

Identifizierung einer Rezeptorbindestelle im
Hüllprotein des Humanen Endogenen Retrovirus
K(HML-2) und weitergehende Analysen der
Interaktion des Hüllproteins mit zellulären
Rezeptoren

vorgelegt von

Dipl.-Ing.

Jula Wamara

an der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Ingenieurwissenschaften

- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachterin: Prof. Dr.-Ing. Vera Meyer

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert

Gutachter: Prof. Dr. Jens Kurreck

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 16. Dezember 2019

Berlin 2020

Angefertigt am Robert Koch Institut
Unter der Betreuung von Prof. Dr. Norbert Bannert

Oktober 2013 bis Juni 2017

Eidstaatliche Erklärung

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und eigenhändig sowie ohne unerlaubte fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die selbständige und eigenständige Anfertigung versichert an Eides statt:
Berlin, den

.....
Unterschrift

Danksagung

Danksagung

Diese Arbeit ist in einer sehr schwierigen Zeit meines Lebens entstanden. Ich danke all den Menschen, die mir beistanden und mich immer wieder ermutigt haben, trotz all den Herausforderungen und Hindernissen, diese Arbeit fortzuführen und nicht aufzugeben. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht entstanden. Vielen Dank.

Danke dem FG18 (Robert Koch Institut), insbesondere Prof. Dr. Norbert Bannert für die Möglichkeit, im Fachgebiet das Projekt durchführen zu dürfen. Ein großer Dank geht an Frau Gabi Bey für die freundliche und unterstützende Art, Dr. Daniel Ivanovic, Dr. Norley Steve+, Dr. Kirsten Hanke, Dr. Oliver Hohn für viele Tipps und wertvolle Ratschläge.

Frau Prof. Dipl.-Ing. Vera Meyer ein besonderer Dank für die kräftige Unterstützung, und viele konstruktive Ratschläge während der Realisierung dieses Vorhabens sowie die Möglichkeit der Promotion an der Technischen Universität Berlin.

Vielen Dank an die Organisation DWITECH-HFWF für die finanzielle Unterstützung während der Durchführung dieses Projekts.

Meiner Familie danke ich vom ganzen Herzen. Danke für die Liebe, die Geduld, das Rückenstärken und dass Ihr nicht aufgehört habt, mich zu tragen.

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Beziehung zwischen den Retroviren.....	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Retrovirus am Beispiel von HIV-1.....	19
Abbildung 3: Phylogenetische Klassifizierung von humanen endogenen Viren und anderen Retroviridae nach Tristem.....	20
Abbildung 4: Dendrogramm zur phylogenetischen Klassifizierung von HERV nach Jern.....	22
Abbildung 5: Genomische strukturelle Organisation des HERV-K(HML-2)- Provirus und der davon codierten Transkripte.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Biosynthese von Env am Beispiel von HIV.....	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Betaretrovirus.....	30
Abbildung 8: HML-2-Env Sequenzstruktur.....	32
Abbildung 9: Optimierung des Verhältnisses zwischen den Konstrukten für die Produktion von HIV-basierten Viren.....	80
Abbildung 10: Optimierung der HML-2-Env-DNA-Menge für die Herstellung von Virus-Like- Partikeln.....	82
Abbildung 11: Optimierung der Virusproduktion in 293T.....	83
Abbildung 12: Transduktion von HML-2-Env-HIV-Pseudotypen in CrFK.....	84
Abbildung 13: Sequenz-Alignierung von Env von MMTV und HML-2 sowie Expressionskontrolle und Kontrolle des Einbaus in VLP der Env- Mutanten D139A und D144- 152 und Transduktionsversuche mit CrFK-Zellen.....	87-88
Abbildung 14: Die im Virus eingebaute Deletionsmutante Δ 144-152-Env kompetiert nicht mit dem Wildtyp-Env um die Rezeptorbindung.....	91
Abbildung 15: Die N-Glykosylierungsmutanten von HML-2-Env, N128A und N153A sowie die AAR-Mutante EEE146-148AAA.....	93
Abbildung 16: Die N-Glykosylierungsmutanten N128A und N153A sowie die AAR- Mutante ¹⁴⁶ AAA ¹⁴⁸ vermitteln keinen Virus-Eintritt.....	95

Abbildung 17: Schematische Darstellung des Sequenzvergleichs zwischen HML-2-Env und MMTV-Env und deren Chimären KenvCIP- und KenvN-MMTV.....	96
Abbildung 18: Vergleich der Primärsequenz innerhalb der Ectodomäne von HERV-K(HML- 2)-Env mit der von den verwandten MMTV und JSRV.....	97
Abbildung 19: Expressionsnachweis von MMTV-Env, HML-2-Env-OriCo Env, der Mutante Δ 659-699 sowie den Chimären K-N-MMTV und K-CIP-MMTV.....	98
Abbildung 20: Versuch zur Überexpression von mTrfR1 und Transduktion von MMTV- Env-, K-N-MMTV und K-CIP-MMTV-HIV in SKMel 28.....	100
Abbildung 21: Überexpression von mTrfR1 und Transduktion von MMTV-Env-, K-N- MMTV- und K-CIP-MMTV- HIV-VLP in CrFK und 293T.....	102
Abbildung 22: Fehlende Detektion der Expression des viralen Reporter-Gens GFP bei HML-2-Permissiven Zellen.....	104
Abbildung 23: Überexpression von HML-2-Env und Transduktion von HML-2- Env- VLP.....	106
Abbildung 24: Versuch zur Minimierung vom Hintergrundsignal von anti-human-IgG für die späteren Bindungs-Assays.....	108
Abbildung 25: Expressionsnachweis von HML-2-SU- und XMRV-SU-h-Fc (NSU-h-Fc) in 293T-Zellen.....	111
Abbildung 26: XMRV-Env-V5-HIV-VLPs können an die humanen Zelllinien DU145 und A549 adhären.....	112
Abbildung 27: 293T- und A549-Zellen sind gut transduzierbar mit XMRV-Env- HIV-VLP.....	114
Abbildung 28: HIV-VLP, die mit dem XMRV-Env pseudotypisiert sind, können DU145- Zellen in einer Dosis-abhängigen Weise transduzieren.....	115
Abbildung 29: SKMel28- Zellen werden erfolgreich und dosisabhängig durch HIV-VLP, die mit dem XMRV-Env pseudotypisiert sind.....	116
Abbildung 30: Das Chimärprotein NSU-h-Fc kompetiert mit XMRV-Env- Basierten VLPs um den zellulären Rezeptor in DU145-Zellen.....	119
Abbildung 31: Immunfluoreszenz-Detektion der Bindung von HML-2-SU-Fc auf adhärenente CrFK.....	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 32: A: Aufgereinigte HML-2-SU-h-Fc. Nachweis der Proteine mittels Westernblot mit anti-h-IgG. B: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der intrazellulären Expression von HML-2-SU-h-Fc. C: Verdünnungsreihe von HML-2-SU-h-Fc.....	122
Abbildung 33: Konkurrenz zwischen HML-2-SU-h-Fc und HML-2-Env-Pseudotypen.....	124
Abbildung 34: Konkurrenz von Chimärproteinen HML-2-SU-FC und Del144-152-Fc mit HML- 2-Env-HIV-VLPS.....	125
Abbildung 35: DotBlot von Zelllysaten zum Nachweis HML-2-Envgp42-reaktiver Proteine.....	127
Abbildung 36: Pulldown von Oberflächen-Glykoproteinen, die mit HML-2-SU-h-Fc reagieren.....	130

2. Abkürzungen

AARs: amino acid repeats

ALS: Amyotrophe Lateralsklerose.

ATB: Amino acid transporter

Bzw: Beziehungsweise

Bp: Basenpaar

BCA: Bradford- Concentration-Assay

bNAbs: Broadly neutralising antibodies

Ca.: Circa

CAMs: Cell adhesion molecules

cDNA: complementary DNA

CI: Konfidenzintervall (Confidence interval)

CS: Cleavage site

DDM: n-Dodecyl- β -D- Maltoside

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA: Deoxyribonucleotid acid

DNase: Desoxynuclease

ds: Doppelsträngig

dsDNA: Doppelsträngige DNA

EGFP: Enhanced green fluorescence protein)

ER: Endoplasmatisches Retikulum

EtBr: Ethidiumbromid

Fuc: Fucose

G: Glycosylation site

Gag: Group-specific antigen

GFP: Grün-Fluoreszierendes Protein

gDNA: genomische DNA

Glc: Glucose

GalNAc: N-Acetylgalactosamin

GlcNAc: N-Acetylglucosamin

h-Fc: Human fragment crystallizable

HERV: Humane Endogene Retroviren

Abkürzungsverzeichnis

HFE: High Iron Fe

HML-2: Human mouse mammary tumor virus like-2

i.d.R: in der Regel

IgG: Immunglobulin G

kb: Kilobase

LB: Lysogeny Broth

LDL-R: Low-density lipoprotein receptor

LTR: Long terminal repeats

Man: Mannose

Mio.: Million

MPER: Membrane-proximal external region

mRNA: Messenger RNA

MSD: Membran spanning domain

Neu5Ac: N-Acetylneuramin

NP- 40: Nonidet-P40

Nr.: Nummer

Orico: Original codon-optimized

pfu/ml: plaque-forming units per milliliter

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

Pol: Polymerase

PolyA: Polyadenyliert

Pro: Protease

PTM: Posttranslationelle Modifikationen

RBS: Rezeptor-Bindungsstelle

RDR: Type D retrovirus receptor

rER: Raues endoplasmatisches Retikulum

RIN: RNA integrity number

RLU: Relative Light Units

RNA: Ribonucleotid acid

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

rRNA: Ribosomale RNA

tRNA: Transfer RNA

SDS: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide

Abkürzungsverzeichnis

SEREX: Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries.

SMART: switching mechanism at 5' end of RNA transcript

SP: Signal Peptid

ss: Einzelsträngig

ssDNA: single strang DNA

SOB: Super Optimal Broth

SU: Surface unit

TAA: Tumor Associated Antigen

TEMED: Tetramethylethylendiamin

TM: Transmembran

TrfR 1: Transferrin Rezeptor 1

UTR: Untranslated region

VF: Verdünnungsfaktor

VLP: Virus-Like-Particle

vRNA: Virale RNA

WT: Wildtyp

3. Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	5
2. Abkürzungen	8
3. Inhaltsverzeichnis.....	11
4. Einleitung	16
4.1. Viren und Retroviren.....	16
4.1.1. Viren	16
4.1.2. Die Familie der Retroviridae	17
4.1.3. Humane Endogene Retroviren (HERV).....	19
4.1.4. Das human-spezifische endogene Retrovirus HERV-K(HML-2)	22
4.1.5. Genomische Organisation von HERV-K(HML-2).....	23
4.1.6. Human-medizinische Bedeutung von HERV-K(HML-2)	24
4.2. Determinanten des Zelltropismus	25
4.2.1. Oberflächenproteine (Env) von behüllten Viren.....	25
4.2.2. Rezeptorproteine von Betaretroviren.....	32
5. Fragestellung	35
6. Material	36
6.1. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	36
6.2. Kits.....	40
6.3. Enzyme.....	41
6.4. Plasmide.....	42
6.5. Puffer und Zusammensetzung.....	44
6.5.1. Standards-Puffer.....	44
6.5.2. Puffer für den Westernblot.....	44
6.5.3. Puffer für Immunofluoreszenz-Anwendungen	44
6.5.4. Puffer für die Gelelektrophorese.....	45
6.5.5. Puffer für die Proteinaufreinigung	45
6.5.6. Weitere Puffer.....	45
6.5.7. Einfrierpuffer für Proteine.....	46
6.6. Antikörper	46
6.7. Bakterienstämme.....	47
6.8. Eukaryotische Zellen	47
6.9. Antibiotika	47
6.10. Nährmedien für die Bakterienkultur	48
	11

Inhaltsverzeichnis

6.11. Wachstumsmedien für eukaryotische Zellen	48
6.12. Geräte.....	49
7. Methoden	52
7.1. DNA-Analyse	52
7.1.1. Vervielfältigung von DNA-Abschnitten	52
7.1.2. Restriktionsverdau von DNA.....	52
7.1.3. Verdau mit einer Desoxynuclease (DNase).....	53
7.1.4. Aufreinigung von DNA	54
1. Gelextraktion von DNA	54
2. Aufreinigung von PCR-Produkten.....	55
3. Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA.....	55
4. Isolierung von Plasmid-DNA.....	55
7.1.5. Sequenzierung von DNA	55
7.1.6. Mutagenese-PCR	56
7.1.7. Site-Directed Mutagenesis.....	56
7.1.8. Fusion-PCR	57
7.1.9. Gradient-PCR	58
7.1.10. Ligation von DNA-Fragmenten	59
7.1.11. cDNA-Synthese	60
7.1.12. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	60
7.1.13. Agarose-Gelelektrophorese	60
7.2. Protein-Analytik	61
7.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	61
7.2.2. p24-ELISA	62
7.2.3. SDS-PAGE	63
7.2.4. Western blot.....	64
7.2.5. Fluoreszenz-Mikroskopie.....	65
1. Immunfärbung zur Detektion von Cytosolisch-exprimierten Proteinen.....	65
2. Konfokal- Fluoreszenz-mikroskopische Detektion von Immunadhäsion an Plasmamembran-Gebundenen Proteine	66
7.2.6. Durchflusszytometrie	67
1. Vorbereitung von eukaryotischen Zellen für die Detektion von intrazellulärer Fluoreszenz	67
2. Direktes Bindungs-Assay zur Detektion der Bindung von Immunadhäsion auf Plasmamembran-Gebundenen Proteine	68
3. Test auf Viabilität von Zellen.....	68

Inhaltsverzeichnis

7.2.7.	Biotinylierung von Plasmamembranproteinen	69
7.2.8.	Pulldown von Plasmamembranproteinen	70
	1. Invitro Crosslinking von HML-2h-Fc und nachfolgender Pulldown	70
	2. Biotinylierung von Plasmamembranproteinen und nachfolgender Pulldown von HML-2-h-Fc.....	71
7.2.9.	Puffer-Umtausch/ Proteinaufkonzentrierung.....	72
7.2.10.	Proteinaufreinigung mit Protein G-Beads	72
7.2.11.	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	73
7.3.	Zellkultur	73
7.3.1.	Einfrieren und Auftauen	73
7.3.2.	Zellzahlbestimmung.....	73
7.3.3.	Subkultivierung von adhärennten Zellen	74
7.3.4.	Transfektion von eukaryotischen Zellen	74
7.3.5.	Zellaufschluss	75
7.3.6.	Herstellung und Aufkonzentrierung von Virus-Like-Partikeln	75
7.3.7.	Transduktion von Virus-Like-Partikeln	76
7.3.8.	Quantifizierung der Transgenexpression von transduzierten Zellen mittels Luciferase-Assay	76
7.3.9.	Kultivierung von Bakterienstämmen	77
7.3.10.	Konservierung von Bakterienstämmen.....	77
7.3.11.	Gentransfer in Prokaryoten (Bakterielle Transformation)	77
	1. Transformation von elektrokompetenten Zellen	77
	2. Transformation von chemisch kompetenten Zellen.....	78
8.	Ergebnisse	79
8.1.	Optimierung der Produktion von HIV-basierten Viruspartikeln für die Infektionsversuche.....	79
8.1.1.	Verhältnis der Plasmide für die Virusproduktion.....	79
8.1.2.	Zellkulturzusatz.....	82
8.2.	Permissivität von ausgewählten Zelllinien gegenüber HML-2-Env pseudotypisierten HIV- basierten Viren	83
	CrFK, Cf2Th und Hep2.....	83
8.3.	Untersuchungen zur HML-2-Env-Rezeptor-bindenden Domäne (RBD).....	85
8.3.1.	Konstruktion, Expressionsnachweis und funktionelle Untersuchung von HML-2-OriCoEnv-RBD-Mutanten D139A und Δ 144-152.....	85
8.3.2.	Die N-Glykosylierungsmutanten der RBS von HML-2-Env werden in Viruspartikel eingebaut, sind aber nicht funktionell.....	91

Inhaltsverzeichnis

8.3.3.	Konstruktion und Expressionsnachweis von HML-2/MMTV-Env-Proteinchimären.....	95
8.3.4.	MMTV-Env-HIV-Viren können mTrfR1 mit hoher Effizienz zum Zelleintritt nutzen, MMTV-HML-2-Env-HIV-Chimäre-VLPs können es nicht.	99
8.4.	Untersuchung einer möglichen Interferenz vom exogen überexprimierten HML-2-Env mit dem Zelleintrittvorgang von HML-2-Env-HIV-VLP.	104
8.5.	Nachweis der Interaktion zwischen einer HML-2-Env-Chimäre und dem Rezeptor.	107
8.5.1.	Bindung-Assay.....	107
8.5.2.	Die Env-Chimäre HML-2-SU-h-Fc bindet spezifisch auf der Oberfläche von HML-2-permissiven Zellen.....	109
1.	HML-2-SU-h-Fc und NSU-h-Fc (XMRV-SU-Fc) können exprimiert und aufgereinigt werden.	109
2.	Auf XMRV-Env-HIV-basierte-VLPs binden spezifisch an die Zelllinien A549 und DU145.....	111
8.5.2.2.1.	Adhäsionsassay mit XMRV-Env-HIV-VLP	111
8.5.2.2.2.	Auf XMRV-Env-HIV-basierte-VLP können die Zelllinien 293T, A549, DU145 und SKMel 28 transduzieren.....	113
8.5.2.2.3.	SKMel 28 und XMRV-Env-HIV-VLP	116
8.5.2.2.4.	Ein Chimärprotein kann den spezifischen Zelleintritt von HIV-Basierten VLP in einer Dosis-abhängigen Weise verhindern: Fall von Chimären NSU-h-Fc und XMRV-Env-HIV-VLP	116
3.	Invitro-Detektion der Zelloberflächenbindung vom Chimärprotein HML-2-SU-h-Fc	120
4.	Die Transduktionsrate von HML-2-Env-HIV-VLPs in der CrFK-Zelllinie wird durch das Chimärprotein HML-2-SU-Fc vermindert.....	121
8.5.3.	Pulldown von HML-2-SU-h-Fc-reaktiven Plasmamembran-Proteinen	125
1.	Pre-Screening von Zelllysaten auf HML-2-SU-h-Fc-reaktive Proteine	125
2.	Extraktion aus CrFK-Zellen von Zellmembranproteinen, die für HML-2-SU-h-Fc reaktiv sind.	127
9.	Diskussion.....	131
9.1.	Permissivität von ausgewählten Zelllinien für HIV-VLP mit eingebautem HML-2- Env.....	131
9.2.	Betrachtung der postulierten interagierenden RBD von HML-2-Env und seiner phylogenetischen Verwandten.....	132
9.3.	Alle erzeugten RBD-Env- Mutanten sind nicht funktionell	137
9.3.1.	MMTV-Env-HIV-VLPs infizieren mTrfR1-exprimierende Zellen.....	137
9.3.2.	Einbau in Virionen von den Env-Mutanten K-Cip- und K-N-MMTV, Δ 144-152, EEE146-148AAA, N128A und N153A	138

Inhaltsverzeichnis

9.4. Rezeptorerkennung und Inhibition des Zelleintritts von HIV-Pseudoviren durch ein chimäres Protein.....	144
10. Zusammenfassung.....	147
11. Anhang.....	149
11.1. Sequenzierprimer	149
11.2. PCR-Primer	150
11.3. Mutagenese-Primer	151
12. Tabellenverzeichnis.....	153
13. Publikationsliste	154
14. Lebenslauf.....	155
15. Literaturverzeichnis	158

4. Einleitung

4.1. Viren und Retroviren

4.1.1. Viren

Viren sind sehr kleine infektiöse Partikel mit einer Größe zwischen ca. 16 nm bis über 1000 nm. Beispielsweise ist das kleinste bekannte Virus, das Circovirus, zehnmal kleiner als das kleinste Bakterium. Letzteres weist ein Durchmesser von 0,2 µm aus.

Viren sind also Nanopartikel, die um replizieren zu können, auf einen lebenden Organismus angewiesen sind. Dies kann ein Prokaryot oder Eukaryot sein [1].

Das Viruspartikel, auch Virion genannt, besteht aus einem Genom aus RNA oder DNA, dieses kann in Abhängigkeit des Virustyps einzel- oder doppelsträngig vorliegen. Das Genom ist komplexiert mit viralen Proteinen oder zellulären Histonen und existiert somit als Nucleokapsid, eine Struktur, die den Schutz für das virale Erbgutmaterial bietet. Das Nucleokapsid kann bei einigen Viren von viralen Proteinen, den Capsiden, umgeben sein. Capside kommen in unterschiedlichen Formen, wie z.B. sphärisch, stäbchenförmig, helikal, ikosaedrisch, vor. [1].

Einige Viren sind von einer Membran aus Lipiden umhüllt, an denen virale Proteine verankert sind. In allen Fällen ist die virale Struktur derart organisiert, um das virale Genom zu enthalten und zu beschützen, und es an die Wirtszelle für die nachfolgende Replikation abzugeben [1][2].

Viren werden in unterschiedliche Familien eingeteilt. Die Einteilungskriterien beruhen auf der Art des Genoms, und der Form, in der das Virus vorliegt. Die Komplexität der genomischen Information, die Symmetriefform der Capside sowie das Vorhandensein einer Membranhülle sind weitere taxonomische Kriterien [1]. Weiterhin werden Virusfamilien basierend auf serologischen Kriterien und der genomischen Verwandtschaft in Genera und Virustypen unterteilt [1].

4.1.2. Die Familie der Retroviridae

Die Retroviridae-Familie (Retroviren) umfasst alle ssRNA-Viren, deren Genom mithilfe der Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen-DNA-Polymerase, in DNA umgeschrieben wird. Das Genom der Retroviren integriert als DNA (auch Provirus genannt) ins Wirtsgenom und die nachfolgenden Zellerhaltvorgänge wie die Transkription und Translation dienen der viralen Replikation. Retroviren wurden anhand der Homologie ihrer Pol-Sequenzen in 7 Genera unterteilt, die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren sowie die Lenti- und Spumaviren.

