteren exprimiert FFV-Vif Nr. 4 das unprozessierte Bet^{tr}-Vif-Protein sowie FFV-Gag stabil über alle drei Passagen, was für FFV-Vif Nr. 39 nicht zu beobachten ist.

Nachfolgende Sequenzierungen beider Klone bestätigten die korrekte Sequenz des pCF7-Vif-Konstrukts Nr. 4. Das pCF7-Vif-Konstrukt Nr. 39 hingegen wies eine Rasterpunktmutation in der zwischen dem Bet-Anteil und der Vif-Sequenz gelegenen Proteaseschnittstelle auf. Deshalb wurde kein Vif exprimiert und dieser Klon wurde somit nicht gegen feA3C geschützt.

Das pCF7-Vif-Konstrukt Nr. 4 wurde im Anschluss auf seine Resistenz gegen die antivirale Aktivität der feA3C-a-, -H-, und -CH-Proteine getestet. Dazu wurden jeweils fünf Ansätze von 293T-Zellen mit 15 µg pCF7-Vif bzw. 15 µg pCF7BetMCS transfiziert (in 10 cm Zellkulturschalen). Zudem wurden diese Zellen jeweils mit:

- (1) 5 µg pcDNA3.1 Kontrollvektor
- (2) 5 µg pfeA3C-a
- (3) 5 µg pfeA3H
- (4) 5 µg pfeA3CH
- (5) 5 µg pcaA3H

cotransfiziert. 2 Tage nach Cotransfektion wurden die Zellen lysiert, gleiche Aliquots elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die transfizierten Proteine wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Titer von FFVBetMCS und FFV-Vif mit einem FeFAB-basierten Titrationsassay gemessen.

dazu supprimierte feA3C-a den Titer von FFVBetMCS um 3 Zehnerpotenzen, während feA3H, -CH und caA3H den Titer leicht supprimieren. CaA3H zeigt eine nur schwache antivirale Aktivität. In den dazugehörigen Immunoblots (Abb. 4.28 b) ist das unvollständig geschnittene Bet^{tr}-Vif deutlich mit dem anti FIV-Vif-Antikörper detektierbar (Spuren 1-5). Dagegen ist nur eine geringe Expression der vollständig geschnittenen FIV-Vif-Proteine nachweisbar. Die fe- und caA3-Proteine sind sowohl in Anwesenheit des FFV-Vif (Spuren 1-5), als auch in Anwesenheit des FFVBetMCS (Spuren 6-10) detektierbar, jedoch schwächer in Anwesenheit von FFV-Vif im Vergleich zu FFVBetMCS. Die geringe Expression korrekt geschnittener FIV-Vif-Proteine führt zu einem niedrigeren fe- und caA3-Proteinlevel innerhalb der Zelle, der offenbar durch eine Initiation der proteasomalen Degradation durch FIV-Vif induziert wird.

Zusammenfassend zeigt dieses Ergebnis, dass der Titer von FFV-Vif wie auch von FFVBetMCS von feA3C-a supprimiert wird, jedoch ist die antivirale Aktivität von feA3C-a gegen FFV-Vif sehr viel schwächer als gegen FFVBetMCS. Möglicherweise supprimieren die nur unvollständig geschnittenen Bet^{tr}-Vif-Fusionsproteine die antivirale Aktivität der feA3C-Proteine schwächer als das authentische Vif-Protein.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde FFV-Vif in Langzeitpassagen auf CrFK-Zellen hinsichtlich seiner Replikationskompetenz im Vergleich zu wt FFV untersucht. Zudem sollten auf diese Weise *in vitro* optimierte Mutanten des pCF7-Vif-Konstrukts selektiert werden, die eine optimierte Aktivität gegen endogene feA3-Formen in den CrFK-Zellen aufwiesen.

4.8.2 Vergleich der Titer von FFV-Vif und wt FFV in Langzeitpassagen

Aufbauend auf den Ergebnissen des Abschnitts 4.8.1 wurde der Vektor pCF7-Vif Nr. 4 auf seine genetische Stabilität und Infektiosität im Vergleich zu wt pCF7 nach serieller Passagierung auf CrFK-Zellen untersucht. Durch die Expression endogener feA3-Proteine stellen CrFK-Zellen ein geeignetes Anzeige- und Selektionssystem auf die Replikationskompetenzen unter APOBEC3-vermittelter Restriktion dar. Hierzu wurde die bereits unter 4.8.1 beschriebene Versuchsdurchführung angewandt. 293T-Zellen wurden in zwei Ansätzen (in 10 cm Zellkulturschalen) mit 10 µg pCF7- bzw. pCF7-Vif-Vektoren transfiziert und die virushaltigen ZKÜs zwei Tage nach Transfektion auf CrFK-Zellen (in 10 cm Zellkulturschalen) überführt. Über 20 Passagen wurde der Titer von pCF7-Vif relativ zu wt pCF7 analysiert. Exemplarisch sind die ersten 14 Passagen der Langzeitpassage in Abb. 4.29 dargestellt.

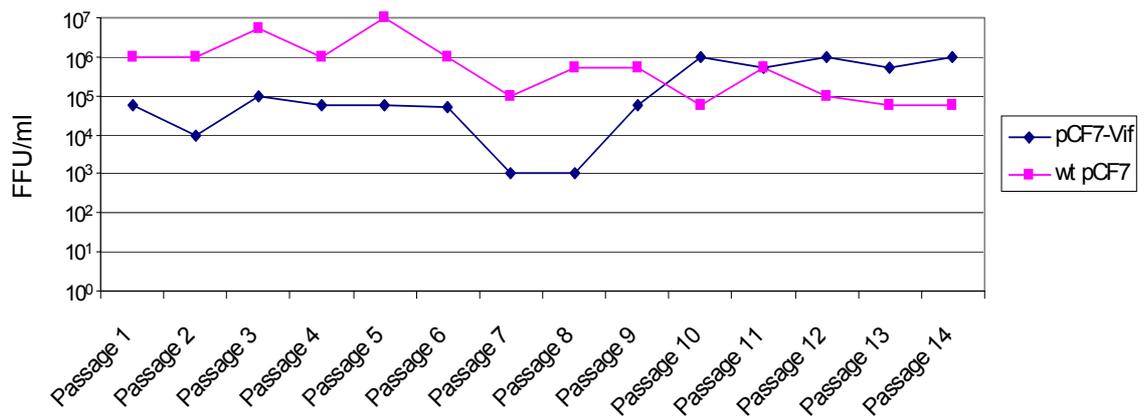


Abb. 4.29: Die pCF7-Vif Nr. 4-abgeleitete Chimäre zeigt nach 10 Passagen einen stark erhöhten Virustiter. Je 10 µg pCF7-Vif- und wt pCF7-Expressionsplasmide wurden in 2 großen Ansätzen (10 cm Zellkulturschalen) von 293T-Zellen cotransfiziert. 2 Tage nach Transfektion wurden die ZKÜs geerntet und zur Infektion von CrFK-Zellen verwendet. Diese wurden zweimal pro Woche, wie in Abschnitt 4.8.1 beschrieben, passagiert. Der Titer wurde, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, ermittelt und graphisch aufgetragen. Der virale Titer von FFV-Vif wurde über 14 Passagen hinweg relativ zu wt FFV analysiert.

Der Titer von FFV-Vif lag in den ersten sechs Passagen mit 10⁵ FFU/ml etwa zehnmal niedriger als der von wt FFV (10⁶ FFU/ml). In der siebten und achten Passage sank der Titer auf 10³ FFU/ml ab, nahm jedoch ab der achten Passage auf 10⁶ FFU/ml zu und blieb auf diesem Niveau bis zur vierzehnten Passage. Unter diesen Bedingungen lag der Titer von FFV-Vif ab der zehnten Passage sogar höher als wt FFV (ca. 10⁵ FFU/ml). Der Titer von wt FFV stieg bis zur fünften Passage auf 10⁷ FFU/ml an, sank dann aber auf 10⁵ FFU/ml.

Zusammenfassend beschreiben die Ergebnisse von Abb. 3.1 eine Zunahme des Titers von FFV-Vif nach neun Passagen innerhalb der gezeigten 14 Passagen. Diese Zunahme des Titers könnte durch adaptierte Mutationen in der *Be^{tr}-Vif*-Region begründet sein, welche die Vif-Expression oder Funktion positiv beeinflussen. Um mögliche Veränderungen der Vif-Expression zu bestimmen, wurden die infizierten CrFK-Zellen einzelner Passagen im Immunoblot auf zellassoziertes Antigen, insbesondere auf FIV-Vif analysiert. Hierfür wurden sowohl einzelne Passagen (2, 5, 10, 15) der infizierten CrFK-Zellen, als auch das gesamte Passagenspektrum (1-20) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.30 dargestellt.