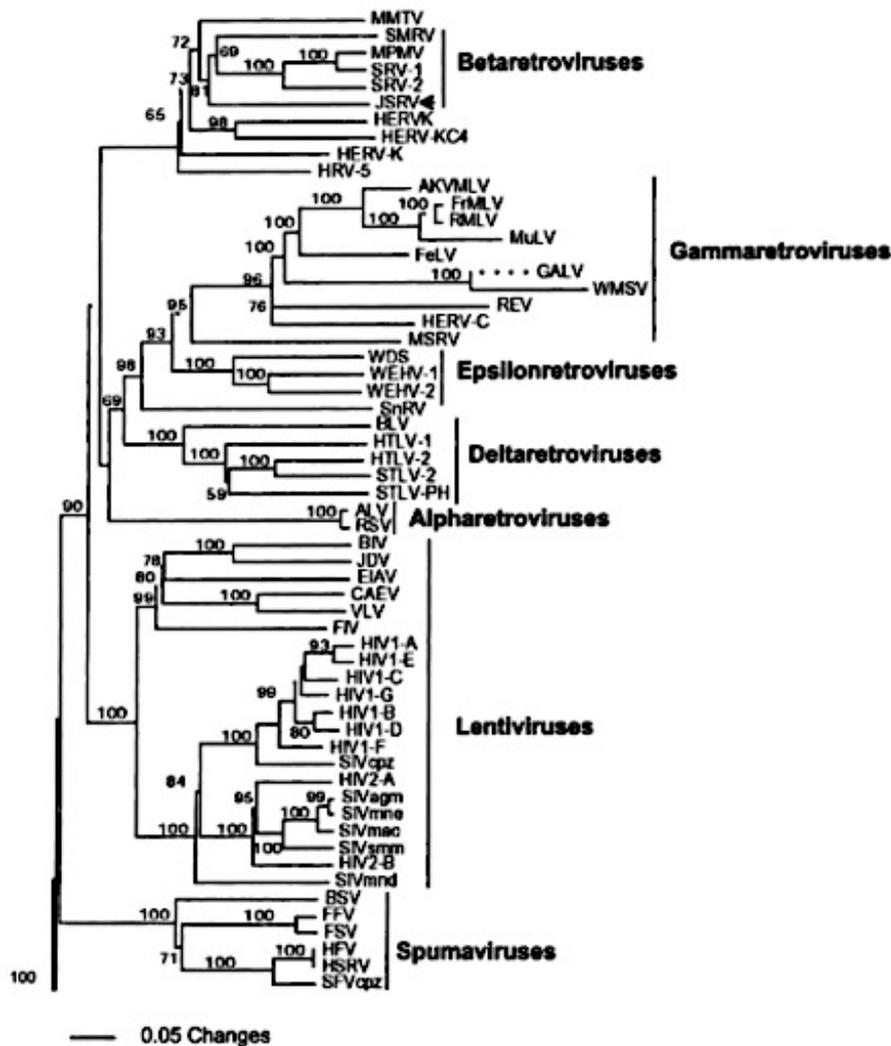


Abbildung 1: Phylogenetische Beziehung zwischen den Retroviren. Dargestellt sind die Mitglieder der sieben Genera. Die Zuordnung der Retroviren zu einem Genus basierte auf der Homologie der Pol-Sequenzen (Bootstrap Technik; Felsenstein 1985). HERV-K zählt zu den Betaretroviren. Von seinem Naherwandten, JSRV, sind exogene sowie endogene Viren bekannt [40]

Einleitung

Die obenstehende Abbildung 1 stellt die Phylogenie von Retroviren dar. HERV-K gehört zum Genus der Betaretroviren, letzteres beinhaltet sowohl exogene als auch endogene Viren von Mäusen, kleinen Wiederkäuern, Affen sowie Menschen. Weitere Betaretroviren sind das Langur Virus, SMRV (*Squirrel monkey retrovirus*), MPMV (*Mason-Pfizer monkey virus*), SRV (*Simian retrovirus*), MMTV (*Mouse mammary tumor virus*), ENTV (*enzootic nasal tumor virus*) und JSRV (*Jaagsiekte sheep retrovirus*) [40].

Eine weitere Einteilung der Retroviren basiert auf deren elektronenmikroskopischer Morphologie. Aufgrund unterschiedlicher morphologischer Merkmale wurden hierbei 4 Typen unterschieden. Die Typen B bis D sind behüllte Viren, wobei die D-Typen weniger ausgeprägte Oberflächenvorsätze haben und etwas größer (120 nm) als die anderen Typen sind. B- und C-Typen besitzen jeweils ein azentrisches bzw. zentrisches Core. A-Typen sind zytoplasmatische Cores von B- und C-Typ-Partikeln [3][4].

Eine alternative Klassifizierung von Retroviren basiert auf der Genomorganisation und unterscheidet zwischen einfachen und komplexen Viren, wobei Erstere ausschließlich für die strukturellen Gene *gag*, *pol* und *env* codieren. Komplexe Viren dagegen codieren für zusätzliche Gene mit u.a. regulatorischen Funktionen [4].

Ein Retrovirus ist am Beispiel des Humanen Immunodefizienz Virus 1 (HIV-1) in der Abbildung 2 illustriert. Das Retrovirus besteht aus 2 Kopien einzelsträngiger RNA, diese sind im Core verpackt. Zusätzlich verpackt und komplexiert mit der viralen RNA sind virale Proteine, die der viralen Replikation dienen, d.h. die Reverse-Transkriptase (RT), Integrase (IN) sowie Protease, und ggf. weitere akzessorischen Proteine, wie z.B. das Vpr im Falle vom HIV-1. Das Core selbst ist ein Multimer aus dem viralen Capsid-Protein (CA) und ist umgeben von dem viralen Matrix-Protein (MA), das wiederum von einer aus der Wirtszelle stammenden Oberflächemembran umhüllt ist. An Letztere ist das virale Envelope-Protein (*env*) über seine Transmembrandomäne (TM) verankert. Eine nähere Beschreibung des viralen *env* ist dem Abschnitt 4.2.1 zu entnehmen.

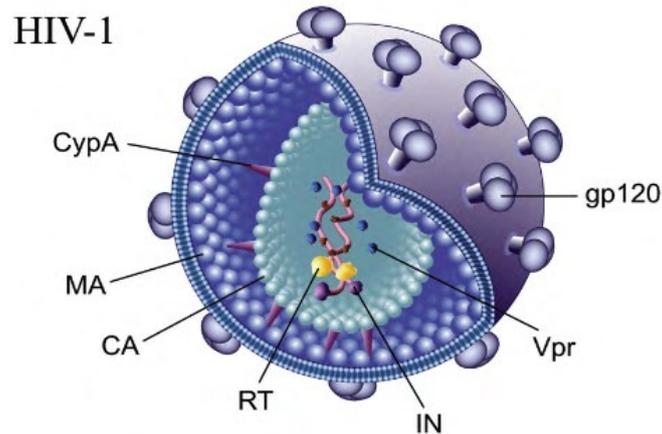


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Retrovirus am Beispiel von HIV-1 [5]

4.1.3. Humane Endogene Retroviren (HERV)

Retroviren besitzen die Fähigkeit, in das Genom der Wirtszellen mithilfe des viralen Proteins Integrase zu integrieren. Sie infizieren überwiegend somatische Zellen, eine Infektion von germinalen Zellen ist i.d.R. ein seltenes Ereignis das, wenn es stattfindet, zur Virus-Endogenisierung führen kann [6]. Dies bedeutet, dass das in das Genom integrierte Virus zu der Nachkommenschaft weitergegeben wird. Endogene Proviren haben sich durch mehrfache, unabhängige Infektionen von Keimzellen im Genom ihrer Wirte etabliert [7]

Endogene virale Sequenzen sind überall in Wirbeltieren vorhanden [6][8-12]. In das menschliche Genom umfassen sie mit ca. 700.000 Elementen ca. 5 bis 8% des gesamten Erbguts [13][14], wobei sie als Retrotransposons, Solo-LTRs, trunkierte, Pseudo- oder provirale Elemente vorliegen [15]. In den ersten Stunden der HERV-Forschung wurden, basierend auf entweder der Sequenz-Identität oder der tRNA-Primer-Bindungsstelle (PBS), die HERV-Elemente in 22 Familien unterteilt [16]. So gehörten z.B. alle Elemente bei denen tRNA_{trp} als Initiator der Reverse-Transkription fungierte zur Familie HERV-W während die Elemente mit dem Primer tRNA_{Lys} innerhalb der Familie HERV-K eingruppiert wurden. Mit der Entwicklung von fortgeschrittenen genomischen Analyse-Methoden erkannte man, dass die gleiche tRNA die Reverse-Transkription von einigen Retroviren mit hoch divergierenden Sequenzen initiieren kann [16]. Darüberhinaus können Proviren des selben phylogenetischen Stamms eine unterschiedliche PBS-Komplementierung aufweisen [17].

Einleitung

Heutzutage werden HERVs unter dem Gesichtspunkt der Evolution der viralen Gene, insbesondere der Pol-Gene, klassifiziert [14]. In den letzten 30 Jahren sind somit abhängig von den Klassifikationskriterien 31 bis mehr als 50 unabhängige HERV-Familien beschrieben worden [14][18].

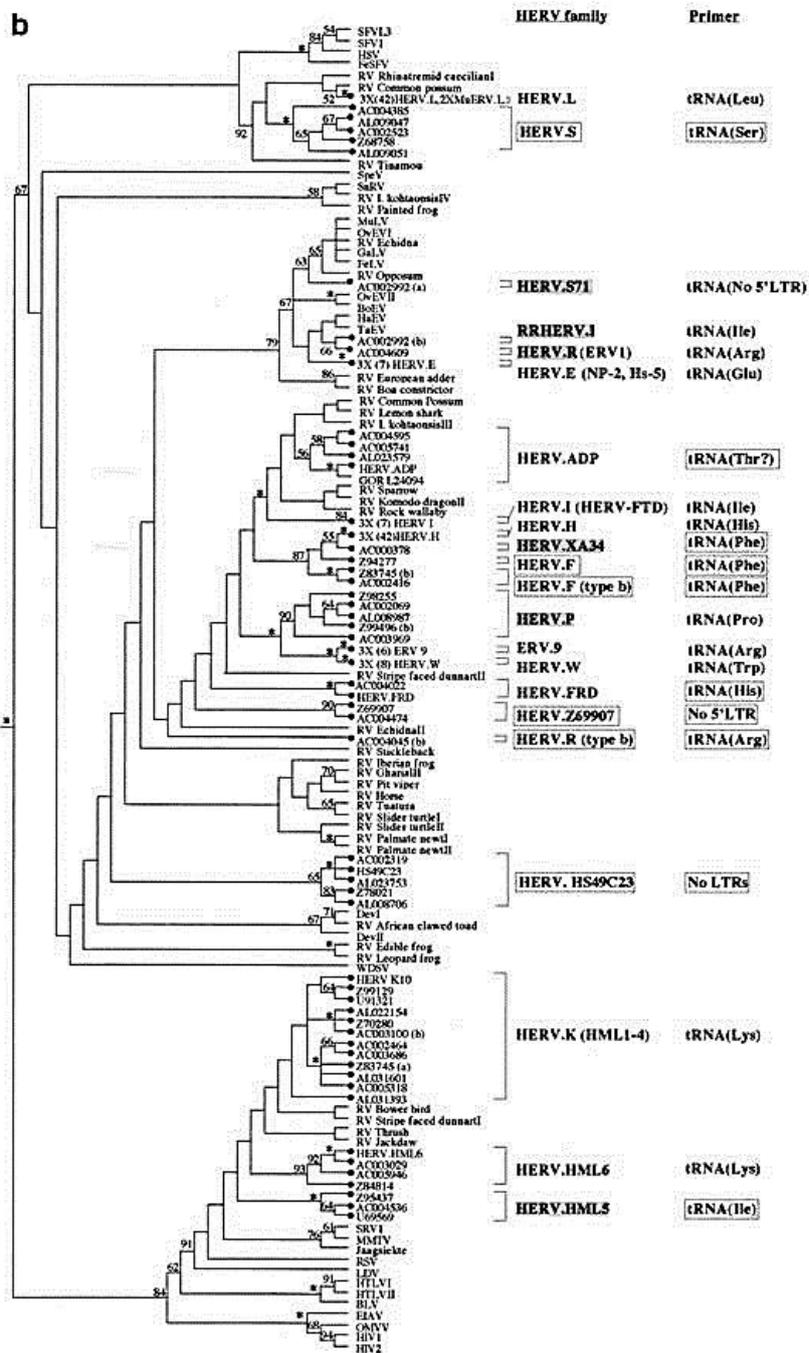


Abbildung 3: Phylogenetische Klassifizierung von humanen endogenen Viren und anderen Retroviridae nach Tristem. Die Gruppierung der HERV innerhalb einer Familie erfolgte anhand der Sequenz-Identität oder der an PBS-bindenden tRNA. [16]

Einleitung

Unabhängig von den oben genannten Klassifikationskriterien werden HERV-Elemente in drei Klassen unterteilt und basierend auf der Gemeinsamkeit der Pol-Sequenzen wird jede Klasse einer entsprechenden Familie exogener Retroviren zugeordnet. Die Klasse 1 umfasst Gamma-ähnliche-HERV, während Klasse 2 und 3 jeweils die Beta- und Spuma-ähnlichen-HERV beinhalten [14][19]. Eine genaue Darstellung der phylogenetischen Beziehung von HERV-Elementen mit exogenen Retroviren ist in Abbildung 4 ersichtlich.

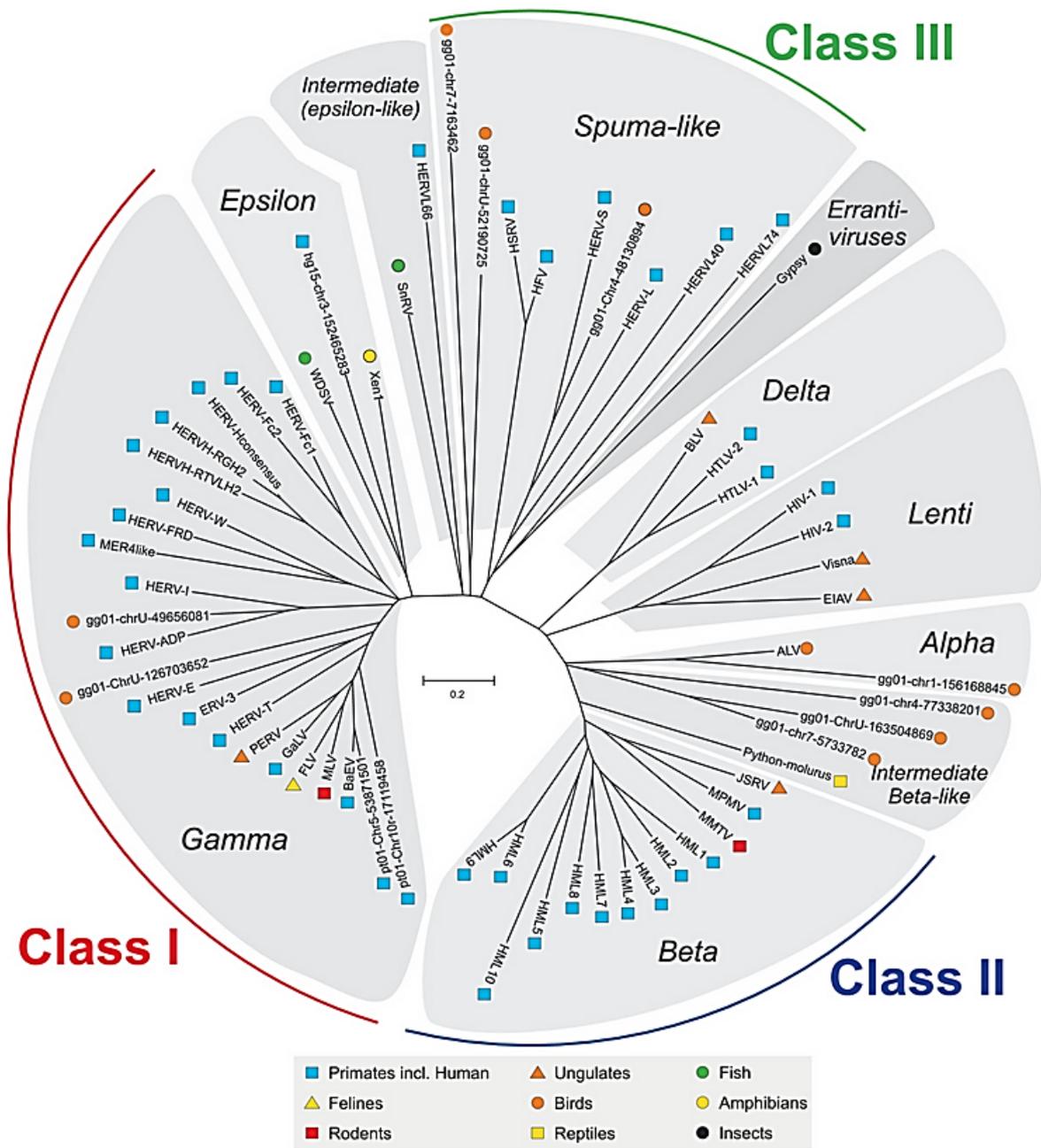


Abbildung 4: Dendrogramm zur phylogenetischen Klassifizierung von HERV nach Jern. Die Clustering der HERV-Elemente in drei großen Gruppen basiert auf der Homologie der Pol-Sequenz mit dem Pol exogener Retroviren. Während die meistens HERV der Familie Alpha, Beta, Epsilon, Gamma oder Spuma zugeordnet wurden, liegen einige Elemente, wie z.B. das HERVL66, als Intermediate vor. [19]

4.1.4. Das human-spezifische endogene Retrovirus HERV-K(HML-2)

Prinzipiell unterscheiden sich die endogenen Retroviren anderer Spezies in ihren Entwicklungs-, strukturellen und biologischen Merkmalen nicht von den Humanen. In der Tat wurden viele der so genannten „humanen“ endogenen Retroviren (HERV)

sowohl in Altwelt- als auch Neuweltaffen und andere Säugetiere gefunden [14][20][21]. Die Unterscheidung zwischen HERV und ERV beruht auf dem historischen Fakt, dass Erstere ursprünglich in menschlichen Geweben entdeckt wurden und ihre Charakterisierung mit dem Schwerpunkt liegend auf ihre Implikation in humanen Krankheiten erfolgte [14].

Einige HERV entstanden vor 70-60 Millionen Jahren vor der Aufspaltung der Halbaffen und sind daher in allen Primaten vorhanden. Ereignisse wie die Retrotransposition führten zur Vervielfältigung der Anzahl der Proviren im Genom, so dass es bei einigen HERV tausende Provirus-Kopien gibt [22-24].

Das HERV-K „human mouse mammary tumor virus like-2“ (HML-2) ist das einzige zurzeit bekannte HERV, das humanspezifische Integrationen enthält, also solche Elemente, die nur im menschlichen Genom zu finden sind [14][25]. Es ist das bestkonservierte seiner Art und gehört zu der HERV-K-Gruppe, die wiederum zu den HERV der Klasse II innerhalb der Beta-Retroviren-Gruppe zählt. Zurzeit sind 10 Mitglieder der HERV-K-Familie bekannt, wobei die meisten, oder womöglich sogar alle originalen Proviren durch akkumulierte zufällige Mutationen inaktiviert worden sind. Die HML-2-Gruppe dahingegen enthält Elemente mit offenen Leserahmen für virale Proteine, obwohl sie seit mehr als 35 Millionen Jahren in Primaten integriert hat [24].

Die HML-2-Gruppe besteht aus ca. 60 Proviren, wovon 11 Insertionspolymorph innerhalb der Bevölkerung sind. Hierbei sind zwei Proviren-Type bekannt, wobei sich das Typ-2-Provirus vom Typ-1 durch eine 292-bp zusätzliche Sequenz innerhalb der Pol-Env Schnittstelle unterscheidet [11][24]. Darüber hinaus sind über 2500 Solo-LTRs vorhanden, Letztere entstanden durch Inter- und Intra-LTR Rekombinationsereignisse [14][25-27].

4.1.5. Genomische Organisation von HERV-K(HML-2)

Eine schematische Darstellung des HERV-K(HML-2)- Proviruses und dessen Transkripten ist in der nachstehenden Abbildung 5 zu finden. Der Genomaufbau des HERV-K(HML-2) ist vergleichbar mit dem seines nächsten exogenen Verwandten, dem MMTV. Ein Vollängenprovirus besteht dabei aus zwei Long terminal repeats (LTR), die Gene flankieren, die für virale Proteine codieren. Diese Gene codieren für

das Vorläufer-Protein Gag, Gag-Pro-Pol, das Gag-Pro Protein, das Env und das RNA-Nuklear-Export Protein Rec (Typ 2-Viren) bzw. das Np9-Protein (Typ 1-Viren).

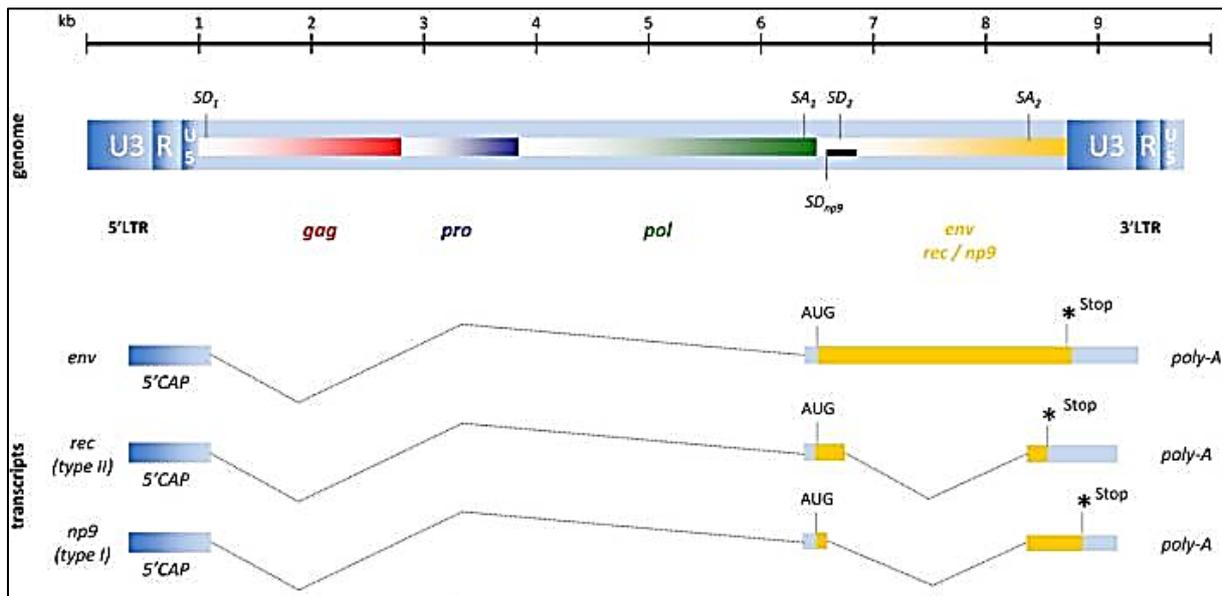


Abbildung 5: Genomische strukturelle Organisation des HERV-K(HML-2)- Provirus und der davon codierten Transkripte. Die viralen Strukturgene für die Proteine Gag, Pro, Pol und Env sind im Provirus vorhanden. Bekannt sind zwei Provirus-Typen. Das Typ 1 unterscheidet sich vom Typ 2 durch eine Deletion von 292 bp an der Schnittstelle zwischen Pol und Env. Typ2 codiert deshalb durch einen alternativen Spleißvorgang zusätzlich zum Env-Protein für das RNA-Nuklear-Export-Protein Rec. Analog codiert das Typ-1-Provirus für das Np9-Protein. [28], modifiziert.

4.1.6. Human-medizinische Bedeutung von HERV-K(HML-2)

HERV-K(HML-2) -Proviren sind transkriptionell aktiv und codieren für die strukturellen viralen Proteine Gag, Pro, Pol oder Env [11][24][29]. In Keimzelltumoren, insbesondere Teratokarzinoma, Melanoma und den entsprechenden Zelllinien sind die Transkripte und assoziierte Proteine erhöht exprimiert. Die erhöhte Proteinexpression macht sich z.B. phänotypisch in Seren von Krebspatienten bemerkbar durch eine erhöhte Immunantwort gegen die viralen Proteinen Gag und Env im Vergleich zu gesunden Probanden [24][30][31]. Darüberhinaus werden in Teratokarzinoma und den davon abgeleiteten Zelllinien virale Partikeln gebildet, die über die Elektronenmikroskopie und PCR-basierten Methoden nachweisbar sind. Das Typ-2-HERV-K(HML-2)-Provirus codiert zusätzlich und aufgrund der vorhandenen richtigen Spleißsignale im Env-Gen für das virale RNA (vRNA)-Transport-Protein Rec [24]. Stattdessen codiert das Typ-1 durch einen alternativen

Spleißvorgang für das Np9-Protein. Beide Proteine, Rec und Np9, sind assoziiert mit der Tumorgenese [28].

4.2. Determinanten des Zelltropismus

4.2.1. Oberflächenproteine (Env) von behüllten Viren

Behüllte Viren sind umhüllt mit der Plasmamembran der Wirtszelle, wobei die viralen Oberflächenglykoproteine an der Oberfläche verankert sind. Primär fungieren letztere als Vermittler des Virus-Eintritts in neuen Zellen, indem sie an den zellulären Rezeptor binden und die Fusion beider Membranen ermöglichen [32]. Solche Proteine werden als Fusionsproteine bezeichnet.

Zurzeit sind von ERV ca. 88 Env-Gene bekannt, diese sind in unterschiedlichen Loci über das Genom verteilt. Aber auch Polymorphismus innerhalb eines Lokus, sind bei Env-Proteinen keine Seltenheit, denn letztere umfassen mehrere antigenische Determinanten, wogegen Antikörper des Immunsystems gerichtet sind. Es resultiert daraus, durch den damit verbundenen Selektionsdruck, ein hohes Maß an Polymorphismus, wie es deutlich am Beispiel vom HIV-1 beobachtet werden kann [41]. Infolgedessen kommt es im Laufe der viralen Evolution zu einer schnellen Sequenz Diversifizierung innerhalb dieser Loci [42].

1. Env-Synthese

In der Abbildung 6 ist der Vorgang der Env-Synthese bis zum Einbau im viralen Partikel schematisch dargestellt. Env-Glykoproteine sind Membranproteine und werden in infizierten Zellen, genauso wie die anderen zellulären Proteine dieser Klasse an Ribosomen, die an das raue endoplasmatische Retikulum (rER) gebunden sind, synthetisiert. Auf diese Weise gelangt die wachsende Peptidkette unmittelbar nach der Synthese in das Lumen, das Innere des endoplasmatischen Retikulums (ER). Diese Art der Proteinsynthese wird ermöglicht durch das Signalpeptid, eine kurze Sequenz am N-Terminus des codierenden Bereichs der Proteinsequenz, welche die Bindung der Ribosomen an die zytosolische Seite der ER-Membran einleitet [33][34]. Im ER-Lumen werden die frisch synthetisierten Proteine in Transport-Vesikel inkorporiert und migrieren von dort sequenziell über den cis-Golgi

Einleitung

zum Trans-Golgi-Retikulum, die Sekretionsseite des Golgi-Apparats [33][35]. Vom Trans-Golgi-Retikulum wird das virale Hüllenprotein, verpackt in Transportvesikeln, in die periphere Plasmamembran transportiert.

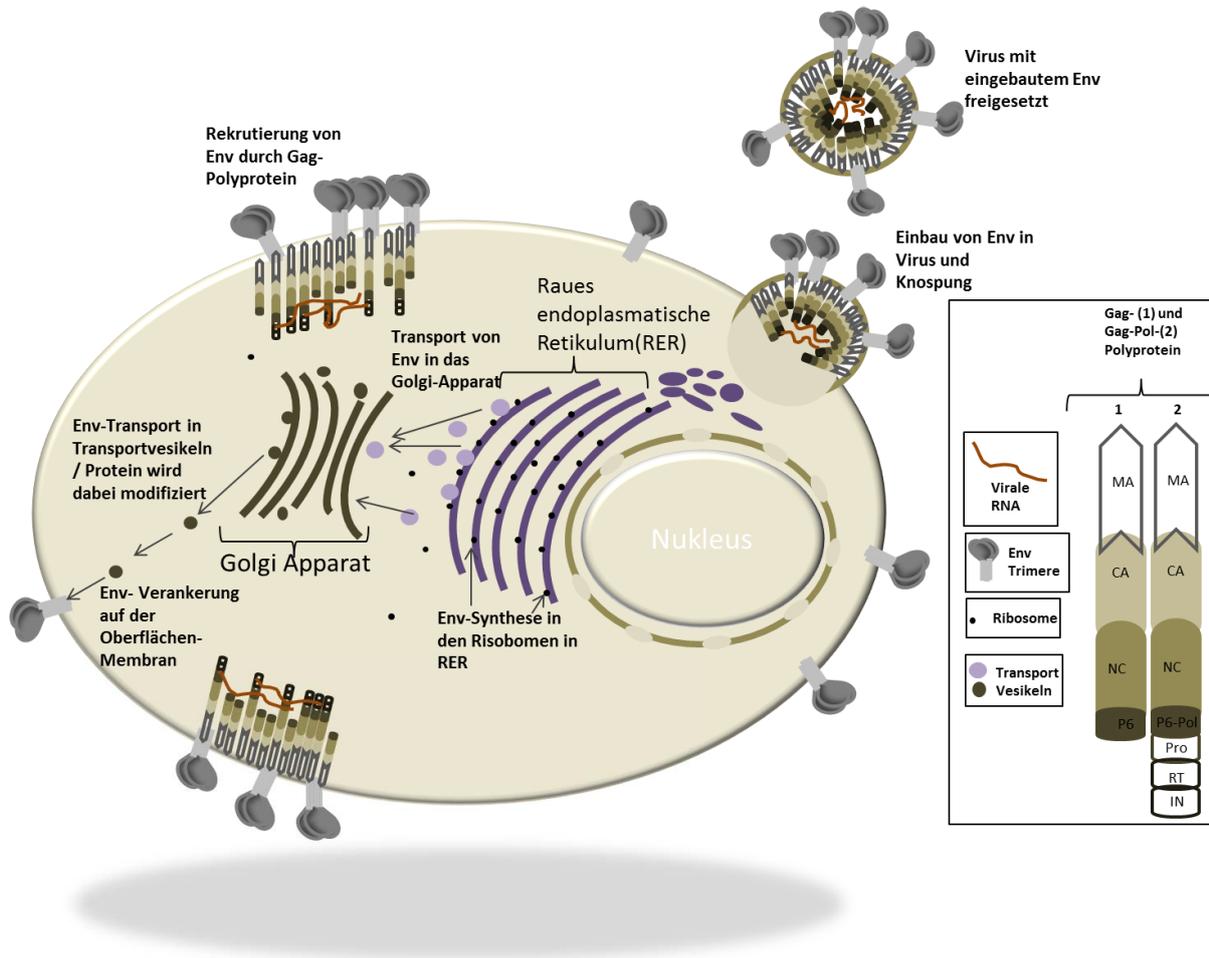


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Biosynthese von Env am Beispiel von HIV, von der Synthese in rER bis zum Einbau in das Viruspartikel.

2. Posttranslationelle Modifikationen (PTMs)

Auf dem Weg zur peripheren Plasmamembran erfahren Oberflächenproteine eine Reihe von Modifikationen. Darunter zählen u.a. die Ausbildung von Disulfidbrücken, die proteolytische Spaltung in Untereinheiten mit spezifischen Funktionen, die Verknüpfung von Aminosäuren oder Zuckerresten mit funktionellen Gruppen wie z.B. Methyl-, Acetyl-, Phosphatgruppen oder mit Ubiquitin (nur an einigen Aminosäuren).

3. Der Beitrag von PTMs zur Proteinstruktur und - Funktion: Fokus auf die N-Glykosylierung.

Posttranslationelle Modifikationen leisten einen vielfältigen Beitrag zur Struktur und Funktionalität sowie zur Regulation von Proteinen. Durch die Ubiquitinierung z.B., wird ein Protein so markiert, dass es von einem Proteinkomplex, dem Proteasom, erkannt und abgebaut wird. Die Phosphorylierung dahingegen spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Aktivität von Proteinen in Signalkaskaden.

Die **N-Glykosylierung** ist eine der am häufigsten vorkommenden PTM und betrifft ausschließlich Proteine, die sekretiert oder auf der Plasmamembran exprimiert werden. Während bakterielle Proteine so gut wie keine N-verlinkten Kohlenhydrate erhalten, beginnt bei Eukaryoten der Prozess bereits während der Proteinbiosynthese im Lumen des rER.

Generell findet eine Glykosylierung an präferentiellen Aminosäuren statt. Man spricht von einer N- Glykosylierung, wenn die Verknüpfung an Asparagin erfolgt. Eine Verknüpfung an Serin, Threonin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin wird als O- Glykosylierung bezeichnet und betrifft sowohl cytoplasmatische als auch extrazelluläre Proteine. Im Gegensatz zur N-Glykosylierung findet sie ausschließlich posttranslationell statt und resultiert meistens in kurz verzweigte Oligosaccharide mit bis zu vier Kohlenhydratresten.

In der ersten Phase des Vorgangs der N-Glykosylierung, und diese Phase ist unter allen Eukaryoten evolutionär konserviert, wird ein verzweigtes Oligosaccharid bestehend aus drei Glucosen (Glc), neun Mannosen (Man) sowie zwei N-Acetylglucosamin (GlcNAc) an einen Asparagin-Rest mit dem Motiv Asn-X¹-Ser oder Asn-X¹-Thr angeknüpft. Weitere Prozessierungen des Vorläufer-Proteins finden im Golgi-Apparat statt, wobei stufenweise einige Saccharide wieder entfernt und andere neu hinzugefügt werden. Mit der weiteren Addition von Zuckerresten wie Fucose (Fuc), Galactosen, sowie von N-Acetylneuraminresten (Neu5Ac), zu den bereits verknüpften Oligosacchariden, wird die Glykosylierung beendet und resultiert in komplex N-verknüpften Oligosacchariden mit, je nach Zelltyp, unterschiedlichen Kombinationen von Mannose-, Fucose-, N-Acetylgalactosamin- (GalNAc), N-

¹ X steht für jede Aminosäure außer Prolin

Acetylglucosamin-, und N-Acetylneuramin- Resten. Solche Glykoproteine gehören zum sog. Komplexem Typ [33][35].

In manchen Fällen erfolgt keine weitere Prozessierung im Golgi-Apparat sodass die daraus resultierenden Glykoproteine überwiegend Mannose-Reste enthalten. Diese Glykoproteine werden als „High Mannose“ -Typ bezeichnet. Neben diesen beiden Typen existiert ebenfalls der Hybrid- Typ, der die Kombination vom Komplex- und High-Mannose- Typ darstellt.

Diese Addition von Oligosacchariden am Protein spielt eine entscheidende Rolle in der Proteinfaltung, Konformation, Stabilität und Aktivität eines Proteins.

In der Tat benötigen einige Proteine zur korrekten Faltung N-verknüpfte Oligosaccharide, so dass eine Mutation eines einzigen Asparagin-Restes zur Akkumulation dieser Proteine in einem entfalteten Zustand führt [33]. Für Proteine, die oligomerisieren, und dies ist der Fall bei Env-Proteinen von Betaretroviren, denn sie bilden Trimere, bedeutet dies das Unterbleiben der Bildung des Oligomers, welches als funktionelle Einheit bei diesen Viren fungiert. Auf die Bedeutung der Oligomerisation von Env-Proteinen wird später näher eingegangen (siehe Punkt 5). Auf der anderen Seite führt der Einsatz eines Hemmstoffs, welcher, den Transfer von Sacchariden auf die wachsende Oligopeptidkette in rER entgegenwirkt, zur Fehlfaltung von einigen Proteinen. Im Fall von Trimer-bildenden Proteinen, resultiert dies in einer fehlerhaften Trimerisierung und demzufolge, ähnlich zu bereits erwähntem entfaltetem Proteinszustand, zum Ausfall der Funktion.

Darüber hinaus leistet die N-Glykosylierung einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität von Proteinen. Zwar erhalten viele sekretorische Proteine trotz komplettem Ausfall der N-Glykosylierung ihre korrekte Faltung, sie werden aber nach dem Transport in den entsprechenden Wirkungsorten durch Gewebe-spezifische Proteasen schneller als die N-Glykosylierten Versionen abgebaut [33][35].

Auch **Envelopeproteine der β -Retroviren** weisen N-Glykosylierungsstellen auf. Beim MMTV-Env befinden sich zwei der insgesamt vier Stellen auf dem SU-Bereich des Proteins, wobei die zweite Stelle innerhalb der Rezeptor-bindenden-Domäne lokalisiert ist, während die zwei weiteren Stellen in der TM-Region lokalisiert sind. Im Vergleich dazu weist HML-2-Env zwölf potentielle N-Glykosylierungsstellen auf, sieben davon sind in der SU-Region des Proteins zu finden. Env von anderen β -Retroviren, das SMRV, MPMV und JSRV, enthalten jeweils neun, elf und sechs

solche Stellen. In der nachstehenden Tabelle 1 ist eine Übersicht über die N-Glykosylierungsstellen der Env von beiden erst- genannten β -Retroviren zu sehen. Eine vergleichende schematische Darstellung des Env-Proteins von MMTV und HERV-K(HML-2) kann den Abbildungen 13A und 17 entnommen werden.

Tabelle 1: Übersicht über die N-Glykosylierungsstellen von MMTV- und HML-2-Env

<i>β-Retroviren</i>	<i>N-Glykosylierungsstellen des Envelop-Proteins</i>		<i>Protein-Bereich</i>
	<i>Anzahl</i>	<i>Position in der Aminosäuresequenz</i>	
<i>MMTV</i>	4	127	SU
		143	
		498	TM
		557	
<i>HERV-K(HML-2)²</i>	12	100	SU
		128	
		153	
		274	
		355	
		372	
		461	
		506	TM
		507	
		554	
585			

Das Spektrum der Proteinfunktionen hängt zum nicht-unerheblichen Teil von den PTMs ab. Insbesondere N-Glykosylierungsstellen spielen dabei eine wesentliche Rolle. Letztere sind potentiell in HML-2-Env in hoher Anzahl vorhanden. Es stellt sich daher die Frage hinsichtlich deren Relevanz für die Funktion des Proteins als Vermittler des Zelleintritts. Eine Charakterisierung

² Hierbei handelt es sich um potentielle N-Glykosylierungsstellen

zweier im SU-Bereich enthaltenen N-Glykosylierungsstellen von HML-2-Env wurde in Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen. Hinweise auf deren Implikation im Infektionsvorgang des Virus könnten Anhaltspunkte für mögliche Forschungs- oder therapeutische Anwendungen liefern.

4. Einbau in das Virion

Das Fusionsprotein, Env, wird nach seiner Synthese auf der Zelloberfläche der Wirtszelle transportiert und dort in die Plasmamembran verankert. Für die meisten Retroviren findet der Vorgang des Viruszusammenbaus, auch „assembly“ genannt, unmittelbar in der Nähe der Zelloberfläche statt, und das daraus entstandene Virus sprosst aus der Wirtszelle heraus, umhüllt von der zellulären Plasmamembran und dem bereits darin verankerten Env-Protein.

Im Gegensatz zu den meistens Retroviren findet bei Betaretroviren das Capsid-Assembly im Zytoplasma statt, in den sog. A-Typen Partikeln, die cytoplasmatischen Cores der Viren. Anschließend daraus wird das Virus-Core in die Plasma-Membran transportiert, wo es dort umhüllt und freigesetzt wird [40][43].

VIRION

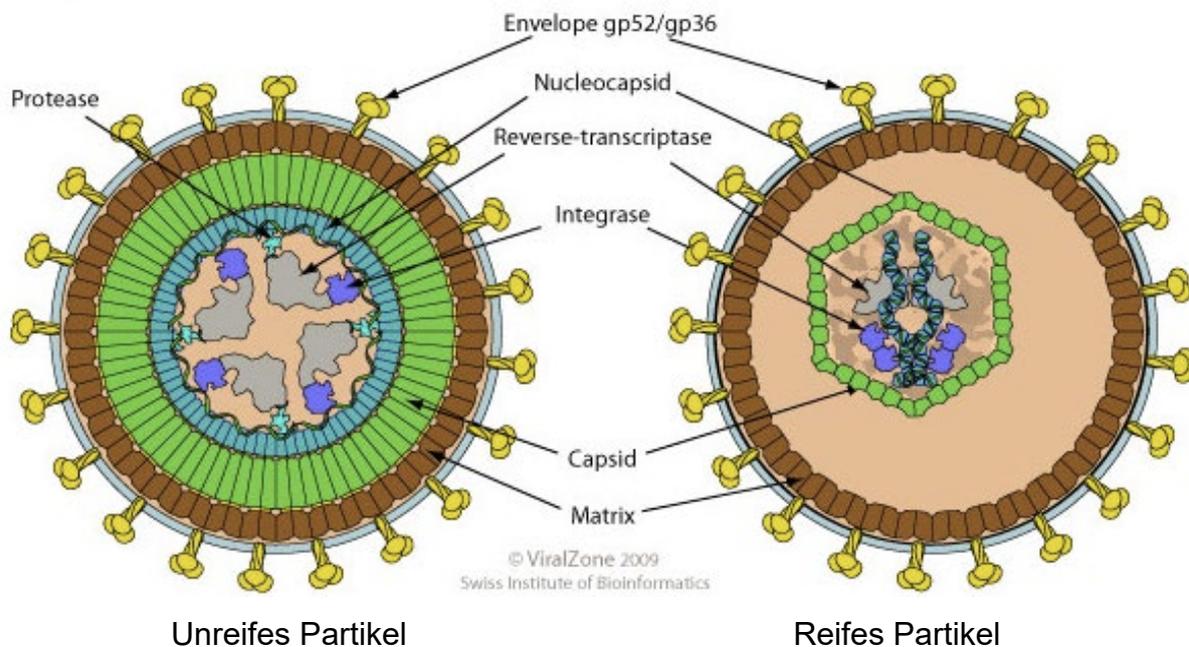


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Betaretrovirus [44]

5. Fusogene Eigenschaften von retroviralen Env-Proteinen

Verschiedene Fusionsproteine von umhüllten Viren sind derzeit gut charakterisiert worden. Diese Charakterisierung erfolgte anhand Merkmalen wie der Präfusionskonformation, d.h. der Form des viralen Oberflächenproteins vor der Interaktion mit der Zelle, und Post-Fusion-Konformation, dessen Form nach Vollendung des Fusionsvorgangs. Obwohl alle Fusionsproteine einen unterschiedlichen molekularen Aufbau aufweisen, katalysieren alle auf eine sehr ähnliche Weise die Fusion des Virus mit der Plasmamembran der Zelle. Alle Fusogene nutzen die Energie, die während einer Konformationsänderung des Proteins freigesetzt wird, um die kinetische Barriere der Fusion von zwei Lipiddoppelschichten zu überwinden und so die Fusion der Membrane zu ermöglichen [45].

Fusionsproteine sind in drei unterschiedlichen Klassen unterteilt. Retrovirale Envelope-Proteine, und dazu zählt das HML-2-Env, gehören zur Klasse 1 der viralen Fusionsproteine. Alle Proteine dieser Familie werden als Vorläuferprotein synthetisiert. Die enzymkatalysierte Spaltung des Vorläufers in eine Rezeptor-erkennende sowie fusionsvermittelnde Untereinheit geschieht auf dem Weg zur Zelloberfläche. Furin, eine im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisierte ubiquitäre Endoprotease, erkennt bestimmte Motive im Vorläuferprotein und spaltet dort das Protein in seine funktionellen Untereinheiten. Dieser Vorgang wird „Prozessierung“ genannt. Das Ergebnis dieser Proteolyse ist, dass zwei funktionell unterschiedlich aktiven Formen, die „surface unit“ (SU) und die „Transmembran“ (TM) entstehen. Beide Untereinheiten bleiben jedoch entweder über Nicht-Kovalente Bindungen oder schwachkovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft [46]. Abbildung 8 stellt schematisch das Envelope-Protein von HML-2-Virus dar.

Bei den meisten Mitgliedern von fusogenen Proteinen der Klasse I stellt der N-Terminus-Bereich des Proteins, letzterer befindet sich in der SU- Untereinheit, die Rezeptorbindende-Domäne dar. Einige von Ihnen, wie z.B. das MMTV-Env, weisen eine separate Rezeptorbindende-Domäne auf, die sich meist jedoch innerhalb des N-Terminus-Bereiches des Proteins befindet [46].

Ein weiteres Merkmal von Fusionsproteinen der Klasse I, worunter retrovirale Hüllen-Proteine zählen, ist die Oligomerisation der Env-Proteine zu einem Trimer aus SU-

TM-Heterodimeren [47]. Der trimere Zustand stellt die Fusionskompetente Einheit der viralen Hüllenproteine dar. Verantwortlich für die Oligomerisation ist ein Bereich innerhalb des Proteins, auch Oligomerisationsdomäne genannt, welche die Bildung von metastabilen kovalenten-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Heterodimeren ermöglicht. Der Trimer wird bereits in rER gebildet [48, 49, 50]. Der im Virus eingebaute metastabile Trimer ist über eine C-terminale-Proteindomäne an der viralen Hüllenmembran verankert. Dieser Proteinbereich wird auch als „*Membrane spanning domain (MSD)*“ bezeichnet. Von HIV oder MMTV, letzterer ist ein Verwandter vom HML-2, weiß man, dass der Env-Trimer in der Virushülle über Wechselwirkungen zwischen dem C-terminalen Bereich des Fusionsproteins und dem N-Terminus von Gag-Polyproteinen verankert ist. Für das HML-2 Env erstreckt sich die MSD von Aminosäure an Positione 633 bis Position 653. Eine schematische Übersicht dieses Bereiches und anderer Bereiche von HML-2-Env kann der nachstehenden Abbildung 8 entnommen werden.



Abbildung 8: HML-2-Env Sequenzstruktur. Das inaktive Protein besteht aus einem Signal Peptid (SP), einer „Surface unit“ (SU) und einer Transmembran-Untereinheit (TM), die kovalent miteinander verbunden sind. Das Polyprotein wird N-Glykosyliert und erhält somit eine Molekularmasse von 95 kDa. Die aktive Form des Proteins wird durch die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins erhalten, wodurch eine SU- und eine TM-Untereinheit entstehen. Beide Endprodukte der Prozessierung sind durch nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verknüpft und werden später als ein Trimer aus SU-TM-Heterodimeren im Virus eingebaut. Sie dienen hauptsächlich der Erkennung der Zielzelle durch das Virus und der Fusion des Virus mit der zellulären Plasmamembran.