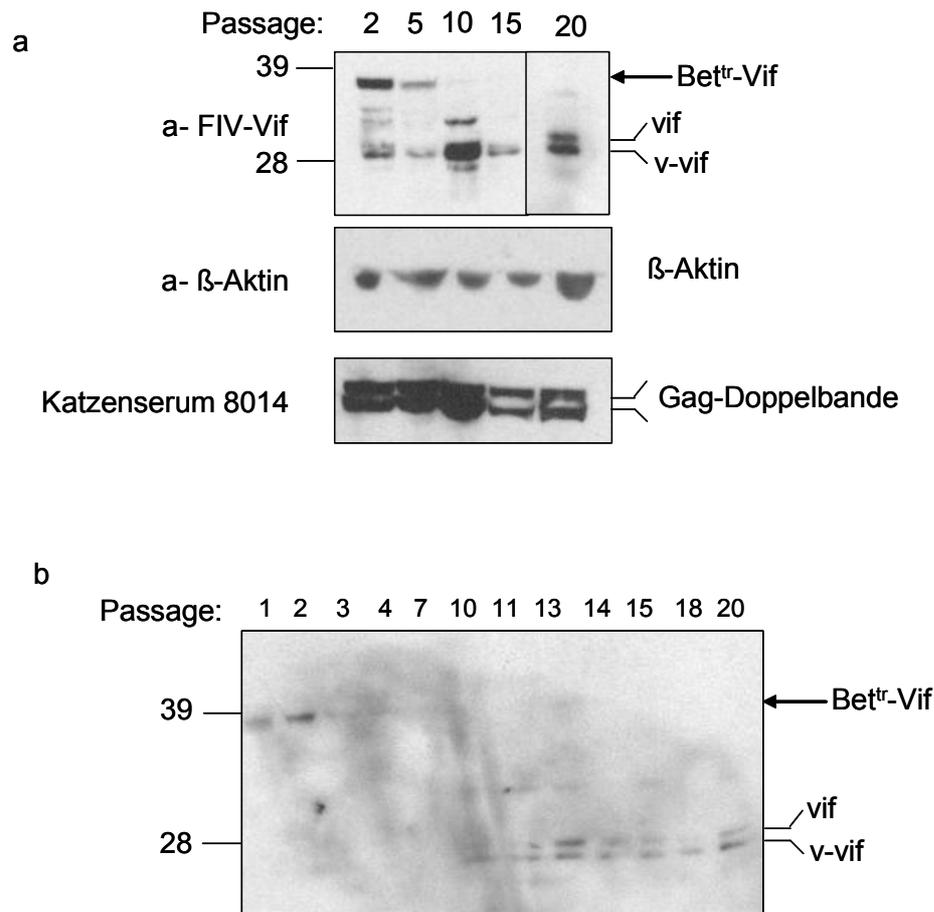


Abb. 4.30: Die FIV-Vif-Expression der infizierten CrFK-Zellen verändert sich über die Passagen. Zellossoziiertes Antigen verschiedener Passagen der in Abschnitt 4.8.2 beschriebenen seriellen Passagen von pCF7-Vif Nr.4 abgeleiteten Virus in CrFK-Zellen (die Zellpassage ist über den Blots angegeben) wurde geerntet und die FIV-Vif-spezifischen Proteine im Immunoblot mit dem monoklonalen Vif-Antikörper detektiert. a Immunoblots der infizierten CrFK-Zellpassagen 2, 5, 10, 15 und 20. FFV-Gag wurde mit dem FFV-positiven Katzenserum 8014 und β-Aktin mit einem monoklonalen β-Aktin Antikörper nachgewiesen. b Zeigt den Immunoblot des breiten Passagenspektrums. Auf der linken Seite des Blots sind jeweils die Banden des parallel aufgetrennten Markers angezeigt sowie der Antikörper zur Detektion von FIV-Vif. Die Pfeile auf der gegenüberliegenden Seite deuten auf die detektierten virusspezifischen Proteine.

Abb. 4.30 a zeigt, dass Bet^{tr}-Vif primär zwischen der zweiten und fünften Passage exprimiert wurde. Die molekulare Größe von Bet^{tr}-Vif beträgt 39.9 kDa, was der Größe der detektierten Bet^{tr}-Vif-Bande im Immunoblot entspricht. Dagegen werden nur geringe Mengen geschnittenes FIV-Vif-Protein detektiert (Spur 1 und 2). In Passage 10, 15 und 20 sind zwei Vif-reaktive Proteine von ca 30 und 32 kDa nachweisbar, die hier als Vif und v-Vif bezeichnet werden (Spur 3 bis 5). Die Analyse aller Proben des pCF7-Vif abgeleiteten Virus in Abb. 4.30 b zeigt, dass Bet^{tr}-Vif bis zur siebten Passage vorliegt. Ab der zehnten Passage sind lediglich die beiden Banden der v-Vif- und Vif-Proteine vorhanden.

Lässt man die Daten der Titrations und Vif Immunoblots zusammen, so deuten diese Resultate an, dass mit dem Titer bei Passage acht bis zwanzig ein neues Vif-Expressionsmuster einhergeht. Es werden statt dem Bet^{tr}-Vif-Fusionsprotein zwei geschnittene Vif-Proteine exprimiert.

4.8.3 Genotypische Untersuchung der Genome isolierter FFV-Vif-Virionen auf akkumulierte Mutationen

Um die Ursachen der phänotypischen Veränderungen der pCF7-Vif-Klone auf genotypischer Basis erklären zu können, wurden die Genome der Virionen aus späten Infektionspassagen isoliert und genomische Sequenzen dieser Genome von Beginn der *bel 1*-Region (Position 9359) bis einschließlich des gesamten *Vif*-Gens (Position 10288) auf Sequenzen mit akkumulierten Mutationen hin untersucht. Dazu wurden Virionen der 18. Passage entsprechend Abschnitt 3.5.6 aus den ZKÜs isoliert, die virale DNA entsprechend 3.5.6 und 3 präpariert und diese DNA direkt für eine PCR eingesetzt. Dabei wurden die Sequenzen des pCF7-Vif-Genomsbereichs 9359 bis 10288 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden entsprechend Abschnitt 3.2.15 in Topo-Vektoren kloniert und positive Kolonien in LB-Amp-Medium angezüchtet. Die Topo-Plasmide wurden entsprechend Abschnitt 3.2.1 aus *E.coli*-Klonen isoliert und die amplifizierten pCF7-Vif-Inserts sequenziert. Insgesamt wurden so neun Sequenzen analysiert. Dabei wurde eine gehäufte Mutation an den FFV-Positionen 9359 bis 9361 festgestellt, die für das *bel2*-Gen codieren. Diese Mutation führt innerhalb der entsprechenden Aminosäuresequenz zu einer Stop-Sequenz. Die Auswertung der Sequenzveränderungen ist in Abb. 4.31 dargestellt.

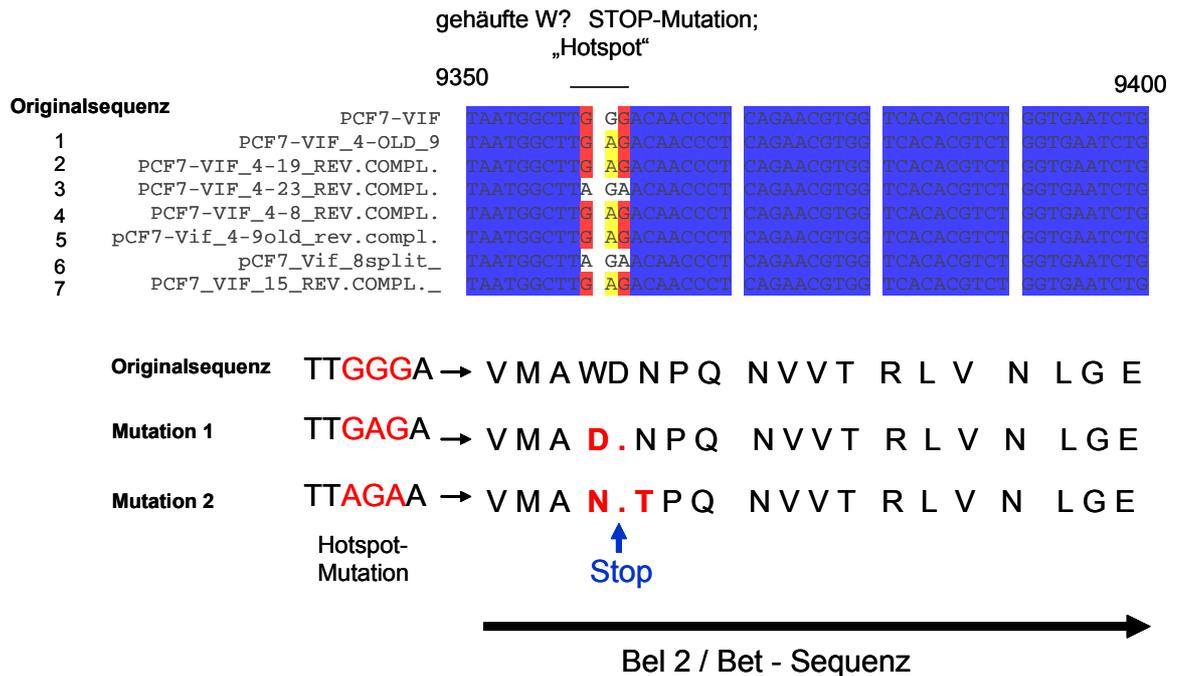


Abb. 4.31: Sequenzierungen der FFV-Vif-Mutanten der Langzeitpassagen zeigten eine Stop-Mutationen innerhalb der Bet-Sequenz, die aber aus zwei unabhängige Mutationen erfolgen. Dargestellt ist der pCF7-Vif-Sequenzabschnitt von den Bp 9350 bis 9400 (oberste Nukleotidsequenz) im Vergleich zu sieben analysierten Sequenzen der 18. Passage (Sequenzen 1-7), die die markierte Hotspotmutationen tragen. In der unteren Reihe sind die Nukleotidsequenzen der beiden Mutationstypen (Mutation 1 und Mutation 2) dargestellt sowie die daraus resultierenden Stop-Codon-Mutationen in der entsprechenden Bet-Aminosäuresequenz.

In zwei unabhängige Mutationen wird ein Tryptophan zu einem Stop-Codon im Bet-Anteil des Bet^{tr}-Vif Fusionsproteins verändert. Diese Mutationshäufung wird im Folgenden als Hotspotmutation bezeichnet. In Abb. 4.31 sind die sieben der neun analysierten pCF7-Vif-Sequenzen, welche die Hotspotmutation aufweisen, im Vergleich zu der original pCF7-Vif-Sequenz dargestellt. Gleichzeitig könnte diese Stop-Mutation für eine verstärkte Transkription der Vif-Proteine beginnend von der Protease Schnittstelle verantwortlich sein. Dies erklärt die im Immunoblot auftretende zusätzliche Bande nach Detektion des Vif-Proteins (Abb. 4.30), das durch die Abtrennung an der Protease-Schnittstelle entsteht. Diese Bande stimmt auch in der Größe mit dem Molekulargewicht eines protease-schnittstellenhaltigen-Vif-Proteins (32 kDa) überein. Abb. 4.32 stellt den Einfluss der Hotspotmutation auf die Translation des Vif-Proteins graphisch dar.