4.2.2. Rezeptorproteine von Betaretroviren

Der Zelleintritt ist ein wichtiger Schritt im Replikationszyklus jedes Virus. Zur Überwindung der Plasmamembran der Wirtszelle, deren Lipiddoppelschicht eine Barriere für den Zelleintrittsvorgang darstellt, verwenden Viren verschiedene Pathways, wobei Zelloberflächenmoleküle die Adhäsion, den ersten Schritt eines viralen Infektionsvorgangs, und den Eintritt des Virus vermitteln.

Einleitung

Die Adhäsion des Virus kann unspezifisch über ein oder mehrere Makromoleküle, wie z.B. Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), Glycoproteine, Lipoproteine, erfolgen. Bei den zwei letzteren kann die Bindung des Virus durch Wechselwirkungen mit den Glycanen bzw. Lipiden am Protein oder mit den Aminosäuren des Proteins zustandekommen. Nach der unspezifischen Adhäsion findet die Bindung an einen oder mehrerer spezifische Rezeptoren statt. Manche Retroviren induzieren nach der Adhäsion und Bindung an den spezifischen Rezeptor eine Endocytose, um anschließend das virale Material in das Cytosol einzuschleusen [51].

Die Familie der β -Retroviren beinhaltet mehreren Viren, wobei man zwischen denjenigen unterscheidet, die einen pH-abhängigen Weg mit Endozytose nutzen; und denen, deren Eintritt in die Zelle ohne Endozytose stattfindet.

Mehrere β -Retroviren nutzen für den Zelleintritt den gleichen Rezeptor, den Aminosäuren-Transporter Transmembranprotein ATB⁰ und benötigen auch keine Aktivierung der Fusionskompetenten Env-Einheiten über einen sauren-pH-Wert. Einen anderen Rezeptor nutzen die Viren MMTV, ENTV und JSRV. Bei ersterem Virus stellt die Erkennung des Rezeptors den ersten Schritt des Fusionsvorgangs dar [52]. Als Rezeptor für MMTV fungiert hierbei das membrandurchspannende integrale mouse Protein Transferrin Rezeptor Protein 1 (mTrfR1), dieses Plasmamembranprotein bindet Transferrin und das Hereditäre-Hämochromatose-Protein (HFE) und ist so für die intrazelluläre Aufnahme von Eisen verantwortlich [53]. JSRV und ENTV sowie ihre endogenen Ebenbilder nutzen dagegen als zellulärer Rezeptor Hyaluronidase -2 (HYAL-2), ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- verankertes Zelloberflächenprotein, welches unter sauren pH-Bedingungen Hyaluronsäure optimal hydrolysiert [37][54][55].

Eine zusammenfassende Auflistung der Eintrittsmechanismen aller β -Retroviren sowie deren Rezeptoren kann der nachstehenden Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: β -Retroviren und Ihre Eintrittsmechanismen. Alle β -Retroviren bis auf MMTV, JSRV und ENTV nutzen den selben Rezeptor als Vermittler des Zelleintritts; Quellen: [56,57,58]

β -Retrovirus	Eintrittsmechanismus		
	<u>pH-abhängig</u>	<u>Rezeptor-abhängig</u>	
		Rezeptor	Zelluläre Funktion des Rezeptors
Langur Virus	-	ATB ⁰ (SLC1A5), RDR2 ³ (Ein Allel von ATB ⁰)	Transport von neutralen Aminosäuren
SMRV (<i>Squirrel monkey retrovirus</i>)	-	ATB ⁰ (SLC1A5),	Transport von neutralen Aminosäuren
MPMV (<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>)	-	ATB ⁰ (SLC1A5),	Transport von neutralen Aminosäuren
SRV (<i>Simian retrovirus</i>)	-	ATB ⁰ (SLC1A5) RDR2 (Ein Allel von ATB ⁰)	Transport von neutralen Aminosäuren
MMTV (<i>Mouse mammary tumor virus</i>)	+	Transferrin-Rezeptor-Protein	Zelluläre Aufnahme von Eisen
ENTV (<i>enzootic nasal tumor virus</i>)	+	Hyaluronidase 2	Hydrolyse von Hyaluronsäure
JSRV (<i>Jaagsiekte sheep retrovirus</i>)	+	Hyaluronidase 2	Hydrolyse von Hyaluronsäure
HERV-K(HML-2)	Nb ⁴	Nb	Nb

³ RDR: Typ D retrovirus receptor

⁴ Nb: Nicht bekannt

5. Fragestellung

Für einige endogene Retroviren ist eine Co-Existenz von Virus und Wirt mit gegenseitigen Vorteilen entstanden. Trotz diesem „friedlichen“ Zusammenexistieren kann ein ins Genom integriertes Retrovirus dennoch eine Gefahr für den Wirt darstellen. Dies ist der Fall wenn das ruhende Provirus das Potential besitzt, etwa in Folge von epigenetischen Genomveränderungen wieder aktiv zu werden. Negative Konsequenzen für den Wirt sind auch die Folge, wenn das endogene Virus eine Hilfestellung für andere Viren leistet. Ein solches Beispiel ist der Einbau von funktionellen Env-Proteinen von HERV-K(HML-2) in koinfizierende Retroviren. So kann z. B. der Tropismus von HIV geändert werden, so dass dem Virus dann mehr Zielzellen zur Verfügung stehen. Außerdem hat das Env von HERV-K(HML-2) einen zytotoxischen Effekt [62]. Aus diesen und einer Vielzahl weiterer Gründe ist es von großer Bedeutung, das endogene Virus und seine „Bausteine“ zu untersuchen, um deren Funktion besser zu verstehen. Dies umfasst insbesondere den Infektionsvorgang. Nach der unspezifischen Adhäsion an eine Wirtszelle bindet ein Retrovirus spezifisch an einen oder mehrerer Rezeptoren, um den Zelleintrittsprozess zu initialisieren. Das Hüllprotein von HERV-K(HML-2) verleiht dem Virus einen breiten Zelltropismus was darauf hindeutet, dass der oder die Rezeptoren auf vielen Zellen exprimiert sind. Bisher konnte jedoch noch kein Rezeptormolekül für HERV-K(HML-2) identifiziert werden. Unbekannt sind auch die Rezeptorbindestellen im Hüllprotein des Virus.

Im Zuge dieser Arbeit sollen zunächst durch vergleichende Sequenzanalysen mit nahe Verwandten Betaretroviren potentielle Rezeptorbindestellen sowie für die Rezeptorbindung relevante posttranskriptionelle Modifikationen im Hüllprotein des Virus bestimmt und näher charakterisiert werden. Darüber hinaus ist geplant, mit Hilfer löslicher Fusionsproteine, die identifizierte Rezeptorbindestellen und Fc-Fragmente von Immunglobulinen enthalten, weitere Erkenntnisse über die Bindung an permissive Zellen und den Zelleintritt von HERV-K(HML-2) zu sammeln. Des Weiteren soll geprüft werden, ob diese Fusionsproteine spezifisch an einen Rezeptor des Virus binden und sich damit für Strategien zur Bestimmung von Rezeptoren dieses Virus eignen. Wenn dies der Fall ist, sollte eine dieser Strategien verfolgt werden.

6. Material

6.1. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Carlroth, Karlsruhe
Agar-Agar, bakteriologisch	Roth, Karlsruhe
Agarose HR-PLUS Roti®garose	Carlroth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V Protease-frei	Roth, Karlsruhe
Albumin Standard	ThermoFisher scientific, Rockford
Amicon Ultra-15 30K centrifugal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammonium sulfate >=99,0%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammonium Persulfate (APS)	Roth, Karlsruhe
Aminooxy-Biotin	Biotium, Hayward
Aniline	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biocytin Hydrazide	ThermoFisher scientific, Rockford
Biotinylated Oligo(dT) Probe	ThermoFisher scientific, Rockford
Bovine Serum Albumine (BSA)	New England BioLabs, Ipswich
Bidestilliertes Wasser(ddH ₂ O)	Robert Koch Institut, Berlin
Blot Absorbent Filter Papier	BioRad, Hercules
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
BS3 (bis(sulfosuccinimidyl)suberate)	ThermoFisher scientific, Rockford
Calcium Chlorid	Roth, Karlsruhe
Carbonate-Bicarbonate Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chaps hydrate >=98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	Fluka Biochemika, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim
Deckgläschen (ø 25 mm #1)	Menzel Gläser, Braunschweig
DEPC treated Water	Ambion lifetechnologies, Carlsbad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	PAA Laboratories, Pasching

Material und Methoden

dNTPs	Fermentas, Burlington
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten (2 bis 50 ml)	TPP, Trasadingen
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol (99,8%(v/v))	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Gelatine	
GelRed	Biotium, Hayward
Generuler 1kb Ladder Plus/100 bp	Fermentas, Burlington
Glycerol (99,5% (v/v))	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycogen-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hexadimethrin Bromid >=95%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes 99,5%	Roth, Karlsruhe
HiTrap Protein G HP (5 X 1mL)	GE Healthcare Life sciences
Hoechst 33342	ThermoFisher scientific, Rockford
IPTG	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-propanol >=99,5%	Roth, Karlsruhe
Kodak cassette	Kodak, Rochester
Kodak Medical X-Ray Film	Kodak, Rochester
Kryoröhrchen, 2ml	TPP, Trasadingen
Kryoröhrchen BD Falcon, 15ml	BD, Franklin Lakes
Laemmli Sample Buffer, 2x	BioRad, Hercules
L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesium sulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnetic Particle Separator	ThermoFisher scientific, Rockford
Maltose solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maxima®SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Fermentas, Burlington

Material und Methoden

Membranen aus Polyvinylidenfluorid (PVDF)	BioRad, Hercules
Mineral oil	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Multiwell-Platten (96-Loch-Platten Nunclon™ Surface)	Nunc, Roskilde
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium butyrate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nuclease-Free water	Ambion lifetechnologies, Carlsbad
n-Dodecyl β -D-maltoside	Sigma-Aldrich, Steinheim
Objektträger	Roth, Karlsruhe
OPD Substrate Tablets	ThermoFisher scientific, Rockford
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, Burlington
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Passiv Lysis Buffer, 5x	Promega; Madison
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol 6000	Roth, Karlsruhe
PBS ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺	Robert Koch Institut, Berlin
PegGold Universal Agarose	PegLab, Erlangen
Phosphat-citrate Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMSF	Roth, Karlsruhe
Protease-Inhibitor cocktail	Roche, Mannheim
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden
RNase AWAY™ Decontamination Reagent	Ambion lifetechnologies, Carlsbad
Rotil®C/I	Roth, Karlsruhe
Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm	Carlroth, Karlsruhe
Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 1,0 mm	Carlroth, Karlsruhe
Rotil®Phenol/C/I-	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamide/Bis)	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium	PAA Laboratories, Pasching
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Sodium azide 99,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodium-Butyrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodium cyanoborohydride	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Roth, Karlsruhe
Sodium periodate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Spritzen Injekt® 10-und 20 ml	B. Braun, Melsungen
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sterilfilter (0,25 µm und 0,45 µm)	Sartorius Stedim, Goettingen
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
10 X Tris/Glycine/SDS buffer (Laufpuffer)	BioRad, Hercules
10 X Tris/Glycine buffer (Transferpuffer)	BioRad, Hercules
TPP-Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen
TPP-Zellkulturplatten mit 6-, 12-und 24-Kalotten	TPP, Trasadingen
TPP-Zellkulturschalen 100	TPP, Trasadingen
Tris Pufferan >= 99,3%	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% (w/w)	Biochrom, Berlin
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Ultrahyb Ultrasensitive Hybridization Buffer	Life technologies
Wasserbad-Stabilisator	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Gal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylene cyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zellschaber	TPP, Trasadingen

Material und Methoden

Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	TPP, Trasadingen
50 Ultra-clear™ Tubes 1x3 ^{1/2}	Beckman Coulter, Fullerton
Zeta probe membrane	Biorad, Hercules

6.2. Kits

	Hersteller
Advantage 2 PCR Kit	Clontech Laboratories, Mountain View
BigDye Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford
FastTrack MAG mRNA Isolation Kit	ThermoFisher scientific, Rockford
Gigapack III Gold Packaging Extract	Agilent technologies, Santa Clara
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
OligoTex mRNA Midi/Maxi	Qiagen, Hilden
OligoTex Direct mRNA Midi/Maxi	Qiagen, Hilden
Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix	Invitrogen, Carlsbad
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher scientific, Rockford
PolyFect	Qiagen, Hilden
QIAEX II GelExtraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange Lightning site-directed mutagenesis Kit	Agilent technologies (Stratagene)
RNeasy Plus Universal Mini Kit	
SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate	ThermoFisher scientific, Rockford
TopoTA Cloning Kit	ThermoFisher scientific, Rockford

Trimmer-2 cDNA normalization Kit	Evrogen, Moscow
TURBO DNA-free Kit	Ambion lifetechnologies, Carlsbad
Smart cDNA Library Konstruktion Kit	Clontech Laboratories, Mountain View

6.3. Enzyme

Restriktionsendonucleasen	Produzent
Agel	ThermoFisher scientific, Rockford
AhdI	New England Biolabs, Ipswich
Apal	ThermoFisher Fermentas, Rockford
AvrII	New England Biolabs, Ipswich
BamHI	New England Biolabs, Ipswich
Bgl II	Invitrogen, Carlsbad
BsrGI	New England Biolabs, Ipswich
BstXI	New England Biolabs, Ipswich
Clal	ThermoFisher scientific, Rockford
DrallI	ThermoFisher scientific, Rockford
HindIII	ThermoFisher scientific, Rockford
EcoRI	Invitrogen, Carlsbad
KpnI	New England Biolabs, Ipswich
MluI	New England Biolabs, Ipswich
MscI	New England Biolabs, Ipswich
NcoI	New England Biolabs, Ipswich
NdeI	New England Biolabs, Ipswich
NheI	New England Biolabs, Ipswich
NotI	ThermoFisher scientific, Rockford
PmeI	New England Biolabs, Ipswich
PvuI	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
PspXI	New England Biolabs, Ipswich
SacII	Invitrogen, Carlsbad
SfiI	ThermoFisher scientific, Rockford
SpeI	New England Biolabs, Ipswich

XbaI	Invitrogen, Carlsbad
XhoI	Invitrogen, Carlsbad
XmaI	ThermoFisher scientific, Rockford

Weitere Enzyme

DpnI	Agilent technologies, Santa Clara
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen
Protein Deglycosylation Mix	New England Biolabs, Ipswich
T4 DNA Ligase	ThermoFisher Fermentas, Rockford
T4 DNA Polymerase	ThermoFisher scientific, Rockford
T4 Polynucleotide Kinase (PNK)	ThermoFisher scientific, Rockford

6.4. Plasmide

	Bezugsquelle
Env-CIP-MMTV in pCDNA 3.1	Jula Wamara
Env-CIP-MMTV-V5 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
KEnv N-MMTV in pCDNA 3.1	Jula Wamara
KEnv N-MMTV-V5 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
HIV-Env Δ KS	RKI
MMTV- Co Env-V5 in pCDNA 3.1	RKI
mTrfR1	RKI
OriCoEnv in pCDNA 3.1	RKI
OriCoEnv Δ C1 in pCDNA 3.1	RKI
OriCoEnvN128A Δ C1 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
OriCoEnvN153A Δ C1 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
OriCoEnvEEE146-148AAA- Δ C1 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
OriCoEnvTM-IgG in pCDNA 3.1	Jula Wamara
OriCoEnvSU-Fc in pCDNA 3.1	RKI
OriCoEnv Δ SU-Fc in pCDNA 3.1	Jula Wamara
OriCoD139ASU-Fc in pCDNA 3.1	Jula Wamara
OriCo Δ 144-152SU-Fc in pCDNA 3.1	Jula Wamara

Material und Methoden

OriCoEnv Δ C1 in pCDNA 3.1	Kramer, Philipp
HML-2-OriCoEnv Δ 659-699-V5 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
HML-2-OriCoEnvD139A Δ C1 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
HML-2-OriCoEnvD139A Δ 659-699-V5 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
HML-2-OriCoEnv Δ 144-152 Δ C1 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
HML-2-OriCoEnv Δ 144-152 Δ 659-699-V5 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
HML-2-OriCoEnv-V5 in pCDNA 3.1	Jula Wamara
pCMV-StauFlag	RKI
pLVTHM	Trono Lab
pMXs-Puro	RKI
psPAX2	Trono Lab
pTF20 (HIV-1 Env; dual tropic Thunder virus)	Henning Hofmann
pVSV-G	RKI
HIV1-Env-Fc	Jula Wamara
pWPXL-GFP	Trono Lab
pWPXL-Luc	Jula Wamara; Modifizierte Version von PWPXL-GFP der Firma Trono
SCF-IgG in pCDNA 3.1	RKI
Stau1	RKI
XMRV Env-V5	RKI
XMRV-CoEnv	RKI
pCSI-XSU-Fc	Dr. Dusty Miller

6.5. Puffer und Zusammensetzung

6.5.1. Standards-Puffer

PBS	123 mM NaCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; 2,7 mM KCl; pH 7,0
TBS	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; pH 7,5
Blockingpuffer	PBS; 2,5% BSA

6.5.2. Puffer für den Westernblot

Zelllysispuffer	150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH7,7); 1% Triton-X 100; 5mM EDTA
2x Laemmli-Puffer	0,125 M Tris (pH 6,8); 20% Glycerol; 4% SDS; 0,004% Bromophenol Blue; 10% 2-mercaptoethanol
6x Laemmli-Puffer	350 mM Tris/HCl (pH 6,8); 30% Glycerol; 10% SDS; 0,1% (w/v) Bromophenolblau; 0,6 M DTT (Frisch angesetzt)
1x Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SD; pH 8.3
Blockingpuffer	4% Magermilchpulver; 1% Tween®20 in PBS ohne Mg ⁺² , ohne Ca ⁺²
Waschpuffer	0,1% Tween 20 in PBS w/o. Mg ⁺² w/o. Ca ⁺²
1x Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Ethanol; pH 8.3
Stripping Buffer	100 mM NaOH; 2% SDS; 0,5% DTT

6.5.3. Puffer für Immunofluoreszenz-Anwendungen

Permeabilisierungspuffer	PBS; 0,1% Triton X100
FACS-Puffer	PBS; 1% BSA

Material und Methoden

Resuspensionspuffer1	PBS; 3%BSA; 1% NaAzid
Resuspensionspuffer2	PBS; 1% BSA; 1%Tween 20
Blocking-Puffer 1	PBS; 1%BSA; 1% Tween 20; Hu-Fc-R-Inhibitor
Blocking-Puffer 2	PBS; 10%FCS; 1% NaAzid
Blocking-Puffer 3	1% Magermilchpulver in PBS

6.5.4. Puffer für die Gelelektrophorese

6x DNA-Ladepuffer	10mM Tris-Acetat, 50mM EDTA, 10% Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0,4% Orange-G (w/v) (Sigma) in Aqua bidest.
1x TAE	40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 7,2
RNA-Ladepuffer	50% Glycerol; 1 mM EDTA; 0,4% Bromophenolblau; 1mg/ml EtBr

6.5.5. Puffer für die Proteinaufreinigung

Waschpuffer 1	Citrat/ Phosphat-Puffer/ pH 5
Waschpuffer 2	PBS/ 0,02% Tween
Elutionspuffer	0,2 M Glycin-HCl/ pH 2,7
Neutralisationspuffer	1M Tris-HCl/ pH 9

6.5.6. Weitere Puffer

NP-40-Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl, 0,5% NP-40 (Igepal CA-630), 1mM DTT/ 1X Proteaseinhibitor cocktail (Frisch angesetzt)
DDM-Lysispuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl; 1% DDM/ Protease Inhibitor Cocktail (Frisch angesetzt)
Quencing-Lösung	PBS/ 100 mM Glycin
Blockingpuffer 4	PBS/ 5% FCS

6.5.7. Einfrierpuffer für Proteine

10% Glycerol/ 100 mM NaCl/ 1% DDM

6.6. Antikörper

Antikörper

AG 3.0

Alexa Fluor 488 Goat anti- human IgG

Alexa Fluor 680 Goat anti- mouse IgG

Alexa Fluor 790 Goat anti-rabbit IgG

Anti- human IgG HRP

Dynabeads myone streptavidin T1

Dynabeads Protein G

High Sensitivity Streptavidin-HRP

HRP-Goat anti-rabbit IgG

IRDye 680 Goat anti-human IgG (H + L)

Mouse Anti-GAPDH

Mouse Anti-human-HERV-K-Env

Mouse anti-V5 Agarose Affinity Gel

Mouse Anti V5-TAG: Alexa Fluor® 488

Mouse monoclonal anti-mCherry

Mouse anti-β-Aktin

Mouse Anti Human IgG-HRP

Mouse anti-V5-HRP

Protein- G- Sepharose, Fast Flow

Rabbit anti-Cadherin pan

Rabbit HIV1 gp41 antibody

Rabbit anti-human Caveolin-1

Rabbit anti-transferrin Receptor

Rabbit anti-Tubulin

Streptavidin AF350

Produzent

Stephen Norley und Mitarbeiter

Invitrogen, Carlsbad

Invitrogen, Carlsbad

Invitrogen, Carlsbad

Sigma-Aldrich, Steinheim

Invitrogen, Carlsbad

Invitrogen, Carlsbad

Invitrogen, Carlsbad

Invitrogen, Carlsbad

Li-Cor, Lincoln

Sigma-Aldrich, Steinheim

Austral Biologicals, San Ramon

Sigma-Aldrich, Steinheim

AbD-SeroTec-Bio-Rad, Kidlington

abD serotec, Kidlington

Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim

Invitrogen, Carlsbad

Sigma-Aldrich, Steinheim

ThermoFisher scientific, Rockford

Abbotec, San Diego

New England Biolabs, Ipswich

Abcam, Cambridge

Sigma-Aldrich, Steinheim

Invitrogen, Carlsbad

6.7. Bakterienstämme

Stamm	Quelle
E.Coli BM25.8-Blue	Clontech Laboratories, Mountain View
E.Coli XL1-Blue	Agilent technologies, Santa Clara
MAX Efficiency® Stbl2™ Competent Cells	Invitrogen, Carlsbad
One Shot® Stbl3™ Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Carlsbad
One Shot Top 10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Carlsbad

6.8. Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Quelle
22RV1	Robert Koch Institut, Berlin
293T	Robert Koch Institut, Berlin
CfTh2	Robert Koch Institut, Berlin
CrFK	Robert Koch Institut, Berlin
Hep-2 (ATCC® CCL-23™)	ATCC, Manassas
NCI-60 cellline panel	Mic

6.9. Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Invitrogen, Carlsbad
Penicillin/ Streptomycin (10 U/μl/ 10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetracyclin hydrochloride >=95%	Roth, Karlsruhe