Ausschnitt aus dem pCF7-FIV-Vif-Konstrukt:

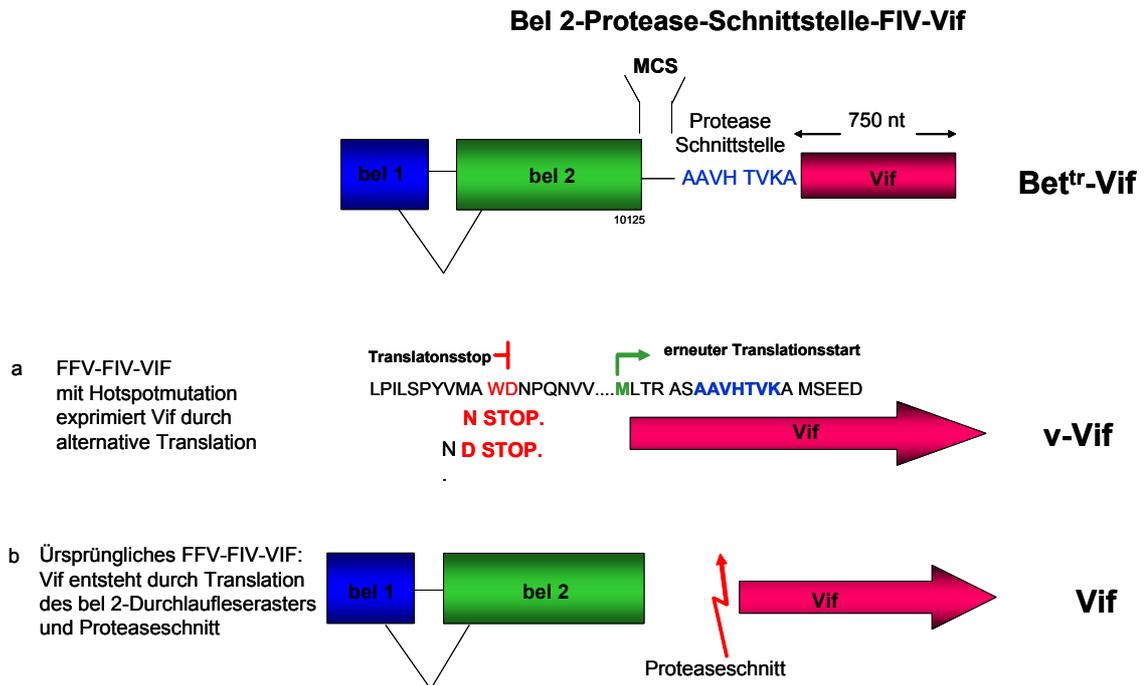


Abb. 4.32: Die Hotspotmutation in der *bel 2*-Region der *pCF7-Vif*-Mutanten resultieren in der Expression von *v-Vif* durch alternative Translation. Gezeigt ist der schematische Ausschnitt der *bel 1*-, *bel 2*- und *vif*- Sequenz des pCF7-Vif-Konstrukts. a Die Hotspotmutation in der *bel 2*-Sequenz führt zu einem Translationsabbruch und einer daraus resultierenden alternativen Translation beginnend mit der Protease Schnittstelle. Dies führt zu einem um die Protease Schnittstelle verlängertem *v-Vif*-Protein. b Gezeigt ist die ursprüngliche Entstehung des FIV-Vif durch Translation des *bel 2*- Durchlaufeserasters und anschließendem Proteaseschnitt.

Diese Hypothese wurde in weiterführenden Studien untersucht, wobei diese Hotspotmutation in das originale pCF7-Vif-Konstrukt kloniert wurde. Zusätzlich wurden weitere Punktmutationen in der Methioninstartsequenz der Proteaseschnittstelle eingefügt. Ziel war es dabei, einen replikationskompetenten, chimären FFV-Vektor zu etablieren, der durch starke Inhibition der endogenen feA3-Proteine einen hohen viralen Titer erzeugt. Des Weiteren dient Vektor als Grundlage für die Entwicklung eines vaxinen Virus gegen FIV. Diese Klone wurden hinsichtlich ihres Titers sowie der Expression des Vif-Proteins untersucht. Die Ergebnisse dieser Klonierung sollen jedoch im Rahmen in dieser Arbeit nicht weiter besprochen werden.

5 DISKUSSION

Die Familie der A3-Proteine stellt eine wichtige Gruppe von Cytidineaminasen dar, die als antivirale Faktoren die entstehenden Reversen Transkripte retroider Elemente deaminieren und so z.B. die Replikation susceptibler Retroviren inhibieren. Während Primaten für sieben A3-Gene codieren, wurden in dem Genom der Hauskatze vier A3-Gene identifiziert, die sich im Laufe der Evolution durch Genduplikation, Expansion und Divergenz entwickelt haben. Auf diese Weise wurden retrovirusspezifische A3-Proteine gebildet, die durch die Anwesenheit retroviraler Abwehrmechanismen komplexer Retroviren, z.B. Vif- und Bet-Proteine, unter ständigem evolutionärem Druck zur Coadaptation (positive Selektion) stehen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand der Nachweis der drei Hauptformen der endogenen feA3-Proteine (feA3C-a, -H und -CH) in felines Zellen sowie die Untersuchung der antiviralen Aktivität der feA3 Haupt- und Isoformen (feA3C-a, -b, -c) bezüglich FFV. Des Weiteren wurden die protektiven Mechanismen von FFV-Bet mit denen von FIV-Vif bezüglich der feA3-Hauptformen verglichen. Die Interaktionsuntersuchungen der feA3-Haupt- und Isoformen und viralen Proteine führten zu neuen Erkenntnissen bezüglich des Suppressionsmechanismus von FFV. Bet supprimiert die antivirale Aktivität der fünf feA3-Haupt- und Isoformen nicht wie Vif durch proteasomale Degradation, sondern wahrscheinlich durch Inhibition der Gag-feA3-Interaktion. Dies führt zu einer Inhibition der Inkorporation von feA3-Hauptformen in foamyvirale Viruspartikel. Dimerisierungsstudien der unterschiedlichen feA3-Hauptformen sowie die Deletion des katalytischen Zentrums im feA3C-a zeigten die Bedeutung der Dimerisierung der feA3-Hauptformen und die enzymatische Aktivität von feA3C-a für den retroviralen Abwehrmechanismus. Diese neuen Erkenntnisse ermöglichten die Konstruktion und anschließende Charakterisierung eines chimären *pCF7-Vif*-Vektors. Dieser virale Vektor kann durch seine effiziente Inhibition der antiviralen Aktivität der feA3-Proteine durch das Lentivirus-Vif als Grundlage für die Entwicklung prophylaktischer und therapeutischer Vektoren dienen. Des Weiteren bildet dieser Vektor den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Impfvektors gegen FIV.

5.1 Phänotypen der feA3-Formen

Am Anfang der Arbeit wurden polyklonale Antiseren zum Nachweis der fünf endogenen feA3-Haupt- und Isoformen feA3C-a-c, -H und -CH hergestellt. Molekularbiologische Analysen, durchgeführt von Münk et. al., wiesen bislang lediglich genomische Katzenssequenzen und

cDNAs der *feA3*-Loci nach (Münk et al., 2008). Dabei unterscheiden sich die *feA3*-Gene in folgenden Schlüsseleigenschaften von Primaten-A3-System: Während bei Primaten sieben *hA3*-Gene (*A-H*) als einzelne Kopien auf dem Chromosom 22 lokalisiert sind, sind bei der Hauskatze drei ein-Domänen *feA3C*-Gene (*A3C-a*, *-b*, *-c*) und ein *feA3H*-Gen colinear auf dem Chromosom B4 vorhanden. Innerhalb des *feA3*-Lokus durchlief das *feA3C*-Gen eine einmalige Triplikation. Das *feA3H*-Gen ist dagegen nur einfach auf dem Chromosom lokalisiert (Münk et al., 2008). Das zwei-Domänen *feA3CH*-Gen entsteht durch durchlaufende Transkription und alternatives Spleißen aus den *feA3C-a*-, *-b*- und *feA3H*-Genen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe der erhaltenen polyklonalen Antiseren FFV-infizierte und nicht-infizierte CrFK- und Mya-Zellen auf die Expression der drei *feA3*-Hauptformen *feA3C*-, *-H*-, und *-CH* untersucht. Dabei wurde die Expression der von Münk et al. detektierten *feA3C*-, *-H*- und *-CH*-Gene in CrFK-Zellen bestätigt. Auffällig war, dass sich nach Infektion der CrFK-Zellen mit FFV das zelluläre Expressionslevel der *feA3C*-Isoformen verzehnfachte. Diese Beobachtung wurde auch in weiteren Studien endogener *feA3C*-Proteine in CrFK-Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Dagegen reduzierte eine Infektion der CrFK-Zellen mit FFV die Expression der *feA3H*- und *-CH*-Hauptformen um die Hälfte. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass die *feA3C-a-c*-Isoformen als Haupteffektoren gegen FFV-Infektionen zur antiviralen Abwehr verstärkt exprimiert werden.

Während Münk et al. die cDNA-Klone aller *feA3*-Gene in PBMCs, MYA-1- CrFK- und KE-R-Zellen nachgewiesen haben, waren *feA3C*- und *-H*-Proteine in Mya-Zellen nicht detektierbar. Humane *A3*-Gene sind in verschiedenen menschlichen Geweben exprimiert, die entweder mit der Replikation endogener oder exogener Retroviren verbunden sind, z.B. Hoden, Eierstöcke sowie unstimulierte periphere Blutlymphozyten. Die Analyse von cDNA-Klonen in PBMCs-, Mya-, CrFK- und KE-R-Zellen von Hauskatzen zeigte, dass auch *feA3*-Gene differentiell exprimiert werden. Eine Erklärung für die ubiquitäre Expression des *feA3CH*-Proteins könnten das Fusionstranskript *feA3CH* sein, das durch Trans-Spleißen zwischen den separaten pre-mRNAs von *feA3C-a*-, *-b*- und *feA3H*-Genen entsteht. Die Genexpression durch Trans-Spleißen ist in Säugern bislang selten beschrieben worden und wird als Ausnahme angesehen (Caudevilla et al., 1998; Takahara et al., 2005).