6.10. Nährmedien für die Bakterienkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
LB-Medium	1% Bacto Hefe Extrakt, 1% NaCl, pH 7,0	RKI, Berlin
LB-Agar	LB-Medium mit 20g/l Agar	RKI-Berlin
SOB-Medium	20 g Bacto-Tryptone; 5 g Bacto-Yeast-Extract; 0,186 g KCl; 0,584 g NaCl ad. 970 ml H ₂ O, pH 7,0	Invitrogen, Carlsbad
SOC-Medium	SOB/ 20 mM Glucose; 1% Mg-Mix.	Invitrogen, Carlsbad

6.11. Wachstumsmedien für eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM Low Glucose complete	DMEM Low Glucose; 2 mM L- Glutamin; 10% FCS; 0,5% Streptomycin/ Penicillin (10 U/μl/ 10 mg/ml)
RPMI 1640 complete	RPMI 1640; 2 mM L- Glutamin; 10% FCS; 0,5% Streptomycin/ Penicillin (10 U/μl/ 10 mg/ml)

6.12. Geräte

	Hersteller
Alphalmager 2200 Alpha	Innotech, Kasendorf
Assistant Rollenmischer RM5 348	Karl Hecht, Sondheim
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
BioRad Mini Protean II system	Biorad, Hercules
Brutschränke	Heraeus, Hanau
CO ₂ Incubator C200	Labotect, Göttingen
Coulter particle count and size analyzer Z2	Beckman Coulter, Fullerton
DNA Engine® Peltier Thermocycler	Biorad, Hercules
Ecotron-Schüttler	Infors HT, Bottmingen
Eis-Maschine	Ziegra, Isernhagen
Electrophoresis Power Supplies	Biorad, Hercules
FACS Calibur HTS flow cytometer	BD Biosciences, San Jose
Feinwaage Kern €G	Sartorius Weighing Technology, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axio 100	Zeiss, Göttingen
HB-500 Minidizer™ Hybridization Oven	UVP, Upland
Heizblock	Grant instruments, Cambridgeshire
Heraeus Fresco 21 centrifuge	ThermoFisher scientific, Rockford
Horizontalschüttler GFL 3008	GFL, Burgwedel
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL, Burgwedel
Inkubator	Memmert, Schwabach
Inkubator shakers Innova	New Brunswick Scientific, Edison
Inverse Lichtmikroskop Opton ID 03	Zeiss, Göttingen
Konfokales Laser Mikroskop LSM 780	Zeiss, Oberkochen
Lab dancer	IKA, Staufen
Laborabzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Laborbank Nunc™	Nunc, Roskilde
Labsonic® M	Sartorius, Goettingen
Magnetrührer IKA® RCT classic	IKA, Staufen
Microfuge 1S-R	ThermoFisher scientific, Rockford

Material und Methoden

Microprocessor pH-Meter HI 223	Hanna instruments, Sao Paulo
Mikroplatte Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Mikroplatte Spektrophotometer	ThermoFisher scientific, Rockford
Multiskan GO	
Mikrotiterplatte Photometer Tecan Sunrise	Tecan, Männedorf
Multifuge 1S-R	ThermoFisher scientific, Rockford
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR®, Bad Homburg
Optima™ L-100K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt
Plattform-Schüttler Polymax 2040	Heidolph instruments, Schwabach
Power Pac-HC/-200/-Basic	Biorad, Hercules
Präzisionswaage PR803	Mettler toledo, Gießen
Pumpe P-1	Amershambiosciences, Uppsala
Rockingplattform VWR™	VWR, Darmstadt
Röntgenfilm X-Ray	Agfa, Mortsel
Entwicklungsmaschine CURIX 60	
Scout™ Pro Waage	Ohaus, Nänikon
Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington
NanoDrop®	
Sub-CellGT Agarose GelElectrophoresis system	Biorad, Hercules
Sterilarbeitsbank HERASafe	Kendro, Langenselbold
Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer	BioRad, Hercules
Transilluminator UV-Licht	Biostep, Jahnsdorf
Tube-Strip Picofuge	Stratagene, La Jolla
UV-Lampe	Vilber Lourmat, Marne la vallée
Vakuumpumpe VP 86	VWR, Leuven
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia

Material und Methoden

Vortexer

Wärmeschrank

Wasserbad GFL®

Zentrifuge Multifuge® 1S-R

Zentrifuge 5804R

Zentrifuge 5810 R

Zentrifuge 5415D

Roth, Karlsruhe

Heraeus, Hanau

Köttermann, Uetze/Hänigsen

Heraeus, Hanau

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

7. Methoden

7.1. DNA-Analyse

7.1.1. Vervielfältigung von DNA-Abschnitten

Die Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten erfolgte mittels Polymerasenkettenreaktion.

Der Reaktionsansatz setzte sich standardmäßig wie folgt zusammen:

- 1 bis 100 ng Template DNA
- 10x Polymerase Puffer 2 μ l
- Primer 1 (10 μ M) 1 μ l
- Primer 2 (10 μ M) 1 μ l
- dNTP-Mix (2, 5 mM) 1 μ l
- DNA-Polymerase (2, 5 U/ μ l) 1 μ l

Mit Bidest H₂O auffüllen auf 20,0 μ l

Die Reaktionsbedingungen lauteten:

1.	1 min	95° C	Initiale Denaturierung	
2.	30 sec	95° C	Denaturierung	
3.	30 sec	54 bis 65° C	Primer-Annealing	20 bis 30 x
4.	2 min pro kb	68° C	Elongation	
5.	7 min	68° C	Finale Elongation	
6.	∞	4° C	Abkühlung	

7.1.2. Restriktionsverdau von DNA

Zwecks Klonierung oder Kontrolle wurden DNA-Abschnitte innerhalb einer spezifischen Sequenz mittels Restriktionsendonucleasen geschnitten.

Ein Restriktionsverdau-Ansatz setzte sich standargemäß wie folgt zusammen:

Material und Methoden

- 0,1 bis 5 µg Template DNA
 - 10x Endonuclease Puffer 2 µl
 - je Restriktionsendonuclease 1 µl
 - ggf. 10X BSA 2 µl
-
- Mit Bdest H₂O auffüllen auf 20 µl

Die Reaktion erfolgte laut hersteller`s Angaben unter folgenden Bedingungen:

1. 30 min bis 2 h Inkubationszeit; T° in Abhängigkeit der angesetzten Endonucleasen
2. 20 min Hitze-Inaktivierung der Endonuclease⁵; T° in Abhängigkeit der angesetzten Endonucleasen
3. ∞ 4°C Abkühlung

7.1.3. Verdau mit einer Desoxynuclease (DNase)

Wenn keine DNA erwünscht war, wurde die Probe vor bzw. nach Durchführung der Analyse mit einer DNase I behandelt. Letztere spaltet die Esterbindung zwischen dem 5'-Phosphat eines Nucleotids und der 3'-Hydroxylgruppe des benachbarten Nucleotids und führt so zur Fragmentierung eines DNA-Moleküls. Für den Verdau wurde der Turbo DNA-free Kit von Invitrogen verwendet. Dabei wurde das „rigorous DNase treatment“- Protokoll herangezogen [59]. Es wurde gemäß Angaben von Hersteller verfahren.

Pro Ansatz wurden 10 µl der Ausgangsprobe eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

⁵ Für Endonucleasen, die nicht hitze-inaktiviert werden können, wurde eine Phenol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation der DNA oder eine Aufreinigung der DNA mittels Qiaquick PCR-Purification Kit von Qiagen vorgenommen.

Material und Methoden

- 0,2 µg/ µl Nucleinsäure 10 µl
 - 10x Turbo DNase Puffer 1 µl
 - Turbo DNase 1 µl
-

Die Probe wurde für 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend daran wurde ein weiteres Volumen von 1 µl Turbo DNase zugegeben und es wurde unter den o.g. Bedingungen weiter inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der „DNase Inactivation Reagent“ zugegeben und die Probe wurde für 5 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung der DNase und weitere unerwünschten Komponente aus der Nucleinsäurenprobe wurde die Probe für 1,5 min bei 10000 xg zentrifugiert und den Überstand in einem frischen Eppi transferiert.

Gelegentlich, und wenn kein schonender Verdau der DNA notwendig war, wurde die DNase I von Qiagen für den Verdau eingesetzt. In diesem Fall wurde der Verdau wie folgt durchgeführt:

- 0,2 µg/ µl Nucleinsäure 10 µl
 - 10x DNase I Puffer 2 µl
 - DNase I 2 µl
- Mit Bidest H₂O auffüllen auf 20 µl
-

Die Probe wurde für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend daran erfolgte eine Hitze-Inaktivierung der DNase für 20 min und bei 75° C.

7.1.4. Aufreinigung von DNA

1. Gelextraktion von DNA

DNA-Fragmente, die auf ein Agarosegel aufgetragen wurde, wurde für weiterführende Analysen nach Ablauf der Gelelektrophorese aus dem Gel extrahiert. Dabei wurde mithilfe von UV-Licht die Fragmente sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell

herausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte mit dem Extraktionskit von Qiagen laut hersteller's Angaben.

2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Für das weitere experimentelle Vorgehen wurden DNA-Abschnitte, die in PCR-Reaktionen vervielfältigt wurden, mittels Qiaquick PCR- Purification Kit von Qiagen gemäß hersteller's Angaben aufgereinigt. Dabei wurden DNA-Fragmente größer als 100 bp auf ein Silica-Resin adsorbiert und nach mehreren Waschrissen mit H₂O eluiert.

3. Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA

Eine Phenol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation wurde angewendet, um DNA-Moleküle nach einem Restriktionsverdau mit Nicht-Hitze-Inaktivierbaren Endonucleasen (siehe auch Punkt 7.1.2) oder nach Synthese von ds-cDNA aufzureinigen. Zur Aufreinigung von ds-cDNA nach Abschluss der Synthesereaktion wurde vor der Extraktion die Probe mit Proteinase K behandelt, dieser Schritt diente der Inaktivierung der DNA-Polymerase. Die Extraktion erfolgte hierbei nach dem Protokoll der Firma Clotech Laboratories.

4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Isolierung erfolgte gemäß Hersteller's Angaben. Im Kleinmaßstab wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit und im Großmaßstab der Endo-free Plasmid Maxi Kit von QIAgen verwendet.

7.1.5. Sequenzierung von DNA

Zur Ermittlung von Sequenzen von Plasmid-DNA wurde eine PCR gemäß interner Arbeitsanweisung durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der BigDye-Kit von ABI Terminator Chemie, ein Vorgemisch von Reagenzien für Sanger-Sequenzierungs-Reaktionen, verwendet.

Der Sequenzierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 x ABI-Puffer 2 µl
- Big Dye 3.1 1 µl

• Vorwärts- oder	
Rückwärtsprimer	0,5 µl
• 0,2 µg Plasmid DNA	
Mit Bidest H ₂ O auffüllen auf 10 µl	

Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1.	1 min	95° C	Initiale Denaturierung
2.	10 sec	96° C	24 x
3.	10 sec	50° C	
4.	4 min	60° C	
6.	∞	4°C	

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proben für die Sequenzanalyse zum Sequenzierungslabor weitergeleitet. Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit dem MegAlign-Tool der Software Lasergene von der Firma DNA-Star.

7.1.6. Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR wurde dort angesetzt, wo eine spezifische Veränderung der DNA-Sequenz erzielt wurde.

Folgende Verfahren wurden dafür verwendet:

7.1.7. Site-Directed Mutagenesis

Diese Methode erlaubt die Veränderung einer dsDNA und wurde zum Einfügen von einer Mutation an einer spezifischen Stelle innerhalb eines Plasmids angewendet. Zu diesem Zweck wurde der QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent zur Hilfe gezogen.

Die PCR-Reaktion setzte sich aus nachfolgenden Komponenten zusammen:

10x Reaktion-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix	1 µl
DNA-Template (100 ng)	-
Primer 1 (10 µM-Working solution)	1 µl

Primer 2 (10 μ M-Working solution)	1 μ l
Quick change Enzyme	1 μ l
Mit Bidest H ₂ O auffüllen auf	25 μ l

Reaktionsbedingungen

1.	2 min	95° C	Initiale Denaturierung
2.	20 sec	95° C	
3.	30 sec	55° C	30 Zyklen; Amplifikationsphase
4.	30 sec/kb	65° C	
5.	5 min	65° C	
6.	∞	4° C	

Nach dem Ablauf der PCR wurde der Probe 1 μ l der Restriktionsendonuclease Dpn I, welches ausschließlich methylierte DNA verdaut, zugegeben. Die Probe wurde anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Verdauung der DNA-Template und jeder weiteren methylierten dsDNA.

7.1.8. Fusion-PCR

Das Erzeugen von einer spezifischen mutierten DNA-Sequenz mittels Fusion-PCR erfolgte in zwei Schritten und benötigten vier Primers, wobei die zwei mutagenen Primers komplementär zueinander sein mussten. Im ersten Schritt wurden zwei separaten PCR angefahren, dabei wurde bei jeder PCR ein mutagener und ein flankierender Primer angesetzt. Im zweiten Schritt, vereinigte man beide Fragmente und führte man eine PCR durch. Da beide Fragmente im Bereich der angesetzten mutagenen Primers komplementär waren, hybridisierten sie im Verlauf der PCR. Flankierende Primers wurden hierbei angesetzt, um das Fusionfragment bis zu den flankierenden Sequenzen zu vervollständigen und die entstandenen Stränge zu vervielfältigen. Für die PCR-Reaktionen wurde der Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix von Invitrogen verwendet.

Die Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

1. PCR zur Erzeugung der ersten zwei Fragmente

DNA-Template (50 ng)	-
DMSO	0,6 µl
Flankierender Primer (10 µM-Working solution)	1 µl
Mutagener Primer (10 µM-Working solution)	1 µl
2x Phusion Mastermix	10 µl
Mit Bidest H ₂ O auffüllen auf	20 µl

2. Fusion-PCR

Fragment 1 und 2 (1:100 verdünnt)	Je 5 µl
DMSO	0,6 µl
2x Phusion Mastermix	10 µl
Vorwärts flankierender Primer (10 µM)	1 µl
Rückwärts flankierender Primer (10 µM)	1 µl
Mit Bidest H ₂ O auffüllen auf	20 µl

Reaktionsbedingungen

1.	30 sec	98° C	Initiale Denaturierung
2.	10 sec	98° C	
3.	10 sec	72° C	25 Zyklen; Amplifikationsphase
4.	30 sec/kb	72° C	
5.	10 min	72° C	
6.	∞	4° C	

7.1.9. Gradient-PCR

Die Gradient-PCR wurde eingesetzt, um optimale PCR-Bedingungen für ein DNA-Vervielfältigungsvorhaben zu ermitteln oder, wenn das gewünschte Produkt in vorherigen PCR-Reaktionen unzureichend gebildet wurde.

Zu diesem Zweck wurden mehrere PCR-Reaktionen parallel durchgeführt, wobei die Hybridisierungstemperatur und die Konzentration von MgCl₂ variiert wurden, letztere variierte zwischen 0 und 2 mM. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen einer Standard-PCR, wie im Punkt 7.1.1 bereits beschrieben. Anschließend daran erfolgte

• 10x Ligase Puffer	2 µl
Mit Bidest H ₂ O auffüllen auf	20 µl

Folgende Formel wurde angewendet, um die DNA-Menge zu ermitteln:

$$\text{Masse (Fragment)} = \frac{\text{Masse (Vektor)} * \text{Größe (Fragment)}}{\text{Größe (Vektor)}} * \text{Verhältnissfaktor}$$

Die Probe wurde anschließend bei 37°C für 1 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

7.1.11. cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde der Smart cDNA Library Konstruktion Kit der Firma Clon Tech eingesetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte laut Hersteller's Angaben. Vor der PCR wurde das Ausgangsmaterial mit DNase verdaut (siehe auch 7.1.3), um unerwünschte DNA von der Probe zu eliminieren. Dafür wurde der Turbo DNA-free Kit von Invitrogen verwendet.

7.1.12. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA in einer Probe wurde mittels Nanodrop bestimmt. Dafür wurde nach Kalibrierung des Geräts mit dem DNA- Lösungsmittel 1 µl der DNA- Probe auf die Vorrichtung vorsichtig pipettiert und die Konzentration gemäß hersteller`s Angaben bestimmt.

7.1.13. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden die DNA-Proben auf einem Agarosegel aufgetragen. Der prozentuale Anteil von Agarose im Gel bestimmt die Porengröße. Die negativgeladene DNA-Stücke wandern in angelegtem elektrischem Feld in Richtung der positiv geladenen Anode und werden bei ihrer Wanderung durch das Maschennetz vom Agarosegel behindert. Je kürzer und kompakter die Fragmente sind, desto schneller wandern sie zur Anode.

Material und Methoden

Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente wurde dem Gel ein DNA-Interkalierendes Agens, Ethidiumbromid oder GelRed, beigefügt. Es wurden 1 bis 1,5-%ige Gele gemäß folgender Standard-Vorgehensweise hergestellt:

- 1 bis 1,5 g Agarose
- 1x TAE-Puffer 100 ml
- EtBr oder GelRed 1 μ l

Auf $\sim 95^{\circ}\text{C}$ für 5 min erhitzen

Das Gel wurde zur Verfestigung in einer Gelkammer mit entsprechendem Kamm gegossen.

Die DNA wurde wie folgt vorbereitet und anschließend in die Geltaschen aufgetragen:

- 10 bis 20 μ l DNA-Lösung
- 6x TAE-Puffer 4 μ l

Mit Bidest H₂O auffüllen auf 24 μ l

Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein Molekulargewichtstandard der Firma Fermentas in eine separate Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 1x TAE Puffer bei einer Spannung von 80 bis 100 V. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde das Gel mittels Alphamager-Gerät der Firma Innotec UV-bestrahlt und abschließend abfotografiert.

7.2. Protein-Analytik

7.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Protein-Aufreinigung gemäß Angaben vom Hersteller. Dazu wurde den Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet.

7.2.2. p24-ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ist eine immunbasierte Methode, mit derer Hilfe, über eine Farbreaktion, die Menge eines Antigens in der Probe quantifiziert werden kann. Die Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet, um das HIV-Capsid-Protein p24 zu quantifizieren und damit die Konzentration von reifen Virus-Like-Partikeln in einer Probe zu bestimmen. Dazu wurden 96-Well-Mikrotiterplatten mit dem Antikörper AG 3.0 in Bicarbont-Puffer (von Stephen Norley zur Verfügung gestellt) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert, anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen und die Platten für eine Stunde mit 2% Milchpulver in PBS für eine Stunde bei 37°C blockiert und dreimal mit PBS/ 0,05% Tween gewaschen. Die Proben wurden mit 0,2% Tween für 5 min bei Raumtemperatur inaktiviert und anschließend, in einer Verdünnungsreihe mit PBS/ 2% Milchpulver/ 0,05% Tween (PMT), in die Vertiefungen der Platten aufgetragen. Ein Standard diente als Positivkontrolle (von Steven Norley zur Verfügung gestellt). Die Inkubation der Proben erfolgte für eine Stunde bei 37°C mit anschließendem dreimaligem Waschen der Platten mit PBS/ 0,05% Tween. Nachfolgend wurde ein In- PMT- Verdünnter HIV-Pool-Plasma (von Steven Norley) in die Vertiefungen aufgetragen und die Platten für 30 Minuten inkubiert. Es folgte daraus weitere Waschschrte mit PBS/ 0,05% Tween mit anschließender Inkubation mit einem 1:1000- In- PMT- Verdünnten α -Human-IgG-HRP für 30 min bei 37°C. Erneut wurde mehrmals gewaschen. Der Nachweis der Bindung des Antikörpers am Antigen erfolgte indirekt über die Umsetzungsreaktion von o-Phenylenediamin Dihydrochlorid (OPD) durch die am Antikörper gekoppelte Peroxidase. Dazu wurde eine OPD-Tablette gemäß Hersteller' s Angaben (Sigma-Aldrich) in Phosphat- Citrat- Puffer gelöst und in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Zum Start der enzymkatalysierten Reaktion wurde eine 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung dazu gegeben. Hierbei korrelierte die Intensität des gebildeten gelblichen Produkts mit der Menge an p24. Die Nachweisreaktion wurde durch Zugabe von 25% Schwefelsäure gestoppt und die Messung des durch den Farbstoff absorbierten Lichts erfolgte mit dem Sunrise Mikrotiterplatte- Photometer der Firma Tecan bei einer Wellenlänge von 492/620 nm.

7.2.3. SDS-PAGE

Standardmäßig wurden Proteine unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und nachgewiesen. Dazu bedienen wir uns der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), bei der sie im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierbei erfolgte die Trennung in Anwesenheit vom anionischen Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat), dessen Ladung die der Proteine zu überdecken vermag.

Für die Auftrennung wurden die Proteinproben in 6x Lämmli-Puffer aufgenommen und zur Denaturierung für 10 min bei 70° C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Letzteres bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Ersteres diente der Proteinstapelung, während die eigentliche Proteinauftrennung im Trenngel erfolgte. In der untenstehenden Tabelle 3 ist die Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels aufgelistet.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels

	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
Bidest H₂O	2,85 ml	3,4 ml
30% Acrylamid	850 µl	4,0 ml
1,5 M Tris	–	2,5 ml
0,5 M Tris	1,25 ml	–
10% SDS	50 µl	100 µl
APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Zusammensetzung vom **Lämmli- 6x Puffer**

- 350 mM Tris-HCl (pH 6,8)
- 10% (w/v) SDS
- 30% Glycerol
- 0,1% (w/v) Bromphenolblau

- 0,6 M DTT (Frisch angesetzt)

Als Größenstandard wurde der Proteinmarker „*Pageruler Prestained Protein Ladder*“ (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte im BioRad Mini Protean II System für die ersten 10 Minuten bei 100 V und anschließend bei 180 V für ca. 40 min in 1X Tris-Glycine (Laufpuffer). Nach Ablauf der Trennung erfolgte einen Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (siehe untenstehender Punkt 7.2.4).

7.2.4. Western blot

Mittels Western blot wurden Proteine, die auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen wurden, mithilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht.

Transfer:

Zur Ausführung eines Proteinnachweises wurden zunächst die Proteine nach Beendigung vom SDS-PAGE nach dem *Semidry*-Verfahren auf eine Membran transferiert. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für 20 min in Transferpuffer inkubiert. Parallel dazu wurde die Nitrocellulose-Membran für 5 min ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde das Gel und die Nitrocellulose-Membran zwischen zwei Filterpapiere, die in Transferpuffer getränkt wurden, platziert und in eine Blotkammer eingesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 20 V für ca. 40 min.

Visualisierung der Banden:

Die Kontrolle eines erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels Ponceau-Färbung mit einer nach internen Angaben hergestellten Lösung. Dazu wurden die Membran in PBS/ 1% Tween gewaschen und anschließend für 5 min in der Ponceau- Lösung inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss daran intensiv mit Wasser gewaschen, bis die Proteinbanden gut zu sehen waren. Alternativ wurde eine *Coomassie-Blue*- oder Silverfärbung des Polyacrylamidgels durchgeführt.

Blocking der Membran:

Nach Abschluss des Transfers erfolgte eine Blockierung der Membran für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 5% Milchpulver/ 1% Tween in PBS.

Immunologischer Nachweis der Proteine

Proteine wurden in einer immunologischen Reaktion mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Zunächst wurde der sog. primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:2500 in PBS/ 0,5% Milchpulver/ 1% Tween mit der Membran inkubiert. Die Inkubation erfolgte entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit anschließendem dreimaligem Waschen der Membran mit PBS/ 1% Tween, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nachfolgend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, welcher entweder mit der Meerrettich Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) oder mit einer fluoreszierenden chemischen Gruppe kovalent verknüpft war, und in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung, für 1 h bei RT in PBS/ 0,5% Milchpulver/ 1% Tween inkubiert. Im Falle eines Fluoreszenzantikörpers wurde die Membran lichtgeschützt mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Daran schlossen sich vier Waschschriffe mit PBS/ 1% Tween an.

Detektion des Signals

Der Nachweis des Proteins erfolgte durch die Detektion einer Chemilumineszenz, wobei die Lumineszenzreaktion auf den Umsatz des Substrats Luminol durch die am sekundären Antikörper gekoppelte HRP zurückzuführen war. Zur Entwicklung und Detektion des Signals wurde ein Chemilumineszenz-HRP-Detektionskit angesetzt. Es wurde gemäß Angaben des Herstellers verfahren. Dazu wurde die Membran in einer Expositionskassette fixiert, die Substratlösung wurde darauf getropft und ein Röntgenfilm der Firma AGFA aufgelegt. Die Entwicklung des belichteten Röntgenfilms erfolgte an der Entwicklungsmaschine CURIX 60 der Firma AGFA. Alternativ wurde die Fluoreszenz des am sekundären Antikörper gebundenen Fluorochroms detektiert. Nach den nachfolgenden lichtgeschützten Waschschriffen wurden die Banden mit Hilfe des Odyssey® Infrared Imaging System detektiert.

7.2.5. Fluoreszenz-Mikroskopie

1. Immunfärbung zur Detektion von Cytosolisch-exprimierten Proteinen

Cytosolisch-exprimierte Proteine wurden intrazellulär mittels Immunfluoreszenz detektiert. Dazu wurden die nachzuweisenden Proteine mit spezifischen

Fluoreszenz-Gekoppelten Antikörpern zur Reaktion gebracht und die Interaktion mit Hilfe des konfokalen Laser- Mikroskops LSM 780 (Zeiss) detektiert.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf einem Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Transfektion der Zellen mit dem nachzuweisenden Protein erfolgte am nächsten Tag (Zur Transfektion siehe auch 7.3.4). Zwei Tage später wurde die Zellen nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS mit 1 ml 2% Paraformaldehyd für 30 Minuten fixiert und anschließend dreimal für je 15 Minuten mit PBS gewaschen. Die nachfolgende Zugabe von PBS/ 0,5% Triton X-100 für 30 min erzielte die Permeabilisierung der Zellmembran.

Nachfolgend wurde die Zellen dreimal je 15 min mit PBS gewaschen und anschließend in PBS/ 1% Milchpulver für 1 Stunde bei RT inkubiert. Dieser Schritt ermöglichte die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen dreimal je 15 min mit PBS gewaschen und anschließend bei RT für 1h mit einem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 in PBS/ 1% Milchpulver und im Dunkel inkubiert. Es folgte daraus weitere Waschschrte mit PBS und eine zusätzliche Inkubation mit 2% Paraformaldehyd für 30 Min.

Falls erforderlich wurden kein primärer Antikörper eingesetzt und die Zellen direkt mit einem Fluoreszenz -Antikörper inkubiert.

Zwecks einer Färbung des Zellkerns folgte daraus drei Waschschrte mit PBS mit anschließender Inkubation mit einer 1:30.000- DAPI-Lösung in PBS für 30 min.

Die Zellen wurden nachfolgend mehrmals gewaschen und je 20 µl Mowiol wurde dazu getropft. Die so eingebetteten Zellen wurden mit einem Objektträger überdeckt und das fertige Präparat wurde bis zur Mikroskopie lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

2. Konfokal- Fluoreszenz-mikroskopische Detektion von Immunadhäsion an Plasmamembran-Gebundenen Proteine

Zur Detektion der Bindung vom Immunadhäsion auf der Plasmamembran mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurde die Zellen in Vertiefungen einer Zellkulturplatte ausgesät und zur Regenerierung von Rezeptoren für mindestens 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 3 Stunden unter

Zellkulturbedingungen mit dem Immunadhäsin in einer Endkonzentration von 59 nM bis 77 nM. Das Medium wurde nachfolgend abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 2% PFA in warmen PBS fixiert. Ein Waschschrift folgte daraus und im Anschluss daran eine Inkubation für 30 min bei RT in PBA/ 3%BSA/ 1% NaAzid. Nach drei weiteren Waschschriften in PBS erfolgte die Inkubation mit dem anti-human-AF 488 1:250 verdünnt in PBS/ 3% BSA für 45 min bei RT. Weitere Waschschriften schloßen sich daran und die Zellen wurden mit Moviol benetzt und bis zur Mikroskopie in Dunkel bei 4°C gelagert.

7.2.6. Durchflusszytometrie

1. Vorbereitung von eukaryotischen Zellen für die Detektion von intrazellulärer Fluoreszenz

Routinemäßig, um Zellen in die Durchflusszytometrie analysieren zu können, wurde nach Ablauf der Inkubationsperiode das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Eine anschließende Trypsinierung erfolgte, wobei die Zellen sehr gut vereinzelt und nachfolgend für 10 min bei 900 rpm zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde in PBS/ 1% Tween 20/ 1% BSA aufgenommen und die Suspension vorsichtig bei niedriger Drehzahl vorgetext und anschließend durch einen Zellsieb durchsiebt, um Zellklumpen zu entfernen. Abschließend wurde die Zellsuspension in Micronic- Röhrchen übertragen und Paraformaldehyd (PFA) einer Endkonzentration von 2% dazugegeben.

Sollte die Fluoreszenz über die spezifische intrazelluläre Bindung eines Fluoreszenzgekoppelten Antikörpers zustande kommen, mussten zunächst die Zellen permeabilisiert werden. Dazu wurden Sie nach der Fixierung mit PFA zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von PBS/ 0,1% Triton X100 und anschließende Inkubation für 15 min bei RT permeabilisiert. Ein Waschschrift bei 2000 rpm für 4 min folgte daraus und pro 1 Mio. Zellen wurden für 30 min auf Eis mit 20 µl Hu-Fc-R-Inhibitor in PBS/ 1% Tween 20/ 1% BSA, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, inkubiert. Nachfolgend wurde der Fluoreszenzgekoppelten Antikörper 1:100- bis 1: 250-Verdünnt dazu gegeben und für 30 min bei RT und im Dunkel inkubiert. Vier weitere Waschschriften folgten daraus und die Zellen wurden im Anschluss in 1% PFA resuspendiert und lichtgeschützt zum Messgerät gebracht.

2. Direktes Bindung-Assay zur Detektion der Bindung vom Immunadhäsins auf Plasmamembran-Gebundenen Proteine

Zur Detektion der Bindung von Immunadhäsinen auf der Zelloberfläche wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, wobei verschiedene Versuchsparameter, wie z.B. ob die Zellen in Suspension oder in einem adherierten Zustand mit dem Immunadhäsins zu inkubieren waren, die anzusetzende Menge an Immunadhäsins, die Inkubationsdauer, die Temperatur der verschiedenen Vorbereitungsphasen, die anzusetzenden Reagenzien, ihre Konzentration und Inkubationsdauer, optimiert wurden. Basiert auf die erhaltenen Versuchsdaten wurden folgende experimentelle Bedingungen bei dem Nachweis der Bindung von Immunadhäsins an Plasmamembran-gebundenen Proteine angewendet:

1,5 Mio. Zellen wurden auf eine 6-Well-Platte ausgesät, gleichzeitig wurde das aufgereinigte Protein-Präparat zugegeben, letzteres wurde immer zuerst 1:100 verdünnt und anschließend in einer Endkonzentration von 59 nM zupipettiert. Um eine Regenerierung von Plasmamembranproteinen zu erlauben, erfolgte die Inkubation unter Zellkulturbedingungen für einen Zeitraum länger als 6 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS/ 1% BSA Eiskalt gewaschen und anschließend in Suspension gebracht. Dabei wurde auf die Verwendung von Trypsin verzichtet und stattdessen wurden die Zellen vorsichtig geschabt, um sie vom Zellkulturgefäß abzulösen. Es wurde für 10 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert und die Zellen wurden in kaltem PBS/ 10% FCS/ 1% Na-Azid resuspendiert und mit anti-human-IgG-AF488 1:100 in PBS/ 3% BSA für 30 min auf Eis und im Dunkel inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen dreimal mit PBS-Eiskalt für je 10 min und 1000 rpm gewaschen und anschließend in PBS 1% BSA/ 1% NaAzid resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3. Test auf Viabilität von Zellen

Für den Nachweis der Oberflächenbindung vom Immunadhäsins HML-2-SU-h-Fc mittels Durchflusszytometrie war das von großer Bedeutung, nicht viable, permeabilisierte Zellen von der Auswertung auszuschließen. Aus diesem Grund wurde zu jeder Messung eine Viabilitätfärbung mitgeführt. Dazu wurde anschließend

zur Vorbereitung der Zellen für die Messung 1 µl PI zu den Zellen zugegeben und die Zellen, die FL2-H-positiv waren, von der Auswertung ausgeschlossen.

7.2.7. Biotinylierung von Plasmamembranproteinen

Zur Markierung von Plasmamembranproteinen mit einem Biotin-Molekül wurden die Zellen in T75-Zellkulturflächen bis auf einen Konfluenzgrad von 100% kultiviert und nach einem zweimaligen Waschen mit PBS-Eiskalt wurden der Zellrasen mit 1ml PBS-Eiskalt bedeckt. EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin der Firma Pierce, dieses Amin-Reaktive Reagenz markiert Oberflächenproteine mit Biotin, wurde auf RT temperiert und in RNase-freies H₂O gemäß Hersteller's Angaben gelöst und die Zellen wurden damit in einer Endkonzentration von 0,8 µg/µl inkubiert. Hierbei erfolgte die Inkubation für 30 min auf Eis und unter Schwenken. Alternativ erfolgte die Biotinylierung mit dem Aminoxy- Biotin- Reagenz der Firma Biotium (siehe unten „*Biotinylierung mittels Aminoxy-Biotin*“) Im ersteren Fall und um die gebildeten Protein-Biotin-Komplexe zu stabilisieren, wurde im Anschluss daran eine *Quencing*-Lösung bestehend aus PBS/ 100 mM Glycin zugegeben. Die Lösung wurde in Anschluss daran abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit je 8 ml *Quencing*-Lösung gewaschen. Folglich wurde der Zellrasen mit 1 ml *Quencing*-Lösung bedeckt und mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig abgelöst. Nach Vereinigung der Zellen in einem 50 ml-Röhrchen wurde bei 500g für 3 min pelletiert. Es folgte daraus zwei weiteren Waschgänge mit 1 x TBS. Die anschließende Zellyse erfolgte mit DDM-Lysispuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl; 1% DDM/ Protease Inhibitor Cocktail (Frisch angesetzt)). Hierbei wurde DDM- Lysispuffer aufgrund seiner milden und Nicht- Denaturierenden Eigenschaften ausgewählt.

Um die Homogenität des Zellmaterials zu verbessern, wurden die aufgeschlossenen Zellen nachfolgend 5-mal und in Abständen von 10 min sonifiziert. Nach jedem Sonifikationsgang wurden sie auf Eis gelegt.

Anschließend erfolgte ein Pelletieren bei 10000g für 3 min und 4°C. Das Zellysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Biotinylierung mittels Aminoxy-Biotins

Die Biotinylierung mit dem Reagenz Aminoxy-Biotin erfolgte, indem die Zellen beim Erreichen eines Konfluenzgrades von 80% von dem Zellkulturmedium befreit und mit

PBS-Kalt gewaschen wurden. Nachfolgend zur Inkubation mit dem Immunadhäsın HML-2-SU-hFc und zu den daran anschließenden Waschschrıten wurde mit Natrium meta-periodate einer Endkonzentration von 1mM oxidiert. Die Inkubation erfolgte hierbei für 20 min im Dunkel und bei 4°C. Es wurde pro Zellkulturflasche 6 ml der Lösung eingesetzt. Das anschließende Quencing erfolgte mittels Zugabe von Glycerol in einer Endkonzentration von 1 mM mit nachfolgenden Waschschrıten in PBS/ 5% FCS. Es wurde im nächsten Schritt 100 µM Aminooxy-Biotin sowie 10 mM Aniline zugegeben und für eine Stunde bei 4°C und unter Schwenken inkubiert. Zwei Waschschrıte mit jeweils PBS/ 5%FCS und PBS folgten daraus und die Zellen wurden im Anschluss geschabt, bei 400 g und 4°C pelletiert und für weitere Anwendungen bei -20°C aufbewahrt.

7.2.8. Pulldown von Plasmamembranproteinen

Plasmamembranproteine, die mit dem Immunadhäsın HML-SU-hFc reagierten, wurden mittels Pulldown isoliert, wobei die Affinitätsaufreinigung der Plasmamembranproteine über eine Kopplung von letzteren an Biotin erfolgte (Zur Biotinylierung siehe auch Punkt 7.2.7). Dazu wurden zwei nativen Isolierungsverfahren eingesetzt:

1. Invitro Crosslinking von HML-2h-Fc und nachfolgender Pulldown

Bei dieser ersten Herangehensweise wurde ein zum Zweck der vorliegenden Arbeit modifiziertes Protokoll Zeng [64] und von Feng Gong [60] eingesetzt. Hierbei wurde durch Zugabe von Affinitätsaufgereinigtem HML-SU-hFc zu resuspendierten Zellen und anschließenden Cross-linking mit BS3 die Interaktionen von HML-2-h-Fc mit Plasmamembrankomponenten fixiert. Im nächsten Schritt wurde mit einem Plasmamembranundurchlässigen Biotinylierungsreagenz inkubiert, dies wurde bereits im Punkt 7.2.7 beschrieben. Daraus folgte eine mehrschrittige Aufreinigungsprozedur, wobei als erstes eine Trennung der Proteinfractionen aufgrund der Affinität zu Protein G durchgeführt wurde. Die weiteren Schritte stützten sich auf die Affinität von Biotin zu Streptavidin, um die Plasmamembranproteinfraktion aufzureinigen. Die entsprechende Affinitätsaufreinigung stimmt überein mit denen, die im nachfolgenden Punkt 7.2.8.2 beschrieben sind, mit der Ausnahme, dass nach der Preinkubation mit den Protein

G-eingebetteten Kugeln, das Eluat zur Weiterverarbeitung aufgehoben wurde, denn es enthielt die in Frage-Kommenden Proteine.

2. Biotinylierung von Plasmamembranproteinen und nachfolgender Pulldown von HML-2-h-Fc

Dahingegen fokussierte die zweite Variante zuerst auf die Isolierung der Plasmamembranproteinfraktion mittels Streptavidin-Affinität mit einer späteren Inkubation der solubilisierten Proteine mit HML-SU-hFc. Im nachfolgend ist die zweite Vorgehensweise dargestellt. Es wurde hierbei 4 x T75-Flasche pro Pulldown benötigt.

Preinkubation von Protein G-eingebetteten paramagnetischen Kugeln

Der Protein G-Träger wurde in PBS/ 5% BSA für 30 min und Rotieren bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit 500 µl DDM-Lysispuffer gewaschen.

Preclearance des Lysats

Um eine Aufreinigung der Zelllysate-Bestandteile aufgrund einer Reaktivität mit Protein-G zu vermeiden, wurde das Zelllysate mit den geblockten Protein-G-Paramagnetischen Kugeln für über zwei Stunden und unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Damit wurden Protein-G-Reaktive Bestandteile aus dem Zelllysate entfernt. Der Überstand wurde zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Affinitätsaufreinigung von biotinylierten Zelloberflächenproteinen

Der Überstand aus der so eben erwähnten *Preclearance* des Lysats stellte nun die Proteinfraktion dar, die mit Protein-G nicht reaktiv war. Dieser wurde anschließend mit Streptavidin-gebundenen Paramagnetischen Kugeln M270 der Firma Invitrogen für 45 min und unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Anschließend daran wurden die Beads 5-mal mit PBS gewaschen. Dieser Schritt diente der Trennung und spezifischen Haftung der Plasmamembranfraktion an die Matrix.

Inkubation der paramagnetischen Streptavidin-Kugeln mit einer Affinitätsaufgereinigten HML-SU-hFc.

In diesem Schritt wurden die so eben erwähnten Streptavidin-Beads mit HML-2-SU-hFc inkubiert. Es wurde 200 µl einer 0,59 µg/µl den Beads zugegeben und Übernacht bei 4°C und Rotieren inkubiert. Am nachfolgenden Tag erfolgte ein fünfmaliges sanftes Waschen der Beads. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 µl 0,1% SDS und fünfminütiges Erhitzen bei 95°C in der Mikrowelle. Die Proteine im Eluat wurde in Western blot nachgewiesen.

7.2.9. Puffer-Umtausch/ Proteinaufkonzentrierung

Der letzte Schritt einer Protein-Aufreinigung bestand in den Umtausch des Eluat-Puffers. Auch Zwecks Aufkonzentrierung einer großvolumen proteinhaltigen Lösung wurde die Methode angewendet.

In beiden Fällen wurde der Amicon- Ultra-15 Centrifugal Filter 30 kDa der Firma Sigma-Aldrich gemäß Angaben vom Hersteller verwendet. Als erster Schritt wurde den Filter gewaschen. Dies erfolgte durch Ausfüllen vom letzteren mit 10 ml PBS und Zentrifugieren für 5 min bei 4000 rpm. Nachfolgend wurde die proteinhaltige Lösung auf 12 ml mit PBS verdünnt und dem Filter hinzupipettiert und für 1h bei 4000 rpm zentrifugiert. Es folgte drei weitere Runden von Zugabe von 10 ml PBS und Zentrifugieren für 5 min bei 4000 rpm. Die so aufkonzentrierte Lösung wurde entnommen, in 10% Glycerol/ 100 mM NaCl/ 1% DDM resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

7.2.10. Proteinaufreinigung mit Protein G-Beads

Die Aufreinigung von h-IgG-gekoppelten Proteinen aus Lysaten erfolgte mittels paramagnetisch gekoppeltem Protein-G (Dynabeads von Invitrogen) gemäß Hersteller's Protokoll. Beads und Proteinhaltige Lösung (Lysat) standen dabei in einem Verhältnis von 1: 2.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die in Suspension befindlichen Protein-G-gekoppelten Beads im Magnetfeld gelegt (Magnetic particle Separator von ThermoFisher scientific) und der Überstand verworfen. Nachfolgend erfolgte einen viermaligen Waschgang mit je 1,5 ml -Citrat-Phosphat-Puffer/ pH 5. Anschließend wurde die h-IgG- gekoppelte Protein-haltige Lösung den Beads zugegeben und 40

min unter Rotieren bei RT inkubiert. Es folgte daraus mehrere Waschgänge mit PBS/ 0,02% Tween. Die anschließende Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 50 µl 0,2 M Glycine-HCl/ pH 2,7. Dazu wurde für 5 min bei 4°C und unter Schütteln inkubiert. Der Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Proteinkonzentrat zur Neutralisation in 1M Tris-HCl/ pH 9 des gleichen Volumens pipettiert und bis zum Umtausch des Puffers bei 4°C aufbewahrt (zum Puffer-Umtausch siehe 7.2.9).

7.2.11. Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung von Proteinen in großen Volumina wurde die Affinitätschromatographie angesetzt. Dazu wurden zunächst die proteinhaltigen Zellkulturüberstände zweifach in PBS verdünnt und mittels einer Pumpe in die Säule HiTrap Protein-G-HP der Firma GE Healthcare Life sciences abgeleitet. Es folgte daraus mehrere Waschgänge der Säule mit PBS. Die anschließende Elution des Proteins erfolgte mittels 0,2 M Glycine-HCl/ pH 2,7 mit anschließender Neutralisation in 1M Tris-HCl/ pH 9 und Pufferumtausch (zum Puffer-Umtausch siehe 7.2.9).

7.3. Zellkultur

7.3.1. Einfrieren und Auftauen

Für eine Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden sie pelletiert und anschließend in 90% FCS/10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellzahl betrug 1 Mio. pro Kryoröhrchen. Die Röhrchen wurden in Isopropanol eingetaucht und zum langsamen Einfrieren über Nacht bei -70°C weggefroren. Der Transfer in flüssigen Stickstoff erfolgte am folgenden Tag. Das Auftauen für eine weitere Kultivierung erfolgte möglichst schnell im 37°C-Wasserbad. Alternativ wurden die Zellen in der Hand erwärmt. Die Zellen wurden einmal in Zellkulturmedium gewaschen und anschließend in frisches Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Zellkulturgefäß übertragen und unter Zellkulturbedingungen gehalten. Ein vollständiges Mediumwechsel erfolgte am nachfolgenden Tag.

7.3.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde entweder eine Neubauer-Zählkammer oder den *Coulter Counter Z2* verwendet. Bei der ersteren wurden der Mittelwert von vier

ausgezählten Großquadraten mit 10.000 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Das Ergebnis entsprach die Zellzahl pro ml. Zur Bestimmung der Zellzahl mit dem *Coulter Counter* wurden die Zellen 1:1000 in isotonischer Lösung verdünnt und die Zellsuspension unter der Messvorrichtung gestellt. Die Messung erfolgte gemäß Angaben des Herstellers.

7.3.3. Subkultivierung von adhärennten Zellen

Die Zellen wurden in Kultur gehalten, indem sie regelmäßig passagiert wurden. Dazu wurde bei Erreichen einer Konfluenz von 70% das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS o/w. Ca^{+2} , Mg^{+2} gewaschen. Anschließend wurde Trypsin/EDTA zu den Zellrasen zugegeben und für 2 Minuten bei RT inkubiert. Der Vorgang wurde mikroskopisch überwacht und das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche durch Klopfen der Flaschen an den Knollen unterstützt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium gestoppt. Im Anschluss wurde ein Zehntel der Zellsuspension in Wachstumsmedium aufgenommen, die Flaschen wurden geschwenkt und im Brutschrank bei 37° C und 5% CO_2 zurückgestellt.

7.3.4. Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Transfektion erfolgte entweder mit dem PolyFect-Reagenz von Qiagen entsprechend der Angaben vom Hersteller oder mit einer intern zubereiteten 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -Konzentrierte Polyethylenimin (PEI)- Lösung. Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen ausgesät. Dazu wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt und die entsprechende Zellzahl in das Zellkulturgefäß überführt und bei 37° C und 5% CO_2 inkubiert. Die Transfektion erfolgte am nachfolgenden Tag mit der dazu nötigen DNA-Menge, diese wurde im Fall von PolyFect vom Hersteller angegeben und es wurde nach der Prozedur des Herstellers (Qiagen) herangegangen.