5.1.1 Charakterisierung der *feA3*-Haupt- und Isoformen

Primaten *A3*-Gene stehen bei der Bekämpfung von Lentiviren hinsichtlich ihrer Effektivität unter starker adaptiver Selektion (OhAinle et al., 2006; Sawyer, Emerman, and Malik, 2004; Zhang and Webb, 2004). Bislang war nicht klar, ob diese rasante *A3*-Selektion einzigartig in Primaten vorkommt oder ob dies eine allgemeine Eigenschaft von Placentaliern darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die antiviralen Aktivitäten der *feA3*-Haupt- und Isoformen im Vergleich mit caninem *A3A*- und *-A3H*-Proteinen gegen wt- oder Bet-defizientes FFV analysiert. In Katzen sind drei Arten endogener Retroviren bekannt: Die Orthoretroviridae FIV, das mit dem HIV-1 verwandt ist, und das Gammaretrovirus FeLV (*Felines Leukämievirus*) mit einer

einfachen Genomorganisation ohne akzessorische Gene sind als Katzenpathogene bekannt. Die Analyse der antiviralen Aktivität der feA3-Haupt- und Isoformen gegen wt FIV bzw. Δ vifFIV und gegen FeLV wurde in Rahmen einer gemeinsamen Studie im Labor von Dr. C. Münk durchgeführt (Münk, 2008). Von den Spumavirinae ist das FFV als Katzenvirus bekannt. Die Coexpression der feA3- und caA3-Formen zusammen mit wt und Bet-defizientem FFV (Abschnitt 4.2) zeigte folgendes Ergebnis: Der virale Titer von wt FFV wird nur unwesentlich von der Anwesenheit aller fe- und caA3-Formen beeinflusst. Dagegen wird der virale Titer von FFVBBtr in Anwesenheit der feA3C-a-c-Isoformen signifikant supprimiert. FeA3H und -CH, sowie caA3A und -H wiesen keine weiteren suppressiven Effekte bezüglich des viralen Titers auf. Münk et al. zeigten dagegen, dass nur feA3H und -CH die Infektiosität von Δ vifFIV um das 5- bis 10-fache reduzierten, analog zu humanen A3H (Münk et al., 2008). Auch hier supprimierte keine feA3-Haupt- oder Isoform den wt FIV-Titer. CaA3H supprimiert den viralen Titer sowohl von wtFIV, als auch von Δ vifFIV. Die Suppression von Δ vifFIV durch feA3H und -CH korrelierte hierbei mit einer signifikant angestiegenen G→A Mutationsrate im Δ vifFIV-Genom. Die Anwesenheit von FIV-Vif inhibierte die Genomediterungsrate nahezu komplett. Des Weiteren zeigten Münk et al., dass nach Co-Expression der feA3- und caA3-Formen mit FeLV nur feA3CH einen moderaten antiviralen Effekt auf den viralen Titer hatte und diesen um den Faktor reduzierte. FeA3H und caA3A zeigten einen marginalen antiviralen Effekt.

Zusammenfassend zeigen die feA3C-a- und -c-Isoformen eine sehr starke bis starke antivirale Aktivität gegen bet-defizientes FFV, während feA3H und -CH den viralen Titer unwesentlich reduzieren. Im Gegensatz dazu haben nur feA3H und -CH einen moderaten antiviralen Effekt auf Δ vifFIV und feA3CH inhibierte FeLV schwach aber signifikant. Das Vif-Protein inaktiviert folglich das feline A3H und -CH-Protein, nicht aber humanes und canines A3H. Das FFV-Bet-Protein inaktiviert hauptsächlich feA3C-a, was auch in vorausgegangenen Studien gezeigt wurde (Löchelt et al., 2005). Zusätzlich werden auch feA3C-a-c-Isoformen von FFV-Bet angegriffen. Daraus kann geschlossen werden, dass die unterschiedlichen feA3-Hauptformen die verschiedenen feline Retroviren angreifen und dabei ein auffälliges virusspezifisches Profil zeigen.

Zum Beginn dieser Studien war der Einfluss der FIV-Vif-Proteine auf die Stabilität der feA3-Hauptformen noch nicht bekannt. Das *FIV-vif*-Gen ist ein wichtiger Modulator der Virusausbreitung. Eine Deletion des *vif*-Gens im *FIV*-Genom führt zu einem Replikationsblock in feA3-exprimierenden feline CrFK-Zellen (Derse D, 2007; Lockridge et al., 1999; Shacklett and Luciw, 1994; Tomonaga et al., 1992). Die Tatsache, dass feline A3-Proteine die FIV-Infektion nicht verhindern können zeigt, dass FIV im Laufe der Evolution eine Möglichkeit entwickelt hat, sich der feA3-vermittelten Restriktion zu entziehen. Einzig feA3H und -CH supprimieren Δ vifFIV, was eine positive Selektion der *feA3H*- und *-CH*-Gene bedingt (Münk et al., 2008). Münk et al. zeigten, dass feA3H und -CH auch inhibitorisch gegen FeLV wirken. Im Gegensatz zu Δ vifFIV haben feA3H und -CH nur minimale antivirale Aktivitäten gegen Bet-defizientes FFV. Andererseits sind feA3C-a und zum geringeren Anteil -b und -c antiviral aktiv gegen bet-defizientes FFV, nicht aber gegen Δ vifFIV. Aufgrund dieser Daten kann ein Modell entwickelt werden, bei dem spezifische feA3-Proteine selektiv bestimmte Subtypen feline Retroviren erkennen und inaktivieren können, während die feA3-Formen in der Regel nicht coadaptierte,

heterologe Retroviren (beispielsweise Δ vif SIVagm) inhibieren können. Dies zeigt auch die Tatsache, dass Retroviren sich sogar unabhängig der Vif- oder Bet-Expression in ihrer Sensibilität unterscheiden, von feA3-Proteinen supprimiert zu werden. Ähnlich der Entwicklung von sieben A3-Proteinen in Primaten (OhAinle et al., 2006; Sawyer, Emerman, and Malik, 2004; Zhang and Webb, 2004), waren Katzen offensichtlich unter einem starken evolutionären Druck, die Diversität coexprimierter A3-Proteine und damit die antivirale Leistung zu erhöhen. Andere Säugetiere wie Nagetiere oder Hunde waren entweder diesen infektiösen Viren nicht in dieser Form ausgesetzt, oder konnten diese mit analogen Abwehrmechanismen bekämpfen, die A3 Proteine nicht mit einschließen, z.B TRIM5-Proteine.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass APOBEC3-Proteine weitgehend ineffektiv gegenüber Viren wirken, welche die eigene Spezies infizieren. Andererseits erweisen sie sich jedoch als effektiv gegenüber den meisten heterologen Retroviren und können so die Interspezies-Übertragung verhindern. Des Weiteren nehmen APOBEC3-Proteine auch eine wichtige Funktion bei der Inhibition von Retrotransposons ein und verhindern so die graduelle Akkumulation von Mutationen im Wirtszellgenom (Sawyer, Emerman, and Malik, 2004).

Zur Untersuchung des Inhibitionsmechanismus von FFV-Bet im Vergleich zu FIV-Vif wurden in der vorliegenden Arbeit beide viralen Proteine in Anwesenheit der feA3-Formen in Coexpressionsstudien untersucht (Abschnitt 4.3). Es wurde vermutet, dass FIV-Vif, analog zu HIV-Vif, feA3-Proteine angreift, indem es ihre proteasomale Degradation auslöst (Mehle et al., 2004; Sheehy, Gaddis, and Malim, 2003; Stopak et al., 2003; Yu X, 2003). Dagegen war bereits bekannt, dass FFV-Bet die zelluläre Konzentration von feA3C-a nicht beeinflusst (Löchelt et al., 2005). Nach Cotransfektion von FFV-Bet und FIV-Vif mit feA3C-a und anschließender Detektion der transfizierten Proteine im Immunoblot, konnte auch für FIV-Vif bestätigt werden, dass dieses Protein den Abbau aller bekannten feA3-Proteine induziert. Um nachzuweisen, dass FIV-Vif die feA3-Proteine nicht während ihres Translationsprozesses inhibiert, sondern diese primär proteasomal degradiert werden, wurde das soeben beschriebene experimentelle System mit allen drei feA3-Hauptformen in An- und Abwesenheit des Proteasominhibitors MG132 wiederholt (Abschnitt 4.3.1). Die Ansätze FIV-Vif und feA3-cotransfizierter Zellen in Anwesenheit von MG132 verhinderten den proteasomalen Abbau der feA3-Proteine partiell, wie im Immunoblot nachgewiesen wurde. Gleichzeitig wurde keine Veränderung des Expressionslevels der feA3-Formen in Anwesenheit von FFV-Bet im Immunoblot nachgewiesen. Das *vif*-Gen des FIV entspricht in Größe und Genomlokalisierung dem *vif*-Gen der Primaten-Lentiviren. Auch der C-Terminus des FIV-Vif-Proteins hat, analog des HIV-Vif, ein (SLQY(L/R)A BC)-Box-Motiv (Paul et al., 2007; Sheehy, Gaddis, and Malim, 2003; Yu et al., 2003). Dieses Motiv interagiert bei HIV-Vif zusammen mit einem oberhalb lokalisierten Zink-Finger-Motiv (HCCH) und bildet mit diesem einen Komplex, welcher mit Cullin5, Elongin B, Elongin C und Rbx 1 die hA3G und -F-Proteine zum Ubiquitin-Ligase-Komplex (E3) rekrutiert (Luo et al., 2005; Russell and Pathak, 2007; Xiao et al., 2007). E3 ubiquitiniert hA3G und hA3F und leitet so die proteasomale Degradation dieser Proteine ein (Mehle et al., 2006; Shirakawa et al., 2006; Yu et al., 2004; Yu et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass FIV-Vif die proteasomale Degradation der feA3C-a, -H und -CH-Proteine initiiert und somit die A3-induzierten Mutationen in der viralen DNA verhindert.

Die Kenntnis der Interaktionsmotive in HIV-1- und FIV-Vif mit den entsprechenden A3-Proteinen ermöglicht die Entwicklung therapeutischer Inhibitoren, welche die Interaktionsstelle blockieren und einen neuen Ansatz zur Bekämpfung von HIV-Infektionen darstellen (Stopak, 2005). Die intrazelluläre Expression der A3-Proteine könnte auch durch die Interaktion eines Inhibitors mit Vif allein oder der Ubiquitinierungsstelle der A3-Proteine erhalten werden. Dabei könnte die Hauskatze (*felis catus*) als Tiermodell für die Evaluierung eines molekularen Inhibitors des lentiviralen Vif (FIV und HIV) dienen.

Im Gegensatz zum Lentivirus FIV leitet FFV-Bet keine proteasomale Degradation der feA3C-a, -H und -CH-Haupt- und Isoformen ein. Die Bet-Bindung reicht aus, um die antivirale Aktivität der feA3-Formen zu unterbinden.

Mit diesen Ergebnissen ging auch die Fragestellung einher, ob FIV-Vif den Titer eines Bet-trunkierten FFV-Virus in Anwesenheit von feA3C-a wiederherstellen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Komplementierung eines Bet-trunkierten pCF7-Vektors (Abschnitt 4.3.3) sowohl mit FFV-Bet, als auch mit FIV-Vif gezeigt, dass beide Proteine den viralen Titer in Anwesenheit von feA3C-a zumindest teilweise stabilisieren können. Dabei leitet die Bindung von Bet an feA3C-a jedoch nicht dessen Sequestrierung ein. Jedoch könnten limitierende feA3C-a-Mengen auch ein Grund für die Stabilisierung des viralen Titers sein. In weiterführenden Untersuchungen, bei denen pfeA3C-a-Expressionsplasmide in ansteigenden Mengen zu Bet-komplementierten pCF7-BBtr-Vektoren transfiziert werden, muss der Einfluss der molaren feA3-Konzentration auf den viralen Titer eingehender untersucht werden.