Für die Transfektion mit dem PEI-Reagenz wurde für eine T150-Flasche 25 μg DNA benötigt. PEI und DNA lagen dabei in einem Verhältnis von 8:1. Die Mischung aus PEI, DNA und Serum- freies- Medium wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend den Zellen zugegeben.

Zusätzlich wurde den Zellen einer Natrium-Byturat-Lösung in der Endkonzentration von 2 mM gegeben. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag. Die Zellernte erfolgte zwei oder drei Tage später.

7.3.5. Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Lysispuffer. Je nach Lokalisation des Infragekommende zellulären Moleküles und dessen spätere Anwendung wurden unterschiedliche Lysispuffer (Zu den Lysispuffern siehe Punkte 6.5.2 und 6.5.6) eingesetzt. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Der Zellrasen wurde mit dem Lysispuffer bedeckt und die Zellen wurden mittels eines Schabers von der Oberfläche abgelöst und die Suspension in ein frisches Röhrchen bzw. Eppi übertragen. Die Inkubation mit dem Lysispuffer erfolgte unter Schütteln bzw. Rotieren für 15 bis 30 min. Nach Ablauf der Inkubation erfolgte ein Pelletieren bei 12000 rpm für 10 min. Das Lysat wurde anschließend entnommen und bei 20°C gelagert.

7.3.6. Herstellung und Aufkonzentrierung von Virus-Like-Partikeln

Ein Gentransfer erfolgte, indem Virus-Like-Partikeln als Vektoren verwendet wurden und mittels Eintrittsvorgang das in-Frage-Kommende- Gen in die Zielzellen einschleusten. Für diese Transduktionsversuche mussten zunächst die Partikeln generiert werden. Dazu wurden die Produzenten, 293T-Zellen, mit den Expressionskonstrukten PWPXL, psPAX2, beide des Labors Trono, und dem Env-Expressionsplasmid transfiziert und für weitere 48 bis 72 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ in Kultur gehalten. Nach einläufigen Optimierungsversuchen wurde das Verhältnis der drei Konstrukten bei der Transfektion auf 4:3:1 festgelegt. Die Transfektion erfolgte wie im Punkt 7.3.4 bereits beschrieben. Nach Ablauf der Inkubationsperiode wurde das virushaltige Zellkulturmedium abgenommen, für 10 min bei 900 rpm zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer zu pelletieren, und mit Hilfe eines 0,45 µm-Filters sterilfiltriert und nachfolgend auf einen 20% Sucrose-Kissen in Ultrazentrifugationsröhrchen, welche zuvor zur Desinfektion in 70% Ethanol für 5 min geschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen wurden, vorsichtig pipettiert und bei 32.000 rpm für zwei einhalb Stunden ultrazentrifugiert. Dies erfolgte

mit dem SW32T1-Rotor in der Beckman-Optima-L1000K Ultrazentrifuge. Nach Ablauf der Ultrazentrifugation, wurde der Überstand verworfen und die Ultrazentrifugationsröhrchen bei 4°C für 30 min gelegt, um das Einweichen des Viruspellets zu erlauben. Anschließend wurde das Viruspellet in 100 µl eiskaltem PBS resuspendiert und à 5 bis 10 µl-Aliquots für späteren Einsätze bei -80°C eingelagert.

7.3.7. Transduktion von Virus-Like-Partikeln

Die Virusmenge für die Transduktion wurde in einem vorab durchgeführten p24-ELISA (siehe Punkt 7.2.2) bestimmt. Zur Transduktion wurde die aufkonzentrierte Virussuspension dem frischen Zellkulturmedium zugegeben sowie Polybrene einer Endkonzentration von 8 µg/ml. Das Gemisch wurde auf die Zellen vorsichtig pipettiert und letztere wurden anschließend bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Zwei Stunden nach der Transduktion wurde das Medium vollständig durch frisches Medium ersetzt und die Zellen wurden für weitere 24 bis 48 Stunden inkubiert. Nachfolgend wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und für weitere Anwendungen entsprechend vorbereitet.

Falls das Erfassen eines spezifischen Virusentritts Ziel der Untersuchung war, wurde auf Polybrene verzichtet und stattdessen der Gentransfer durch Spinoculation erreicht. Dazu wurde das virushaltige frische Zellkulturmedium für 2 Stunden bei 2500 rpm und 32°C zentrifugiert. Anschließend wurde wie oben so eben beschrieben weiterverfahren.

7.3.8. Quantifizierung der Transgenexpression von transduzierten Zellen mittels Luciferase-Assay

Für die Quantifizierung der Expression des Reporter-Proteins Luciferase als Indikator für den erfolgreichen Viruseintritt in die Zielzellen wurden die Zellen nach dem Waschen mit eiskaltem PBS, wie im Punkt 7.3.6 bereits beschrieben, mit 50 µl vom Hersteller gelieferten Lyse-Puffer 1x Passivlysis-Puffer (PLB; Promega) versetzt und geschwabt. Ein zusätzliches Volumen von 50 µl Passivlysis-Puffer (PLB) wurde anschließend dazu addiert und die Zellen wurden bei -80°C für 20 min weggefroren und nachfolgend bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Zum Pelletieren wurden sie bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und jeweils 10 µl des Zellysats wurde in die

Messplatten transferiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte am Luminometer nach internen Anweisungen.

7.3.9. Kultivierung von Bakterienstämmen

Die Vermehrung eines Bakterienstammes erfolgte in entsprechendem und vom Lieferanten vorgegebenen Kulturmedium. Dazu wurde das Kulturmedium in ein Kulturgefäß übertragen, hierbei konnte es sich je nach Anwendung um ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen oder einen Erlenmeyerkolben handeln. Das Medium wurde gemäß Angaben des Bakterienstammlieferanten auf eine bestimmte Temperatur vorgewärmt. Anschließend daran wurde 1 bis 200 μl der Bakteriensuspension darin angeimpft. Das Zellwachstum erfolgte unter ständigem Schütteln bei einer Temperatur gemäß Vorgaben des Lieferanten.

7.3.10. Konservierung von Bakterienstämmen

Zur Konservierung von Bakterienstämmen wurden Glycerolstocks angelegt. Dazu wurden 400 μl einer frischen Bakterienkultur in 600 μl Glycerin aufgenommen. Der Stock wurde bei -80°C gelagert.

7.3.11. Gentransfer in Prokaryoten (Bakterielle Transformation)

1. Transformation von elektrokompetenten Zellen

Zur Transformation von Elektro-kompetenten Bakterien bediente man sich der Elektroporation. Hierbei wird durch einen kurzen elektrischen Impuls die Zellmembran für DNA aus der Umgebung durchlässig gemacht. Die Zellen wurden kurz vor der Elektroporation aufgetaut und mit 2 μl Plasmid-DNA einer Konzentration von mindestens 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ gemischt. Die Suspension wurde nachfolgend mit einer sterilen Pasteurpipette in eine Elektroporationsküvette übertragen und die Küvette im Elektroporator platziert. Die Transformation erfolgte durch einen Impuls von 2,5 kV bei 25 μF und 300 Ω . Anschließend daran wurde sofort 1ml temperiertes SOC-Medium (SOB/ 20 mM Glucose) dazugegeben und die Suspension für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde, um eine selektive Vermehrung der transformierten Bakterien zu ermöglichen, die Bakteriensuspension auf eine LB-Agar mit Antibiotikum aufgetragen und bei 37°C über Nacht oder RT für zwei bis drei Tage inkubiert.

2. Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Das Einschleusen von fremden Plasmiden in chemisch kompetenten bakteriellen Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend 20 µl eines Ligationsansatzes oder 50 bis 500 ng extrachromosomaler DNA vorsichtig zugesetzt. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert, nachfolgend für 30 bis 45 sec und in ein 42°C warmes Wasserbad eingetaucht und unmittelbar danach auf Eis transferiert. Nach zweiminütiger Inkubation wurde 500 µl eines 37°C vorgewärmten SOC-Mediums der Bakteriensuspension zugegeben, anschließend und zur Regenerierung die Zellsuspension für eine Stunde, bei 37° C und leichtem Schütteln bei 205 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Suspension bei 3400 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. 450 µl Überstand wurden abdekantiert und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Verschiedene Volumina dieser Suspension wurden auf selektive LB-Agars ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Brutschrank und bei 37°C. Alternativ wurden die Platten für zwei bis drei Tage bei RT inkubiert.

8. Ergebnisse

8.1. Optimierung der Produktion von HIV-basierten Viruspartikeln für die Infektionsversuche

Für die Produktion von pseudotypisierten viralen Partikeln wurde ein lentivirales Expressionssystem ausgewählt. Dieses bestand aus dem lentiviralen Vektor pWPXL, dem Verpackungsplasmid psPAX2 sowie einem Envelope-Plasmid. Ersteres Plasmid, ein auf HIV-1 basiertes lentivirales Transferplasmid, trägt das Reportergen EGFP sowie das Verpackungssignal Psi. psPAX2 codiert für die virale Proteine Gag, Pol, Rev und Tat. pWPXL und psPAX2 wurden freundlicherweise von Didier Trono zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid # 12257; [http://n2t.net/addgene: 12257](http://n2t.net/addgene:12257) ; RRID: Agggene_12257).

293T- Zellen dienten als Virus-Produzenten. Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit produzierten Virus-Like-Partikels (VLPs) waren daher HIV-basierte Viren, die entweder ein modifiziertes HML-2-Env- Protein trugen, das C-Terminus trunkierte OriCo-Env- Δ 659-699, denn letzteres erwies sich in einer vorherigen Arbeit als der beste Virus-Eintrittsvermittler⁶. Für die Produktion von Positivkontrolle-VLPs wurde ein Envelope-Plasmid, welches für das VSV-G-Hüllprotein codiert, verwendet. Zur Optimierung der Virusproduktion wurden verschiedene Faktoren getestet und ggf. optimiert. Dazu zählen das Verhältnis der verschiedenen Plasmide bei der Transfektion, die posttransfektionelle Inkubationsdauer bis zur Virusernte und die Verwendung von Zusätzen zur Verstärkung der Virusproduktion. Die Virusproduktion erfolgte laut internem Protokoll, dabei dienten 293T als Virusproduzenten. Eine nähere Beschreibung der Vorgehensweise ist im Abschnitt 7.3.6 im „Methoden“-Teil zu finden. Die nachstehenden Abbildung 9 bis Abbildung 11 dokumentieren die Ergebnisse der Optimierungsversuche.

8.1.1. Verhältnis der Plasmide für die Virusproduktion.

Verschiedene Verhältnisse bei der Transfektion zwischen den für die Bildung von infektiösen Viruspartikeln notwendigen Konstrukten PWPXL, psPAX2 und das Envelope-Konstrukt wurden untersucht. Hierbei wurden die Menge an PWPXL und

⁶ P. Kramer, Untersuchungen zum Hüllprotein und dem Tropismus des humanen endogenen Retrovirus K

Ergebnisse

Env-codierenden Plasmide in den Transfektionsansätzen variiert. Nach der Virus-Ernte und Ultrazentrifugation wurden die zu transduzierenden Zellen mit einer normalisierten p24-Konzentration inkubiert. Hep2 wurden mit VSV-G-Pseudotypen und SKMe128 mit HML-2-VLP inkubiert, wobei die p24-Konzentration für die Untersuchung jeweils 500 und 100 ng betrug. Abbildung 9 stellt die Ergebnisse des Transduktionsversuchs mit Hep2- Zellen dar und Abbildung 10 gibt die Ergebnisse für die Zelllinie SKMe128 wieder. Man erkennt in der erstgenannten Abbildung eine erhöhte Infektiosität der Virus-Like-Partikel, die mit vier Anteilen von PWPXL-Vektor produziert wurden verglichen mit den VLPs, deren Produktion mit elf Anteilen PWPXL erfolgte. Hierbei wies das Vektor-Verhältnis von 4:3:1 die höchste Infektionsrate von allen angesetzten Verhältnissen auf. Dies ist durch den am höchsten liegenden Punkt in der Verlaufskurve der Abbildung 9 deutlich zu erkennen.

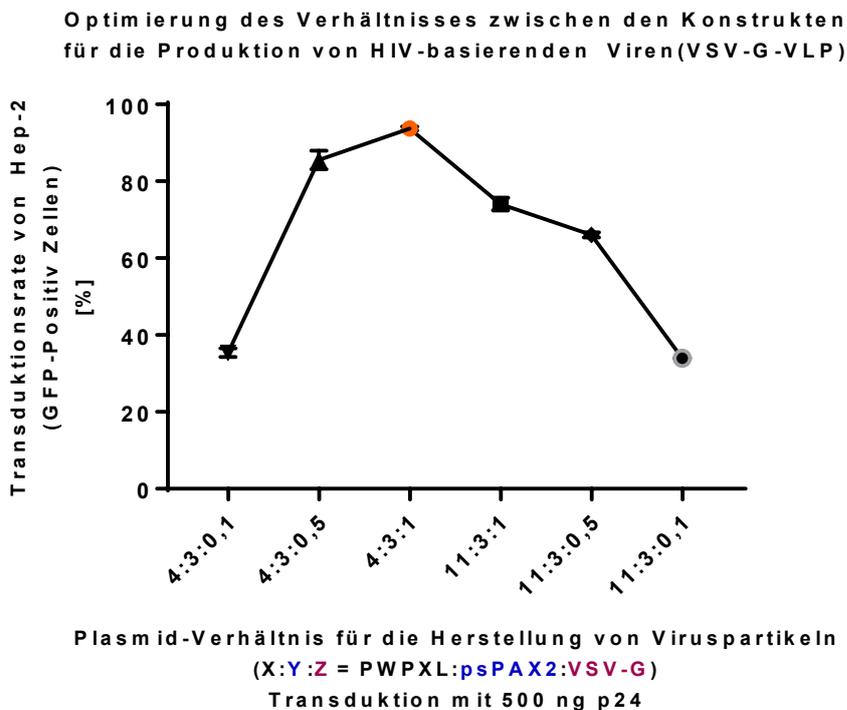


Abbildung 9: Optimierung des Verhältnisses zwischen den Konstrukten für die Produktion von HIV-basierten Viren. 293T-Zellen wurden zur Produktion von VLPs mit Plasmid-DNA transfiziert, wobei das Verhältnis der einzelnen Konstrukte zur Virusproduktion variiert wurde. Anschließend wurden Hep-2-Zellen mit den hergestellten VSV-G-HIV-Viren infiziert. Die Zählung von grünfluoreszierenden Zellen erfolgte zwei bis drei Tage nach der Infektion.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in einem vergleichbaren Versuch SKMe128 mit VLPs inkubiert. Letzteren wurden mit einer gleichbleibenden Menge

Ergebnisse

von PWPXL-Vektor aber unterschiedlichen Mengen von dem HML-2-Env-Expressionsvektor produziert. Es wurde für die Virusproduktion, ausgehend von dem im Versuch mit VSV-G-VLPs und Hep2- Zellen höchsten Transduktionswert, der mit einem Plasmid-Verhältnis von 4:3:1 bei der Virusproduktion erreicht wurde, weitere Verhältnisse von 4:3:3 und 4:3:0,3 zwischen PWPXL: psPAX2: Env getestet. Die normalisierte p24-Konzentration wurde auf 100 ng/ml angepasst, denn SKMel28 zeichneten sich in Transduktionsversuchen mit HML-2-VLP durch eine bessere Empfindlichkeit für diese VLPs als Hep2 für VSV-G-Pseudoviren aus. Auf diesen Befund wird später in dieser Arbeit näher eingegangen.

Die Ergebnisse dieses so aufgebauten Versuchs sind in der nachstehenden Abbildung 10 darlegt. Von den Zellpopulationen, die bei der Auswertung in Betracht gezogen wurden und die für die eingesetzten Verhältnisse von 4:3:3, 4:3:1 und 4:3:0,3 einen prozentualen Anteil an der gesamtbehandelten Population von jeweils 76,43 %, 82,34% und 53,16% betragen, wurden jeweils 31,27%, 47,20% bzw. 2,14% erfolgreich transduzierte Zellen gezählt. Dieses Ergebnis bestätigt den im vorherigen Versuch erhaltenen Befund und zeigt klar, dass unabhängig vom eingesetzten Env-Expressionsvektor das Verhältnis zwischen den Expressionsvektoren von **4:3:1** die beste Transduktionsrate liefert. Eine Verdreifachung vom Env- exprimierenden Plasmid im Virusproduktionsverfahren führte zu keiner Steigerung der Infektiosität der resultierenden Pseudoviren.

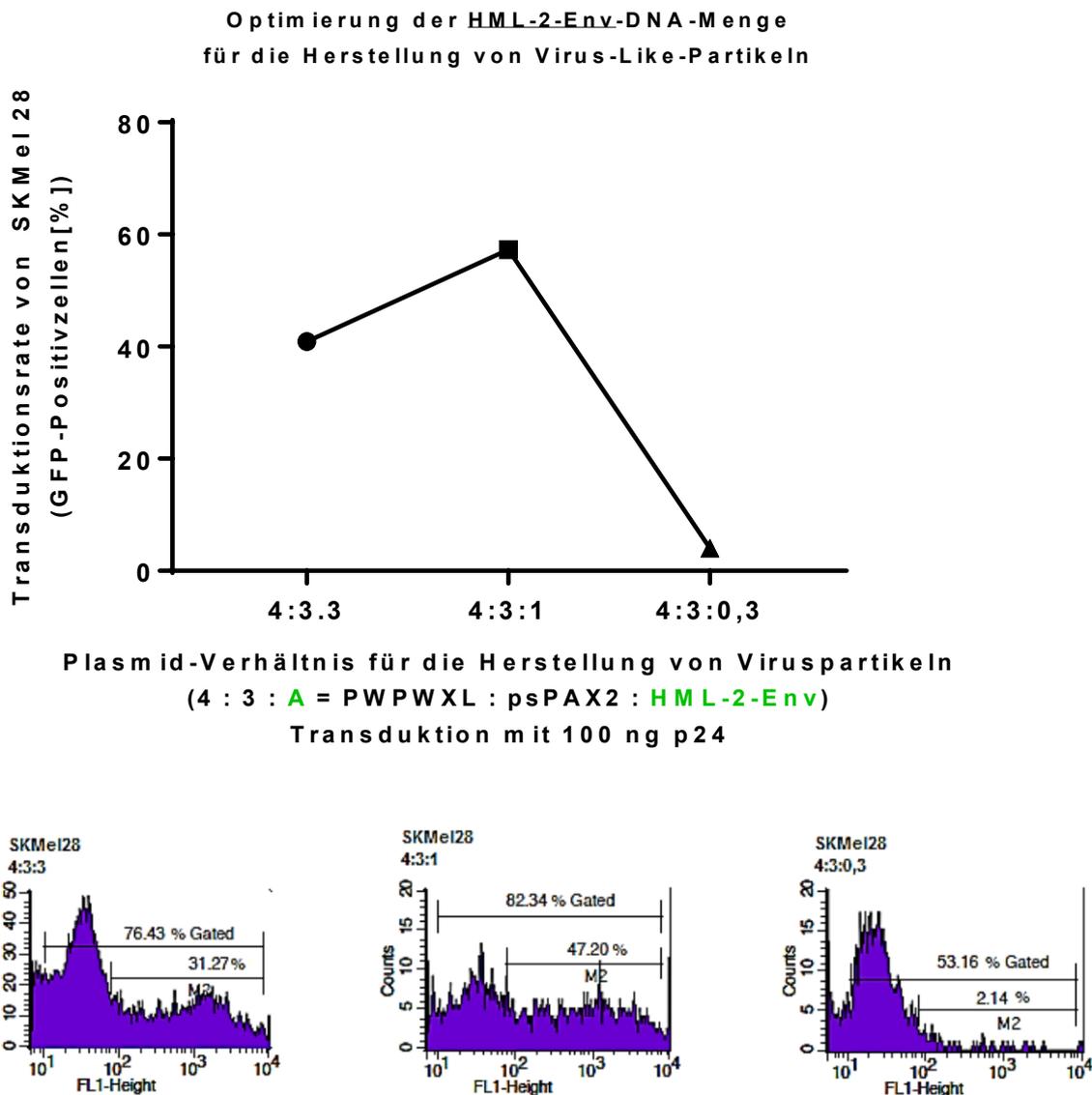


Abbildung 10: Optimierung der HML-2-Env-DNA-Menge für die Herstellung von Virus-Like-Partikeln.

8.1.2. Zellkulturzusatz

Eine positive Wirkung des Zellkulturzusatzstoffs Natrium-Butyrat auf die Produktion von viralen Partikeln wurde ebenfalls untersucht. Letzterer bewirkt in den Zellen eine Hemmung der Aktivität des Enzyms Acetyltransferase, welches für die Chromatin-Kondensation verantwortlich ist, und demzufolge eine Inhibition der Regulation der Transkription. Die Aufhebung der Regulation resultiert wiederum in einer höheren Translation, und somit einer Steigerung der Proteinproduktion. Die Abbildung 11 bezeugt diesen Effekt. In der Tat ist eine verstärkte Expression des Proteins p24 nach Zugabe von 2 mM Natrium-Butyrat zu der Zellkultur zweifellos zu erkennen. Der

verstärkende Effekt betrug hierbei bis zum 9-fachen des Ursprünglichen. Wie bereits erwähnt, diente das HIV-Capsid-Protein p24 als Marker für die Quantifizierung von im Zellkultur-Überstand abgegebenen reifen viralen Partikeln. Natrium-Butyrat unterstützt und erhöht erheblich die Produktion von HIV-basierten Pseudoviren.

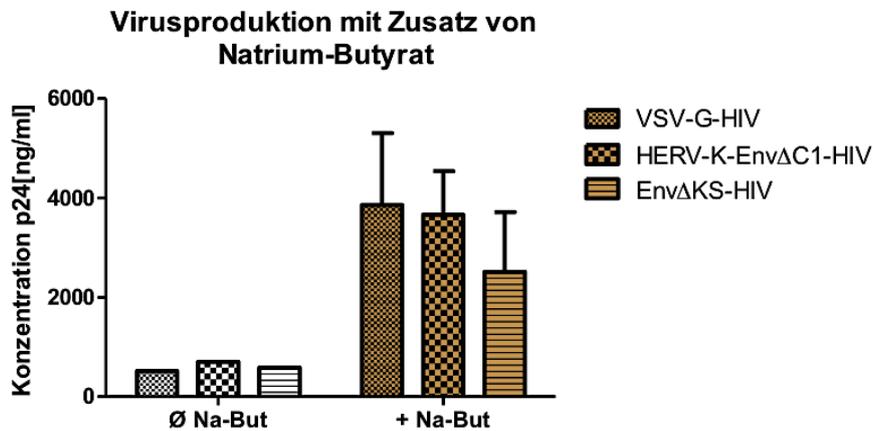


Abbildung 11: Optimierung der Virusproduktion in 293T. 293T-Zellen wurden mit den Konstrukten PWPXL, psPAX2 und dem Env-Konstrukt HERV-K-OriCoEnvΔC1(HML-2-Env), HIV-EnvΔKS oder VSV-G transfiziert. Der virushaltige-Überstand wurde jeden dritten Tag geerntet und ggf. die Zellen mit frischem Medium weiterkultiviert. Die Konzentration von HIV- Capsid-Protein p24 im Zellkulturüberstand diente als Indikator für die im Medium abgegebenen reifen viralen Partikel. Zusatz von 2 mM Natrium-Butyrat bei der Transfektion, um eine Verstärkung der Produktion von viralen Partikeln zu erzielen.