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass PFV-Bet die Infektiosität von PFV und HIV-1 in Anwesenheit von hA3G bzw. agmA3G signifikant erhöht (Russell et al., 2005). Dieser Anstieg in der Infektiosität korreliert mit einer beobachteten Reduktion der Inkorporation von hA3G bzw. agmA3G in entstehende Virionen. Auch im felines FV-System wurde eine Inhibition der Inkorporation der feA3-Formen in wt FFV beobachtet, worauf in Abschnitt 5.2 eingegangen wird.

5.2 Interaktion der feA3-Formen mit foamyviralen Proteinen

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits dargestellt, dass die Titer Bet-defizienter oder mutierter FFV-Partikel durch die drei feA3C-Isoformen mit unterschiedlicher Intensität supprimiert werden. In Co-Immunopräzipitationsstudien mit den cotransfizierten feA3-Hauptformen und wt- bzw. *Bet*-mutierten FFV-Genomen wurde einerseits gezeigt, dass Bet mit allen drei feA3-Hauptformen interagiert und so allen zellulären feA3-Aktivitäten entgegenwirkt (Abschnitt 4.4). Dabei reicht die Bindung von Bet an die feA3C-Isoformen aus, um ihren antiviralen Effekt zu unterbinden. Andererseits führt schon eine geringfügige Mutation im putativen Leuzin-Zipper-Motiv von Bet zu einer Unterbrechung der feA3-Bet-Interaktion und damit auch zu einer viralen Titerreduktion in Anwesenheit der feA3Cs. Die Tatsache, dass eine geringfügige Mutation innerhalb des Bet-Proteins (BetMCS) eine Titerreduktion im gleichen Ausmaß wie die

Trunkation von Bet auslöst und gleichzeitig nicht mit den fünf feA3-Haupt- und Isoformen interagiert, weist auf die zentrale Funktion dieser Sequenz in FFV-Bet hin. Ob diese Sequenz direkt die Funktion der feA3-Proteine beeinflusst, z.B. während deren Bindung oder ob diese Sequenz für die korrekte Faltung von Bet essentiell ist, ist bislang nicht geklärt.

Bet interagiert mit allen feA3-Haupt- und Isoformen, obwohl nur die feA3C-Isoformen antiviral gegen FFV aktiv sind. Dies weist darauf hin, dass sich Bet im Laufe der Evolution hinsichtlich einer Interaktion mit allen Mitgliedern der feA3-Familie co-entwickelt hat. So hat sich im FFV-Genom ein breit angelegter protektiver Mechanismus entwickelt, der auch auf feA3-Mitglieder abzielt, die entweder bislang noch keine oder nicht mehr eine antivirale Aktivität gegen Bet-defizientes FFV zeigen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass für die Interaktion von FFV-Bet mit den drei feA3-Hauptformen feA3C-a, -H und -CH kein weiteres zelluläres Protein oder virale RNA benötigt wird. Dies weist auf die hohe Effizienz des protektiven Mechanismus von FFV-Bet hin. Die Bindung von Bet an die feA3-Hauptformen reicht aus, um den antiviralen Effekt zu verhindern. Die feA3-inaktivierende Funktion von Bet ist für die FFV-Replikation essentiell, da kein Bet-defizientes Foamyvirus bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue experimentelle Systeme etabliert, um zu bestimmen, ob die Sequestrierung der feA3-Proteine von dem Ort der Morphogenese der FV-Partikel weg der inhibitorische Mechanismus von Bet ist. In Proteininteraktionsstudien wurde gezeigt, dass die Interaktion des ein-Domänen feA3C-a- und des zwei-Domänen feA3CH-Proteins mit FFV-Gag unabhängig von der RNA-Anwesenheit ist (Abschnitt 4.5, 4.5.2). Dies steht in Gegensatz zu den Ergebnissen von hA3G-Inkorporationsstudien in HIV-1-Virionen, welche eine virale RNA-Abhängigkeit der Inkorporation von hA3G zeigen (Khan et al., 2005; Sawyer, Emerman, and Malik, 2004; Svarovskaia, 2004; Zennou et al., 2004).

In Virusisolationsstudien wurde die Inkorporation von feA3C-a und -CH, nicht aber von feA3H in Bet-trunkierte und -mutierte FFV-Virionen bestätigt (Abschnitt 4.5.3). Einer Inkorporation in Bet-trunkierte oder mutierte FFV-Viruspartikel geht somit wahrscheinlich die Interaktion mit FFV-Gag voraus. Diese Experimente zeigten, dass sowohl die Gag-Interaktionsstelle als auch die katalytisch aktive Stelle zur antiviralen Aktivität gegen Bet-defizientes FFV in der feA3C-Domäne lokalisiert sind. Eventuell wird diese Domäne durch die Zusammenlagerung der beiden feA3C- und -H-Domänen im feA3CH-Protein sterisch blockiert, so dass dieses Protein keine antivirale Aktivität gegen Bet-defizientes FFV aufweist. Eine Aufteilung der katalytischen Funktions- und der Bindungsstelle an FFV-Gag auf die C- und H-Domäne, wie sie analog für das hA3G und -F gezeigt wurde, kann für das zwei-Domänen feA3CH-Protein nicht bestätigt werden (Hache, Liddament, and Harris, 2005).

Die Resultate zeigen, dass FFV-Bet alle drei feA3-Hauptformen bindet, die in der Zielzelle exprimiert werden und so die Gag-Interaktionsseite blockiert. So wird wahrscheinlich die Inkorporation der feA3C-a- und -CH-Proteine in neu entstehende virale Partikel blockiert. Dies verhindert Hypermutationen im FFV-Provirus während der Reversen Transkription und erhöht die Infektiosität des Virus (Cullen, 2006). Der alternative Mechanismus, bei dem FFV-Bet die feA3-Hauptformen zur proteasomalen Degradation leitet, kann dagegen durch den Nachweis eines stabilen intrazellulären feA3-Leves in An- und Abwesenheit von MG132 ausgeschlossen

werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass FFV-Bet in CrFK-Zellen ein hohes Expressionsniveau hat (Alke et al., 2001). Das PFV- bzw. FFV-Bet-Protein muss zur Inaktivierung der feA3C-Proteine im Gegensatz zu HIV- bzw. FIV-Vif, in stöchiometrischen Mengen vorliegen. Daher wird Bet in sehr großen Mengen in FV-infizierten Zellen exprimiert (Linial, 1999). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Bet-Protein ein primitives Ortholog zum HIV-Vif darstellt (Cullen, 2006).

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die Gag-Interaktionsstelle in der feA3C-Domäne lokalisiert ist. Die im Vergleich zu feA3C-a und -c nur schwache Interaktion von feA3C-b mit FFV-Gag ist vermutlich auf Mutationen einzelner AS in der feA3C-b-Sequenz zurückzuführen. Allerdings ist bislang noch unklar, welche der fünf von feA3C-a- und -c-Consensussequenzen abweichenden AS für die geringe Interaktion mit FFV-Gag verantwortlich sind.

Vorangegangene Studien ergaben kontroverse Ergebnisse bezüglich einer möglichen Inaktivierung von hA3G durch eine Delokalisation in cytoplasmatische Mikrodomänen, den sog. P-bodies (Gallois-Montbrun et al., 2007; Niewiadomska et al., 2007). In Immunofluoreszenzstudien, die mit FFV-infizierten CrFK-Zellen durchgeführt wurden, wurde nach Immunfluoreszenzfärbung der P-bodies und von feA3C- bzw. -CH keine Co-Lokalisation dieser feA3-Formen mit P-bodies beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass FFV-Bet-Proteine die feA3-Haupt- und Isoformen binden, diese jedoch nicht in cytoplasmatische Mikrodomänen delokalisieren, sondern mit ihnen im Cytoplasma verbleiben.

5.3 Einfluss der feA3-Dimerisierung auf die antivirale Aktivität

Aus früheren Studien ist bekannt, dass hA3G in dimerisierter Form vorliegen muss (Cho et al., 2003; Prochnow et al., 2007; Shindo et al., 2003), um enzymatisch aktiv zu sein. Die Homo- und Heterodimerisierung wurde auch für die feline A3-Hauptformen in der vorliegenden Arbeit untersucht (Abschnitt 4.6). Zusätzlich wurde dem Hinweis nachgegangen, ob FFV-Bet im viralen Kontext die Dimerisierung von feA3-Proteinen inhibiert. Mithilfe von Proteininteraktionsstudien wurde gezeigt, dass die ein-Domänen feA3-Formen homo- und heterodimerisieren, während keine Dimerisierung der zwei-Domänen feA3CH-Form mit den ein-Domänen feA3-Formen zu beobachten ist. Die feA3CH-Form besteht aus den feA3-C- und -H-Domänen, daher ist die Dimerisierungsstelle beider feA3-Unterdomänen innerhalb des intramolekularen feA3CH-Proteindimers bereits besetzt. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass FFV-Bet im foamyviralen Kontext die Dimerisierung der feA3-Hauptformen nicht inhibiert. Somit ist ein weiterer möglicher Inhibitionsmechanismus von FFV-Bet ausgeschlossen. Dies unterstützt die Vermutung, dass FFV-Bet lediglich die Verpackung der feA3-Haupt- und Isoformen inhibiert, indem es z.B. an die feA3-Gag-Interaktionsstelle bindet und diese so blockiert. Auch eine direkte Blockade des aktiven Zentrums von feA3 durch Bet ist nicht wahrscheinlich, wie in vorangegangenen Studien besprochen wurde (Löchelt et al., 2005).

In vorangegangenen Studien war noch nicht untersucht worden, ob die Anwesenheit der inaktiven oder weniger aktiven feA3-Haupt- und Isoformen einen trans-dominant-negativen Effekt auf die antivirale Aktivität der feA3C-a-c-Isoformen hat. In der vorliegenden Arbeit wurde unter den angewandten Bedingungen gezeigt, dass feA3-Proteine sich nicht gegenseitig in ihrer antiviralen Aktivität inhibieren und somit ein trans-dominant-negativer Effekt schwach aktiver feA3-Proteine gegenüber inhibitorisch sehr aktiven Proteinen ausgeschlossen werden kann (Abschnitt 4.6.1).

5.4 Bedeutung des katalytischen Zentrums von feA3C-a für dessen Phänotyp

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führten zu der Fragestellung, ob eine Zerstörung des aktiven Zentrums in feA3C-a eine Suppression der antiviralen Aktivität zur Folge hat, oder ob feA3 auch durch einen deaminierungs-unabhängigen Mechanismus den foamyviralen Titer supprimiert (Bishop, Holmes, and Malim, 2006; Holmes, Malim, and Bishop, 2007; Newman et al., 2005; Opi S, 2006; Shindo et al., 2003). Um den aus vorangegangenen Studien für hA3 und HIV-Vif beschriebenen Hinweis nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit katalytische und strukturelle Mutanten des feA3C-a-Proteins hergestellt und auf ihre antivirale Aktivität, sowie auf ihre funktionelle Interaktion mit foamyviralen Proteinen hin untersucht (Abschnitt 4.7.2). Hierbei wurde klar ersichtlich, dass die Zerstörung des katalytischen Zentrums durch die Mutation des katalytisch oder strukturell wichtigen E bzw. C in den beschriebenen feA3C-a-Mutanten mit einem kompletten Funktionsverlust der antiviralen Aktivität gegen Bet-trunkiertes FFV einhergeht, was mit den Ergebnissen von Miyagani et al. in Bezug auf hA3G und HIV übereinstimmt (Miyagi et al., 2007). Neben dem Verlust der enzymatischen Aktivität werden die katalytischen E70-Mutanten auch nicht mehr in Virionen Bet-defizienter Genome verpackt.

Die Ergebnisse der semiquantitativen Immunoblot-Analyse zeigte überraschenderweise eine starke Abnahme der E70-mutierten feA3C-a-Proteinexpressionen in Anwesenheit von wt FFV, bzw. von FFVBBtr, nicht aber in deren Abwesenheit. Nachdem der Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern gegen Ubiquitin wiederholt wurde, zeigte sich, dass nur die E70-mutierten feA3C-a-Formen spezifische hochmolekulare Ubiquitinierungsbanden aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen sind nötig um die Rolle von FFV-kodierten oder induzierten Faktoren für die Instabilität dieser feA3-Mutanten aufzuklären. Beispielsweise könnte dieser Versuch in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG132 wiederholt werden, um die Instabilität der feA3C-a Mutanten auf ihren proteasomalen Abbau zurückführen zu können. Die bereits vorliegenden Ergebnisse deuten auch auf eine verminderte Verpackung der feA3-Mutanten in Bet-defiziente FFV-Partikel hin, mit der dann entsprechend eine weitere Suppression der antiviralen Aktivität einhergeht.

Um diesen Hinweis nachzugehen, wurden Proteininteraktionsstudien mit FFV-Gag und den feA3C-a-Mutanten sowie wt feA3C-a durchgeführt (Abschnitt 4.7.3). Dabei wurde gezeigt, dass die E70-Mutante sowie die Doppelmutante nicht mit FFV-Gag interagiert, während Interaktionen mit wt feA3C-a sowie mit der C72S-Mutante klar detektierbar waren. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die katalytisch wichtige AS E70 für die Interaktion mit FFV-Gag eine essentielle Rolle spielt. In Analogie dazu steht auch das Ergebnis der Verpackungsstudien der feA3C-Formen in Bet defiziente FFV-Partikel: feA3C-a E70Q sowie die Doppelmutante werden nicht in Bet-defiziente Viruspartikel verpackt. Andererseits zeigt dieses Experiment eine Verpackung von wt feA3C-a und der C72-Mutante. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der FFV-Gag-Interaktion mit wt feA3C-a und den Mutanten. Unklar ist bislang, weshalb die C72-Mutante ebenfalls keine antivirale Aktivität gegen Bet-defizientes FFV zeigt, obwohl es mit FFV-Gag interagiert und in die entsprechenden Virionen inkorporiert wird. Weitere Studien der feA3C-a-Mutanten mit feline Retroviren sind notwendig, um Aufschluss über ihre Stabilität und die Notwendigkeit des katalytischen Zentrums für die antivirale Aktivität zu gewinnen.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass das katalytische E sowohl für die antivirale Aktivität des feA3C-a ist, als auch für die Interaktion mit Gag und die Verpackung in Virionen essentiell ist.

5.5 Charakterisierung eines chimären pCF7-Vif-Vektors

Die Ergebnisse der vorangegangenen *in vitro*-Experimente zeigten, dass FIV-Vif nach Transkomplementierung den protektiven Effekt von FFV-Bet in Bet-defizientem FFV ersetzen kann (Abschnitt 4.3.1-4.3.3). In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob ein genomischer Austausch von *FFV-bet* durch *FIV-vif* innerhalb des Virusgenoms den viralen Titer gleichermaßen vor endogenem feA3 in CrFK-Zellen schützt (Abschnitt 4.8). Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu ein chimäres pCF7-Vif-Konstrukt entwickelt, das durch partielle Deletion der *bet* 2-Region und anschließender Fusion des *FIV-vif*-Gens an dem C-Terminus des *bet*-Gens hergestellt wurde. Zwischen dem C-Terminus von *bet* und dem N-Terminus von *FIV-vif* wurde eine Protease-Schnittstelle eingefügt, die zu einer Abtrennung des FIV-vif-Proteins vom C-Terminus des Bet-Proteins nach Translation führen soll.

Die Analyse der Expression des Vif-Proteins im pCF7-Vif-Genom zeigte, dass Vif nach Transfektion in 293T-Zellen hauptsächlich in ungeschnittener Form vorlag, demnach als chimäres Bet^{tr}-Vif exprimiert wurde. Nur ein geringer Anteil der exprimierten Vif-Proteine wurde geschnitten und lag daher in nativer Form vor (Abschnitt 4.8.1). Die von uns eingefügte Protease-Schnittstelle zwischen dem N-Terminus von *bet* und dem C-Terminus von *FIV-vif* erwies sich demnach als nicht ausreichend für eine effiziente Freisetzung von authentischen FIV-Vif-Proteinen. Dies kann auch den im Vergleich zu wt FFV geringeren viralen Titer erklären, der in der ersten Passage der CrFK-Zellen um 1,5- bzw. nach zwei Passagen um 2-Zehnerpotenzen niedriger liegt. Der Abfall des Titers des FFV-Vif in der ersten Passage im

Vergleich zur zweiten Passage ist mit der Expression der endogenen feA3-Proteine in den CrFK-Zellen zu erklären. Diese sind antiviral aktiv gegen das FFV-Vif, das durch den ineffizienten Schnitt an der Protease-Schnittstelle nur schwach funktionelles FIV-Vif exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Insertion eines *FIV-Vif*-Gens mit vorgeschalteter Protease-Schnittstelle in einen *pCF7BetMCS*-Vektor und die daraus resultierende Inhibition der *Bet 2/Bet*-Expression einen stabilen Titer gewährleistet, der jedoch im Vergleich zu wt FFV um bis zu 3 Zehnerpotenzen niedriger ist.

Untersuchungen der antiviralen Aktivitäten der drei feA3-Hauptformen gegen FFV-Vif zeigten, dass nur feA3C-a den viralen Titer um mehr als eine Zehnerpotenz supprimiert (Abschnitt 4.8.1). Der virale Titer des chimären FFV-Vif wird von feA3C-a schwächer supprimiert im Vergleich zur antiviralen Aktivität von feA3C-a gegen FFVBetMCS, dessen Titer um 3 Zehnerpotenzen supprimiert wurde. Das wt *Bet* ist in der Inhibition von feA3C-a effizienter als das chimäre *Bet^{tr}*-Vif. Das von FFV-Vif exprimierte *Bet^{tr}*-Vif-Protein wirkt suppressiv gegen feA3C-a, wird aber, wie bereits besprochen, nur im geringen Umfang geschnitten. Daher ist nur ein geringer Anteil der exprimierten Vif-Proteine korrekt gefaltet und katalytisch aktiv.

Da es für weiterführende Anwendungen des *pCF7-Vif*-Vektors hinsichtlich einer möglichen Anwendung als therapeutischen Vektor von Interesse war, dessen langfristige Stabilität in CrFK-Zellen zu untersuchen und gegebenenfalls zu erhöhen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Langzeitpassagierung des *pCF7-Vif*-Vektors im Vergleich zu wt FFV durchgeführt (Abschnitt 4.8.2). Das Verschwinden der ungeschnittenen Vif-Bande von 39,9 kDa nach sieben Passagen und die dafür auftretende Doppelbande von 32 bzw. 30 kDa korreliert mit dem Titeranstieg von FFV-Vif relativ zu wt FFV. Untersuchungen der viralen DNA aufgereinigter FFV-FIV-Partikel aus den späten Passagen zeigten, dass diese im Vergleich zu den frühen Passagen eine signifikante Häufung von wahrscheinlich feA3C-induzierten Mutanten (G→A-Austausche) aufwiesen. Bei den später auftretenden Mutationen waren präferentiell die Codons von Tryptophan-X-Asparagin innerhalb des *Bet* betroffen, das durch zwei unabhängige Mutationen von TGG zu den Stopp TAG und TGA verändert wurde (Abschnitt 4.8.3). Die Tatsache, dass sich dieser Hotspot kurz vor dem Vif-Start-Methionin befindet, ist eine mögliche Erklärung für die erhöhte Expression des Vif-Proteins und wurde auch in weiterführenden Mutationsstudien bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch einen konstanten natürlichen Selektionsdruck, hervorgerufen durch die Expression der endogenen feA3C-Proteine in CrFK-Zellen der virale Abwehrmechanismus von des *Bet*-Vif-Fusionsproteins zunächst schwach war. Durch akkumulierte Mutationen im *pCF7-Vif*-Vektor, wurde die Expression des katalytisch aktiven, authentischen FIV-Vif-Proteins begünstigt und somit die virale Abwehr gestärkt. Mit diesen Erkenntnissen kann so ein therapeutischer Vektor entwickelt werden. Dieser basiert auf einem chimären *pCF7-Vif*-Vektor mit optimierter Protease-Schnittstelle und verfügt somit über einen effizienten protektiven Mechanismus gegen Proteine der angeborenen Immunabwehr. Des Weiteren kann dieser chimäre *pCF7-Vif*-Vektor als Grundlage für eine Vakzinierungsstrategie gegen FIV dienen. Dieser verbindet die Apatogenität des FFV und den effizienten Abwehrmechanismus des FIV-Vif-Proteins.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Analyse der genomischen APOBEC3-Region der Hauskatze (*F. catus*) ergab, dass sich die chromosomale APOBEC3-Loci von Primaten, Nagetieren und Hunden wesentlich unterscheiden (Münk et al., 2008). Drei Kopien des *feA3C*-Genes wurden auf dem Chromosom B4 lokalisiert. Sie codieren für drei *feA3C*-Isoformen, die sich in 6 bzw. 7 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Neben dem Nachweis von drei sehr ähnlichen *feA3C*-Genen und einem *feA3H*-Gen wird post-transkriptionell durch alternatives Spleißen ein zwei-Domänen *feA3CH*-Protein als Fusionsgen gebildet. Diese *feA3*-Proteinfamilie bildet als Teil der angeborenen Immunantwort einen entscheidenden antiviralen Abwehrmechanismus und inhibiert die Replikation Bet-defizienten feline Foamyvirus sowie Vif-defizienten Katzenimmundefizienzvirus.

Ein elementarer Bestandteil der Arbeit war die Untersuchung der Expression endogener *feA3*-Proteine in Katzenzellen sowie die Analyse ihrer antiviralen Aktivität und der Interaktion mit foamyviralen Bet- und Gag-Proteinen. Die Expression des zwei-Domänen *feA3CH*-Proteins wurde in CrFK- und Mya-Zellen nachgewiesen, während *feA3C*- und -H-Proteine nur in CrFK-Zellen nachweisbar waren. Die spezifische antivirale Aktivität der einzelnen *feA3*-Hauptformen gegen Bet-deletiertes FFV sowie ihre Interaktionen mit FFV-Bet und FIV-Vif zeigen, dass Vif die proteasomale Degradation aller *feA3s* induziert während Bet lediglich an alle *feA3*-Proteine bindet. Die Bet-*feA3*-Komplexbildung inhibiert die Inkorporation der *feA3C* und -CH-Proteine in FFV-Partikel. Dabei korreliert die Interaktion der C-Domäne der *feA3*-Formen mit FFV-Gag mit der Inkorporation in Virionen Bet-defizienter FFV-Genome. Offen ist ob Bet die Komplexbildung mit *feA3* sequestriert, die Gag-*feA3*-Bindungsstelle maskiert oder der Nicht-Inkorporationsphänotyp von Bet auf das gebundene *feA3* übertragen wird. Ein intaktes strukturelles Zentrum von *feA3C-a* ist essentiell für den antiviralen Effekt während die Veränderung des katalytischen Zentrums die Inkorporation verhindert. Sowohl die Mutation des katalytischen Zentrums als auch einer strukturell wichtigen Aminosäure im *feA3C-a* haben einen Verlust der antiviralen Aktivität gegen Bet-defizientes FFV zur Folge. Die Aminosäuren des katalytischen Zentrums von *feA3C-a* sind für die Interaktion mit FFV-Gag essentiell.

Die funktionelle Komplementarität der viralen Abwehrfaktoren Bet und Vif zur Wiederherstellung des foamyviralen Titers führten zur Konstruktion eines chimären *pCF7-Vif*-Vektors, der durch *in vitro*-Selektion optimiert wurde. Durch seinen stabilen Titer in seriellen Langzeitpassagen bildet dieser Vektor eine geeignete Grundlage für die Entwicklung eines Vakzinevirus gegen FIV.

In dieser Arbeit wurde der foamyvirale Abwehrmechanismus gegen ein Protein der angeborenen Immunantwort auf molekularer Ebene aufgeklärt. Aufbauend auf diesen funktionellen Grundlagenstudien wurde ein chimäres Vakzinevirus entwickelt, das das FIV-Vif-Immunogen und (weitere Antigene) im Kontext des apathogenen FFV Vektorgenoms exprimieren kann.

7 Literatur

- Alke, A., Schwantes, A., Kido, K., Flotenmeyer, M., Flugel, R. M., and Lochelt, M. (2001). The bet gene of feline foamy virus is required for virus replication. *Virology* **287**(2), 310-20.
- Alke, A., Schwantes, A., Zemba, M., Flugel, R. M., and Lochelt, M. (2000). Characterization of the humoral immune response and virus replication in cats experimentally infected with feline foamy virus. *Virology* **275**(1), 170-6.
- Baldwin, D. N., and Linial, M. L. (1998). The roles of Pol and Env in the assembly pathway of human foamy virus. *J Virol* **72**(5), 3658-65.
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., and Malim, M. H. (2006). Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol* **80**(17), 8450-8.
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., Davidson, N. O., Cho, S. J., and Malim, M. H. (2004). Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* **14**(15), 1392-6.
- Bodem, J., Lochelt, M., Yang, P., and Flugel, R. M. (1997). Regulation of gene expression by human foamy virus and potentials of foamy viral vectors. *Stem Cells* **15 Suppl 1**, 141-7.
- Burkhard MJ, D. G. (2003). Transmission and immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. *Curr HIV Res* **1**, 15-29.
- Caudevilla, C., Serra, D., Miliar, A., Codony, C., Asins, G., Bach, M., and Hegardt, F. G. (1998). Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21), 12185-90.
- Chen, H. (2006). APOBEC3A is a potent inhibitor of adenoassociated virus and retrotransposons. *Curr. Biol.* **16**, 480-485.
- Chiu, Y. L., and Greene, W. C. (2006). Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends Immunol* **27**(6), 291-7.
- Cho, D. S., Yang, W., Lee, J. T., Shiekhatar, R., Murray, J. M., and Nishikura, K. (2003). Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA. *J Biol Chem* **278**(19), 17093-102.
- Conticello, S. G., Thomas, C. J., Petersen-Mahrt, S. K., and Neuberger, M. S. (2005). Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* **22**(2), 367-77.
- Cullen, B. R. (2006). Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J. Virol.* **80**, 1067-1076.
- Dang, Y. (2006). Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J. Virol.* **80**, 10522-10533.
- Delebecque, F., Suspene, R., Calattini, S., Casartelli, N., Saib, A., Froment, A., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Vartanian, J. P., and Schwartz, O. (2006). Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* **80**(2), 605-14.
- Delelis, O., Lehmann-Che, J., and Saib, A. (2004). Foamy viruses--a world apart. *Curr Opin Microbiol* **7**(4), 400-6.
- Derse D, H. S., Princler G, Lloyd P, Heidecker G (2007). Resistance of human T cell leukemia virus type 1 to APOBEC3G restriction is mediated by elements in nucleocapsid. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2915-2920.
- Doehle, B. P. (2005). Differential sensitivity of murine leukemia virus to APOBEC3-mediated inhibition is governed by virion exclusion. *J. Virol.* **79**, 8201-8207.
- Ennsle, J., Moebes, A., Heinkelein, M., Panhuysen, M., Mauer, B., Schweizer, M., Neumann-Haefelin, D., and Rethwilm, A. (1999). An active foamy virus integrase is required for virus replication. *J Gen Virol* **80 (Pt 6)**, 1445-52.
- Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A. J., Heidmann, T., and Schwartz, O. (2005). APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* **433**(7024), 430-3.

- Esnault, C., Millet, J., Schwartz, O., and Heidmann, T. (2006). Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res* **34**(5), 1522-31.
- Gabuzda, D. H. (1992). Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**, 6489-6495.
- Gallois-Montbrun, S., Kramer, B., Swanson, C. M., Byers, H., Lynham, S., Ward, M., and Malim, M. H. (2007). Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol* **81**(5), 2165-78.
- Goepfert, P. A., Shaw, K., Wang, G., Bansal, A., Edwards, B. H., and Mulligan, M. J. (1999). An endoplasmic reticulum retrieval signal partitions human foamy virus maturation to intracytoplasmic membranes. *J Virol* **73**(9), 7210-7.
- Hache, G., Liddament, M. T., and Harris, R. S. (2005). The retroviral hypermutation specificity of APOBEC3F and APOBEC3G is governed by the C-terminal DNA cytosine deaminase domain. *J Biol Chem* **280**(12), 10920-4.
- Harris, R. S. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**, 803-809.
- Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S., and Malim, M. H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**(6), 803-9.
- Heneine, W., Schweizer, M., Sandstrom, P., and Folks, T. (2003). Human infection with foamy viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **277**, 181-96.
- Holmes, R. K., Malim, M. H., and Bishop, K. N. (2007). APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* **32**(3), 118-28.
- Holmes RK, M. M., Bishop KN (2007). APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci.* **32**, 118-28.
- Huthoff, H., and Malim, M. H. (2005). Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology* **334**(2), 147-53.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., and Navaratnam, N. (2002). An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* **79**(3), 285-96.
- Kaiser, S. M., Emerman, M. (2006). Uracil DNA glycosylase is dispensable for human immunodeficiency virus type 1 replication and does not contribute to the antiviral effects of the cytidine deaminase Apobec3G. *J. Virol.* **80**, 875-882.
- Kao, S. (2003). The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J. Virol.* **77**, 11398-11407.
- Khan, M. A., Kao, S., Miyagi, E., Takeuchi, H., Goila-Gaur, R., Opi, S., Gipson, C. L., Parslow, T. G., Ly, H., and Strebel, K. (2005). Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol* **79**(9), 5870-4.
- Kobayashi, M., Takaori-Kondo, A., Shindo, K., Abudu, A., Fukunaga, K., and Uchiyama, T. (2004). APOBEC3G targets specific virus species. *J Virol* **78**(15), 8238-44.
- Lecellier, C. H., and Saib, A. (2000). Foamy viruses: between retroviruses and pararetroviruses. *Virology* **271**(1), 1-8.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., and Hance, A. J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**(5622), 1112.
- Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* **8**(10), 397-403.
- Liddament MT, B. W., Schumacher AJ, Harris RS. (2004). APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* **14**(15), 1385-91.
- Linial, M. L. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol* **73**(3), 1747-55.
- Löchelt, M., Romen, F., Bastone, P., Muckenfuss, H., Kirchner, N., Kim, Y. B., Truyen, U., Rosler, U., Battenberg, M., Saib, A., Flory, E., Cichutek, K., and Munk, C. (2005). The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(22), 7982-7.

- Löchelt, M., Yu, S. F., Linial, M. L., and Flugel, R. M. (1995). The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity. *Virology* **206**(1), 601-10.
- Lockridge, K. M., Himathongkham, S., Sawai, E. T., Chienand, M., and Sparger, E. E. (1999). The feline immunodeficiency virus vif gene is required for productive infection of feline peripheral blood mononuclear cells and monocyte-derived macrophages. *Virology* **261**(1), 25-30.
- Luo, K., Xiao, Z., Ehrlich, E., Yu, Y., Liu, B., Zheng, S., and Yu, X. F. (2005). Primate lentiviral virion infectivity factors are substrate receptors that assemble with cullin 5-E3 ligase through a HCCH motif to suppress APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32), 11444-9.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**(6944), 99-103.
- Mariani, R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**, 21-31.
- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., König, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N. R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**(1), 21-31.
- Marin, M. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med* **9**, 1398-1403.
- Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M., and Gabuzda, D. (2004). Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **279**(9), 7792-8.
- Mehle, A., Thomas, E. R., Rajendran, K. S., and Gabuzda, D. (2006). A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J Biol Chem* **281**(25), 17259-65.
- Meiering, C. D., Comstock, K. E., and Linial, M. L. (2000). Multiple integrations of human foamy virus in persistently infected human erythroleukemia cells. *J Virol* **74**(4), 1718-26.
- Mergia, A., and Heinkelein, M. (2003). Foamy virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* **277**, 131-59.
- Miyagi, E., Opi, S., Takeuchi, H., Khan, M., Goila-Gaur, R., Kao, S., and Strebel, K. (2007). Enzymatically active APOBEC3G is required for efficient inhibition of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **81**(24), 13346-53.
- Moebes, A., Enssle, J., Bieniasz, P. D., Heinkelein, M., Lindemann, D., Bock, M., McClure, M. O., and Rethwilm, A. (1997). Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J Virol* **71**(10), 7305-11.
- Münk, C., Beck, T., Zielonka, J., Hotz-Wagenblatt, A., Chareza, S., Battenberg, M., Thielebein, J., Cichutek, K., Bravo, I. G., O'Brien, S. J., Lochelt, M., and Yuhki, N. (2008). Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline APOBEC3 genes. *Genome Biol* **9**(3), R48.
- Münk, C., Zielonka, J., Constabel, H., Kloke, B. P., Rengstl, B., Battenberg, M., Bonci, F., Pistello, M., Lochelt, M., and Cichutek, K. (2007). Multiple restrictions of human immunodeficiency virus type 1 in feline cells. *J Virol* **81**(13), 7048-60.
- Nemo, G. J., Brown, P. W., Gibbs, C. J., Jr., and Gajdusek, D. C. (1978). Antigenic relationship of human foamy virus to the simian foamy viruses. *Infect Immun* **20**(1), 69-72.
- Newman, E. N., Holmes, R. K., Craig, H. M., Klein, K. C., Lingappa, J. R., Malim, M. H., and Sheehy, A. M. (2005). Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol* **15**(2), 166-70.
- Niewiadomska, A. M., Tian, C., Tan, L., Wang, T., Sarkis, P. T., and Yu, X. F. (2007). Differential inhibition of long interspersed element 1 by APOBEC3 does not correlate with high-molecular-mass-complex formation or P-body association. *J Virol* **81**(17), 9577-83.
- Noguchi, C. (2005). G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* **41**, 626-633.
- Nowrouzil A, R. M., Heinkelein M, Klanke C, Schmidt M, von Kalle C, Rethwilm A. Inverse (2004). Inverse PCR für sequencing of foday virus integration sites. *5th International Foamy Virus Conference, Würzburg, Germany, July 9-11, .*
- O'Brien SJ, M.-R. M., Murphy WJ, Yuhki N (2002). The Feline Genome Project. *Annu Rev Genet* **36**, 657-686.

- OhAinle, M., Kerns, J. A., Malik, H. S., and Emerman, M. (2006). Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. *J Virol* **80**(8), 3853-62.
- Opi S, T. H., Kao S, Khan MA, Miyagi E, Goila-Gaur R, Iwatani Y, Levin JG, Strebel K. (2006). Monomeric APOBEC3G is catalytically active and has antiviral activity. *J Virol.* **80**(10), 4673-82.
- Paul, T. A., Casey, J. W., Avery, R. J., and Sutton, C. A. (2007). Expression of feline immunodeficiency virus Vif is associated with reduced viral mutation rates without restoration of replication of vif mutant viruses. *Virology* **361**(1), 112-22.
- Peters, K., Wiktorowicz, T., Heinkelein, M., and Rethwilm, A. (2005). RNA and protein requirements for incorporation of the Pol protein into foamy virus particles. *J Virol* **79**(11), 7005-13.
- Prochnow, C., Bransteitter, R., Klein, M. G., Goodman, M. F., and Chen, X. S. (2007). The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID. *Nature* **445**(7126), 447-51.
- Rose, K. M. (2005). Regulated production and anti-HIV type 1 activities of cytidine deaminases APOBEC3B, 3F, and 3G. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 611-619.
- Rosler, C., Kock, J., Kann, M., Malim, M. H., Blum, H. E., Baumert, T. F., and von Weizsacker, F. (2005). APOBEC-mediated interference with hepadnavirus production. *Hepatology* **42**(2), 301-9.
- Russell, R. A., and Pathak, V. K. (2007). Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* **81**(15), 8201-10.
- Russell, R. A., Vassaux, G., Martin-Duque, P., and McClure, M. O. (2004). Transient foamy virus vector production by adenovirus vectors. *Gene Ther* **11**(3), 310-6.
- Russell, R. A., Wiegand, H. L., Moore, M. D., Schafer, A., McClure, M. O., and Cullen, B. R. (2005). Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J Virol* **79**(14), 8724-31.
- Sawyer SL, E. M., Malik HS: (2004). Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* **2**:E275.
- Sawyer, S. L., Emerman, M., and Malik, H. S. (2004). Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* **2**(9), E275.
- Schmidt, M., and Rethwilm, A. (1995). Replicating foamy virus-based vectors directing high level expression of foreign genes. *Virology* **210**(1), 167-78.
- Schumacher AJ, N. D., Harris RS. (2005). APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 9854-9.
- Schumann, G. (2007). APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem Soc Trans.* **35**, 637-42.
- Schwantes, A., Ortlepp, I., and Lochelt, M. (2002). Construction and functional characterization of feline foamy virus-based retroviral vectors. *Virology* **301**(1), 53-63.
- Schwantes, A., Truyen, U., Weikel, J., Weiss, C., and Lochelt, M. (2003). Application of chimeric feline foamy virus-based retroviral vectors for the induction of antiviral immunity in cats. *J Virol* **77**(14), 7830-42.
- Shacklett, B. L., and Luciw, P. A. (1994). Analysis of the vif gene of feline immunodeficiency virus. *Virology* **204**(2), 860-7.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., and Malim, M. H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**(11), 1404-7.
- Shindo, K., Takaori-Kondo, A., Kobayashi, M., Abudu, A., Fukunaga, K., and Uchiyama, T. (2003). The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. *J Biol Chem* **278**(45), 44412-6.
- Shirakawa, K., Takaori-Kondo, A., Kobayashi, M., Tomonaga, M., Izumi, T., Fukunaga, K., Sasada, A., Abudu, A., Miyauchi, Y., Akari, H., Iwai, K., and Uchiyama, T. (2006). Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. *Virology* **344**(2), 263-6.
- Simon, J. H. a. M., M.H. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. *J. Virol.* **70**, 5297-5305.

- Simpson, L. (1999). RNA editing – an evolutionary perspective. In *The RNA World* (2nd edn) (Gesteland, R.F. et al., eds). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 585-608.
- Stopak, K. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* **12**(591-601).
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W., and Greene, W. C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**(3), 591-601.
- Stopak, K. a. G., W.C. (2005). Protecting APOBEC3G: a potential new target for HIV drug discovery. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **6**, 141-147.
- Suspene, R. (2005). Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8321-8326.
- Suspène R, S. P., Henry M, Ferris S, Guétard D, Pochet S, Chester A, Navaratnam N, Wain-Hobson S, Vartanian J (2004). APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* **32**(8), 2421-9.
- Svarovskaia, E. S. (2004). Human apolipoprotein B mRNA editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J. Biol. Chem.* **279**, 35822–35828.
- Takahara, T., Tasic, B., Maniatis, T., Akanuma, H., and Yanagisawa, S. (2005). Delay in synthesis of the 3' splice site promotes trans-splicing of the preceding 5' splice site. *Mol Cell* **18**(2), 245-51.
- Tomonaga, K., Norimine, J., Shin, Y. S., Fukasawa, M., Miyazawa, T., Adachi, A., Toyosaki, T., Kawaguchi, Y., Kai, C., and Mikami, T. (1992). Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *J Virol* **66**(10), 6181-5.
- Trobridge, G., Josephson, N., Vassilopoulos, G., Mac, J., and Russell, D. W. (2002). Improved foamy virus vectors with minimal viral sequences. *Mol Ther* **6**(3), 321-8.
- Trobridge, G., and Russell, D. W. (2004). Cell cycle requirements for transduction by foamy virus vectors compared to those of oncovirus and lentivirus vectors. *J Virol* **78**(5), 2327-35.
- von Schwedler, U. (1993). Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* **67**, 4945-4955.
- Wiegand, H. L. (2004). A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J.* **23**, 2451-2458.
- Wilk, T., de Haas, F., Wagner, A., Rutten, T., Fuller, S., Flugel, R. M., and Lochelt, M. (2000). The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer. *J Virol* **74**(6), 2885-7.
- Wu X, L. Y., Crise B, Burgess SM (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**, 1749-51.
- Xiao, Z., Ehrlich, E., Luo, K., Xiong, Y., and Yu, X. F. (2007). Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G. *Faseb J* **21**(1), 217-22.
- Yang, Y., Guo, F., Cen, S., and Kleiman, L. (2007). Inhibition of initiation of reverse transcription in HIV-1 by human APOBEC3F. *Virology* **365**(1), 92-100.
- Yu, Q. (2004). Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 435-442.
- Yu Q, C. D., König R, Mariani R, Unutmaz D, Landau NR. (2004). APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem.* **279**, 53379-86.
- Yu, Q., Chen, D., König, R., Mariani, R., Unutmaz, D., and Landau, N. R. (2004). APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem* **279**(51), 53379-86.
- Yu, S. F., Sullivan, M. D., and Linial, M. L. (1999). Evidence that the human foamy virus genome is DNA. *J Virol* **73**(2), 1565-72.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X. F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**(5647), 1056-60.

- Yu X, Y. Y., Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**, 1056-60.
- Yuhki, N., Beck, T., Stephens, R. M., Nishigaki, Y., Newmann, K., and O'Brien, S. J. (2003). Comparative genome organization of human, murine, and feline MHC class II region. *Genome Res* **13**(6A), 1169-79.
- Zennou, V., and Bieniasz, P. D. (2006). Comparative analysis of the antiretroviral activity of APOBEC3G and APOBEC3F from primates. *Virology* **349**(1), 31-40.
- Zennou, V., Perez-Caballero, D., Gottlinger, H., and Bieniasz, P. D. (2004). APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **78**(21), 12058-61.
- Zhang, H. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**, 94-98.
- Zhang, J., and Webb, D. M. (2004). Rapid evolution of primate antiviral enzyme APOBEC3G. *Hum Mol Genet* **13**(16), 1785-91.
- Zheng, Y. H., Irwin, D., Kurosu, T., Tokunaga, K., Sata, T., and Peterlin, B. M. (2004). Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* **78**(11), 6073-6.