8.2. Permissivität von ausgewählten Zelllinien gegenüber HML-2-Env pseudotypisierten HIV- basierten Viren

CrFK, Cf2Th und Hep2

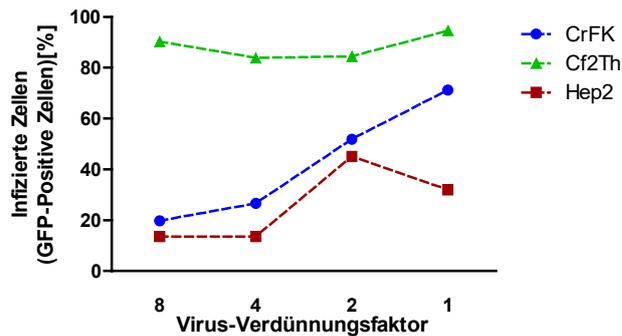
In früheren Experimenten erwiesen sich die feline kidney CrFK- sowie die Canis familiaris thymus Cf2Th- Zelllinien als die sich mit HML-2-Virus-Like-Partikeln am besten zu infizierenden Zelllinien, während sich Hep2-Zellen mit den VLPs nicht transduzieren ließen⁶. Da eine cDNA-Bibliothek aus permissiven Zellen hergestellt werden sollte, wurde zur Bestätigung des Befunds ein anderes System als in der vorangegangenen Studie⁶ gewählt. In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung wurden, wie bereits im Abschnitt 8.1 erläutert, HIV-basierte Viren angewendet, die jedoch als Hauptdeterminante des Zelltropismus das HML-2- Envelope-Protein trugen.

Den oben genannten Zellen wurden eine Verdünnungsreihe von normalisierten HML-2-Env-Pseudoviren zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen unter Bedingungen kultiviert, die eine Transduktion erlaubten. Ein Parallel-Ansatz mit VSV-G-HIV-

Ergebnisse

Pseudotypen diente als Positivkontrolle. Alle Viren trugen als Indikator für einen erfolgreichen Eintritt in die Zelle das Gen für das Grün-Fluoreszierende Protein GFP, so dass die Anzahl von positiv transduzierten Zellen drei Tage nach Transduktion mittels durchflusszytometrischer Zählung von grün-fluoreszierenden Zellen bestimmt werden konnte.

Kontrollansatz: Infektion mit VSV-G pseudotypisierten HIV-viralen Partikeln



Infektion mit HML2-Env pseudotypisierten HIV-viralen Partikeln

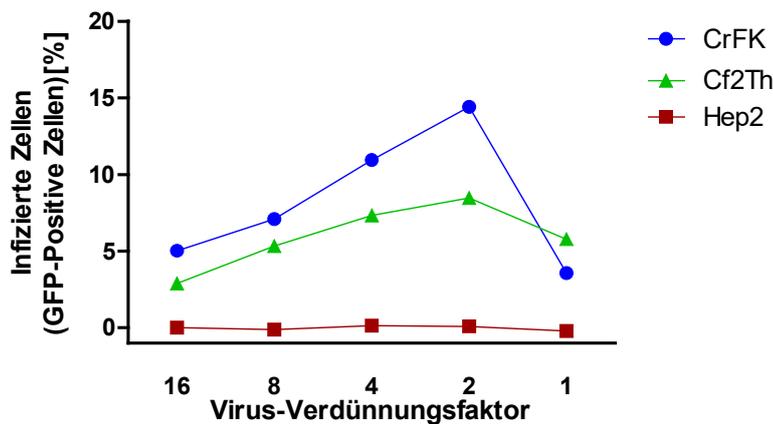


Abbildung 12: Transduktion von HML-2-Env-HIV-Pseudotypen in CrFK, Cf2Th- und Hep2- Zellen.

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der Untersuchung. Es ist zu beobachten, dass sowohl CrFK als auch Cf2Th eine deutlich höhere Anzahl an GFP-positiv-Zellen aufweisen als die Hep2- Zellen, die wahrscheinlich nicht durch HML-2-Env-VLPs infiziert werden können. Bereits bei der in diesem Versuch am höchsten angesetzten Virusverdünnungsstufe von 1:16 liegt die Anzahl an CrFK-Zellen, die mit dem HML-2-Env-pseudo-HIV infiziert wurden, bei circa 5% und höher als die von Hep2-Zellen. Bei einer Transduktion von der gleichen Virusmenge in Cf2Th wurde 2,89% mehr grün-fluoreszierende Zellen gezählt als in Hep2-Zellen. Die prozentuale Menge an

grünfluoreszierenden Zellen stieg dabei linear mit ansteigender Virusmenge. Der höchste Wert lag für die CrFK-Zellen bei ca. 14,4%. Für die vom Hundestammenden Thymuszellen Cf2Th betrug die höchste prozentuale Anzahl von transduzierten Zellen ca. 8,5 %. Im Gegensatz dazu blieb die prozentuale Anzahl von transduzierten Hep2 mit steigender Virusmenge und im Gegensatz zur VSV-G-Kontrolle-VLP (siehe auch Abbildung 9) quasi unverändert. Die Tatsache, dass letztere Zelllinie für VSV-G- aber nicht für HML-2-Env-VLP rezeptiv ist, liefert den starken Hinweis, dass beide Envelope-Proteine unterschiedliche Zelloberfläche-Adhäsionsmoleküle nutzen. Der Rückgang der Anzahl an GFP-Positivzellen bei der höchsten angesetzten Virusmenge ist höchswahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen bei dieser Viruskonzentration extrem belastet und daher in großer Menge lysiert wurden.

8.3. Untersuchungen zur HML-2-Env-Rezeptor-bindenden Domäne (RBD)

8.3.1. Konstruktion, Expressionsnachweis und funktionelle Untersuchung von HML-2-OriCoEnv-RBD-Mutanten D139A und Δ 144-152.

8.3.1.1. Konstruktion und Expressionsnachweis

Die Sequenz zur Expression des Codon-optimierten Envelopeproteins von HERV-K(HML-2), OriCoEnv, wurde im Rahmen von vorangehenden Untersuchungen generiert [61]. Die OriCoEnv-Sequenz stellt das putative ursprüngliche HML-2-Hüllprotein dar, wie sie zum Zeitpunkt der viralen Integration ins humane Genom vor ca. 600.000 Jahren aufgebaut war [61]. Die Mutante OriCoEnv Δ 659-699, die in der Abbildung 13A oben als OriCoEnvStop659 bezeichnet wurde, wurde im Rahmen einer weiteren Studie hergestellt⁶. Diese Deletionsmutante, bei der ein Stopp-Codon an der Position 659 des originalen Konstrukts hinzugefügt wurde, erzielte die besten Entry-Ereignisse in den untersuchten Zelllinien⁶.

Eine potentielle Rezeptor-Bindungsstelle (RBS) von HML-2-Env wurde mithilfe einer Sequenz-Alignierung mit dem Envelope-Protein der nahe verwandten Viren MMTV und JSRV *in silico* ermittelt. Abbildung 18 stellt die Alignierung der Sequenzen der drei nahverwandten β -retroviren HML-2, MMTV sowie JSRV dar. Zur besseren Charakterisierung dieser Region, d.h. zur Überprüfung ihrer Beteiligung als RBS, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Mutationen

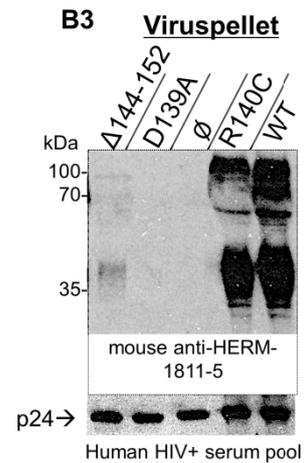
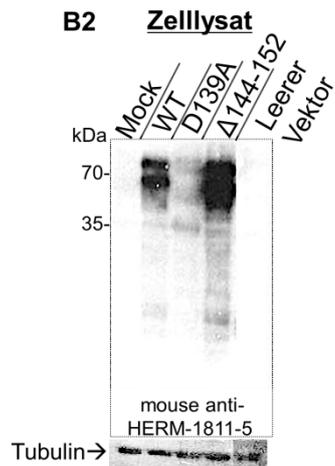
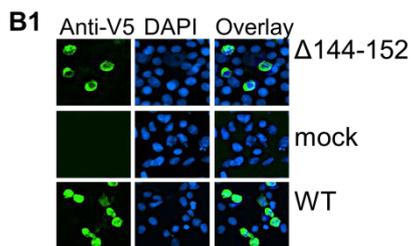
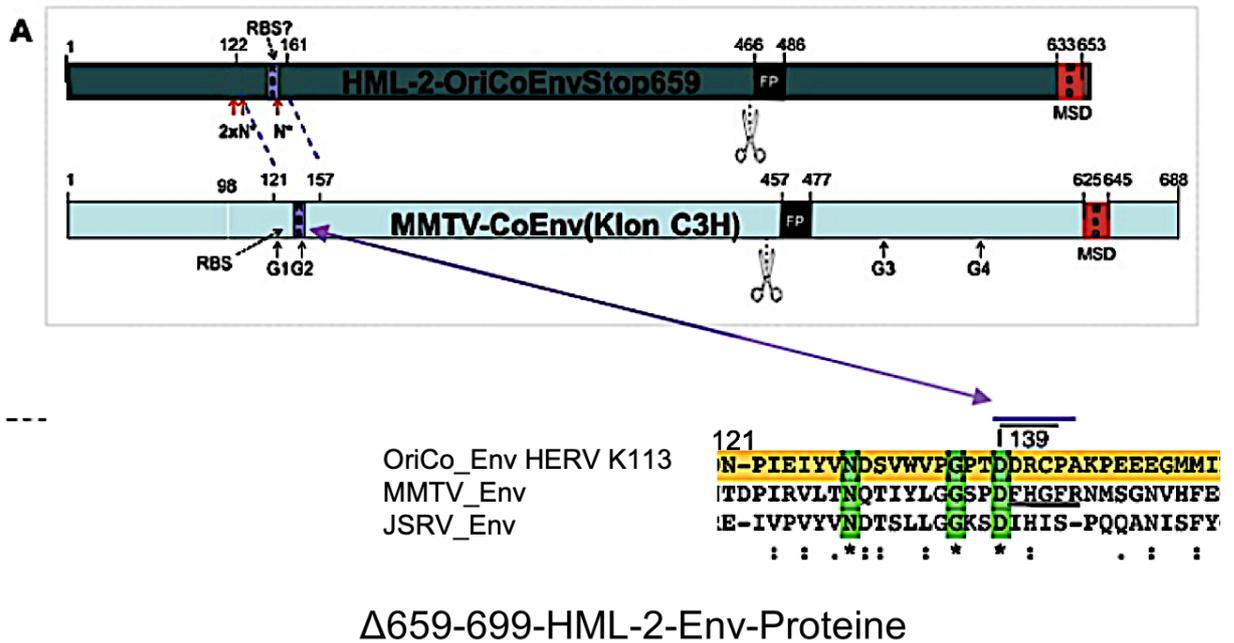
innerhalb der putativen RBS eingebaut, beide, wie es der schematischen Darstellung in der Abbildung 13A oben zu entnehmen ist, liegen zwischen den Aminosäuren an der Position 122 und 161. Ein Ausschnitt der Alignierung der Sequenzen, diese sind in der Abbildung 18 bereits dargestellt worden, mit der entsprechenden RBS von MMTV, letztere besteht aus der Aminosäuresequenz DFHGFR, kann der Abbildung 13A entnommen werden. Bei der Mutagenese wurde die Aminosäure Aspartat an der Position 139 gegen Alanin substituiert (D139A), bzw. die Aminosäuren von der Position 144 bis 152 deletiert (Δ 144-152). Zur alternativen Detektion des HML-2- Env-Proteins OriCoEnv Δ 659-699 und der erzeugten Mutanten wurden darüber hinaus C-terminal V5-markierte Varianten der Proteine hergestellt.

Die Untersuchung zur korrekten Expression und zum Einbau der HML-2- OriCoEnv Δ 659-699-Mutanten im VLP erfolgte, indem 293T- Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert wurden. Drei Tage posttransfektion erfolgte der Zellaufschluss bzw. wurden die produzierten VLP aus dem Zellkulturüberstand geerntet. Der Proteinnachweis in den transfizierten Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz mit dem anti-V5- AF488-Antikörper. Darüber hinaus wurden Zelllysate oder lysierte VLPs auf eine Membran transferiert und die Env-Proteine wurden mittels Western blot mit anti-V5 oder anti-Env HERM-1811-5 detektiert. Das ursprüngliche Env-Protein Δ 659-699 oder die Mutante R140C [61] wurden als Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten Lysate von Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden, oder VLPs, die ohne Zugabe von einem Env-Expressionsvektor bei der Transfektion von Produzenten gebildet wurden.

Die korrekte Expression und der positive Einbau im VLP der Mutante Δ 144-152 kann der Abbildung 13B1 bis B3 entnommen werden. Hierbei erkennt man sowohl grün fluoreszierende Zellen nach Transfektion mit der V5-markierten Varianten (Abbildung 13B1) als auch eindeutige Proteinbanden (Abbildung 13B2), die das Vorläuferprotein bei ca. 95 kDa und die TM-Untereinheiten bei den kleineren Größen (um 42 kDa) darstellen. Allerdings deutet die schwache Bande der Viruspellet-Probe in der Abbildung 13B3 auf einen schlechten Einbau dieser Mutante in Virus-Like-Partikel hin. Für die Mutante D139A konnte lediglich im Vergleich zu Δ 144-152 schwache Banden im Western blot der Zelllysate

Ergebnisse

detektiert werden (Abbildung 13B2). Ein Einbau der Mutante D139A in den VLPs konnte nicht festgestellt werden. Dies ist durch die fehlenden Banden in der Abbildung 13B3 ersichtlich.



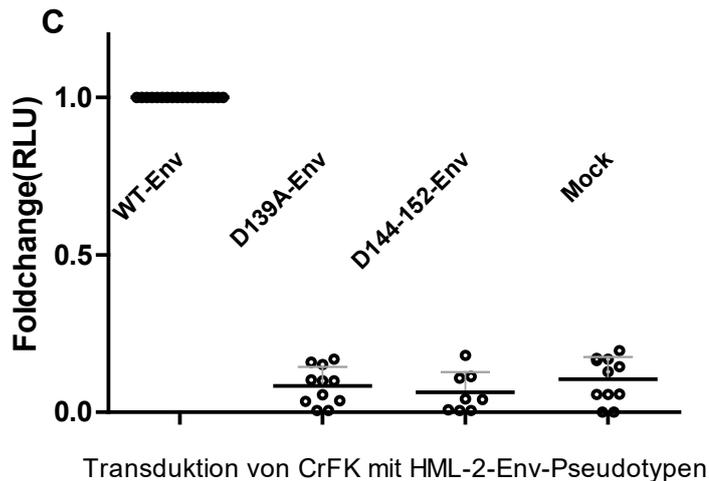


Abbildung 13: Sequenz-Alignierung von Env von MMTV und HML-2 sowie Expressionskontrolle und Kontrolle des Einbaus in VLP der Env- Mutanten D139A und Δ 144-152 und Transduktionsversuche mit CrFK-Zellen. **A. Oben:** Schematische Darstellung der Sequenz-Alignierung von den Envelope-Proteinen von HML-2 und MMTV. **A. Unten:** Ausschnitt aus der Sequenz-Alignierung, die in der Abbildung 18 dargestellt ist. **B:** Immunfluoreszenz zum Proteinnachweis vom C-Terminus-trunkierten HML-2-Env und die davon abgeleiteten Mutanten D139A und Δ 144-152. **B2** und **B3:** Die Mutante D139A wird nur sehr schwach exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte für die Deletionsmutante Δ 144-152 eine positive starke zelluläre Expression nachgewiesen werden. Dieses Env-Protein wird in den Viruspartikeln eingebaut, verhältnismäßig aber viel schwächer als das WT- oder das R140C-Env. **C:** Infektionsversuch mit den Mutanten des Codon-optimierten HML-2- Envelop-Proteins Δ 659-699.

8.3.1.2. Die RBD-Mutanten D139A und Δ 144-152 ermöglichen keinen Viruseintritt

In einer weiteren Studie wurde die Funktionalität der neuen Env-Mutanten als Vermittler des viralen Zelleintritts analysiert. Pseudotypen mit der entsprechenden Mutation des Env-Proteins wurden zu diesem Zweck in 293T produziert und zwei von den Zelllinien, die als permissiv bestätigt wurden, damit inkubiert. Die Ergebnisse der Transduktionsversuche können der oberen Abbildung 13C sowie der untenstehenden Abbildung 14 entnommen werden. Es wurde sowohl die Katzen-Zelllinie CrFK (Abbildung 13C) als auch die humanen Zelllinie SKMel 28 (Abbildung 14) getestet.

Bei dem Versuch mit der Katzen-Zelllinie CrFK ist nach der Behandlung der Zellen mit den Δ 144-152-Env-tragenden-VLPs keine Expression des Reportergens in der

Wirtzelle zu erkennen. Die gemessene Luciferase-Aktivität ist hierbei vergleichbar mit der Aktivität des Enzyms nach einer Behandlung mit den D139A-Env-VLPs. Letztere tragen, wie bereits erwähnt, hochwahrscheinlich kein Env-Protein auf ihrer Hülle. Die VLPs mit dem Wildtyp Env-Protein bewirkten dahingegen eine viel höhere Luciferase-Aktivität als die Env-Mutierten VLPs.

Nähere Untersuchung der Mutante Δ 144-152: Die Mutante Δ 144-152 kann in VLPs eingebaut werden, den Rezeptor jedoch nicht erkennen.

Da ein Einbau von der Env-Mutante Δ 144-152 in die Pseudoviren nachgewiesen werden konnte, wurde ein weiteres Experiment, diesmal mit der humanen SKMel 28-Zelllinie durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden die Zellen mit Δ 144-152-Env-tragenden-VLPs einer bestimmten p24-Menge (100 ng) behandelt, und in weiteren Ansätzen mit dem 10- und 100-fachen des gleichen Viruspräparates (1000 ng und 10.000 ng). Man erhoffte mit der Erhöhung der Anzahl an Viruspartikel, vorausgesetzt die VLPs würden den Rezeptor erkennen, eine statistische Erhöhung der Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Eintritts in die Zellen.

Parallele Ansätze mit WT-Env-VLPs oder mit VSV-G-tragenden Partikeln wurden durchgeführt. Diese dienten als Positivkontrollen. Die 1000 ng- und 10.000 ng-Ansätze sind in der Abbildung 14 als die zwei weiteren Säulen der jeweiligen Säulengruppe dargestellt (Bezeichnet mit den Zahlen „2“ und „3“). Die zwei weiteren Ansätze sollten, falls die so eben genannte Erkennung des Rezeptors durch Δ 144-152-Env möglich wäre, im Fall von WT-HML-2-Env-VLPs eine Konkurrenz von beiden VLPs um den Rezeptor belegen. Die weiteren Ansätze mit VSV-G- VLPs und Δ 144-152-Env-tragenden-VLPs dienten dabei als Negativkontrolle, denn, wie bereits im Abschnitt 8.2 erwähnt, nutzen VSV-G-VLP mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht den gleichen Rezeptor wie die HML-2-Env-VLPs. Daher ist eine spezifische Wechselwirkung aufgrund einer Konkurrenz um einen Rezeptor zwischen beiden Pseudotypen auszuschließen.

Dieses Experiment bestätigte die Unfähigkeit von Δ 144-152-Env-Tragenden-VLPs, Zellen zu transduzieren. Denn SK-Mel 28- Zellen ließen sich nach der Inkubation mit den Δ 144-152-Env-tragenden-VLPs, auch nach einer Erhöhung des Viruspräparates für die Transduktion um das 10- und 100-fache, nicht transformieren. Dies ist eindeutig in der Abbildung 14 ersichtlich (siehe Gruppe von Säulen mit der

Ergebnisse

Bezeichnung „ $\Delta 144-152-Env$ -Mutante“). Desweiteren lieferten die Ansätze mit $\Delta 144-152-Env$ -tragenden-VLPs ähnliche Luciferase-Werte wie die des Ansatzes mit den Naivzellen (Vergleich Säulengruppen mit der Bezeichnung „ $\Delta 144-152-Env$ -Mutante“ und „ \emptyset Virus“).

Vergleicht man außerdem in dieser Abbildung die $\Delta 144-152-Env$ -tragenden-VLPs-Ansätze und Wildtyp-pseudotypisierten Viren, erkennt man hier die gleiche Tendenz, wie bei dem Versuch mit CrFK-Zellen der Abbildung 13C und zwar, dass eine Inkubation mit Env -WT-VLPs eine statistisch signifikante höhere Expression von Luciferase als mit $\Delta 144-152-Env$ -tragenden-VLPs bewirkte. In der Abbildung sind die Daten als „*Log RLU-Ratio*“ dargestellt, also der Logarithmus der Verhältnisse der Luciferase-Aktivitäten beider Ansätze, wobei einen Unterschied um ca. den Log 4 zwischen beide Verhältnissen erkennbar ist.

Darüberhinaus bewirkte die gleichzeitige Zugabe der Wildtyp-pseudotypisierten Viren, die als Positivkontrolle dienten, und $\Delta 144-152-Env$ -Tragenden-VLPs keine statistische signifikante Veränderung der relativen Luciferase-Aktivität im Vergleich zu einer Behandlung mit lediglich den WT- Env -VLPs (Siehe Abbildung 14, gruppierte Säulen mit der Bezeichnung „*Env*-WT“: Vergleich von „Säule 1“ mit „Säule 2“ und „3“). Hinzu kommt, dass diese Ergebnisse denen der Negativkontrolle (Gruppe von Säulen mit der Bezeichnung „VSV-G- VLP“) tendentiell sehr ähnlich war. Somit kann angenommen werden, dass keine Konkurrenz zwischen WT-HML-2- Env -VLPs und die Mutante stattgefunden hat, was wiederum bestätigt, dass $\Delta 144-152-Env$ -tragenden-VLPs keinen Rezeptor auf SK-Mel- Zellen binden können.

Diese Befunde zeigen deutlich, dass $\Delta 144-152-Env$ keinen Eintritt in die Zellen ermöglicht. In weiteren Untersuchungen wurden aus diesen Gründen $\Delta 144-152-Env$ -tragenden-VLPs als Negativkontrolle herangezogen.

Transduktion von SK Mel 28 mit HML-2 Envs $\Delta 144-152$ - VLP und das WT

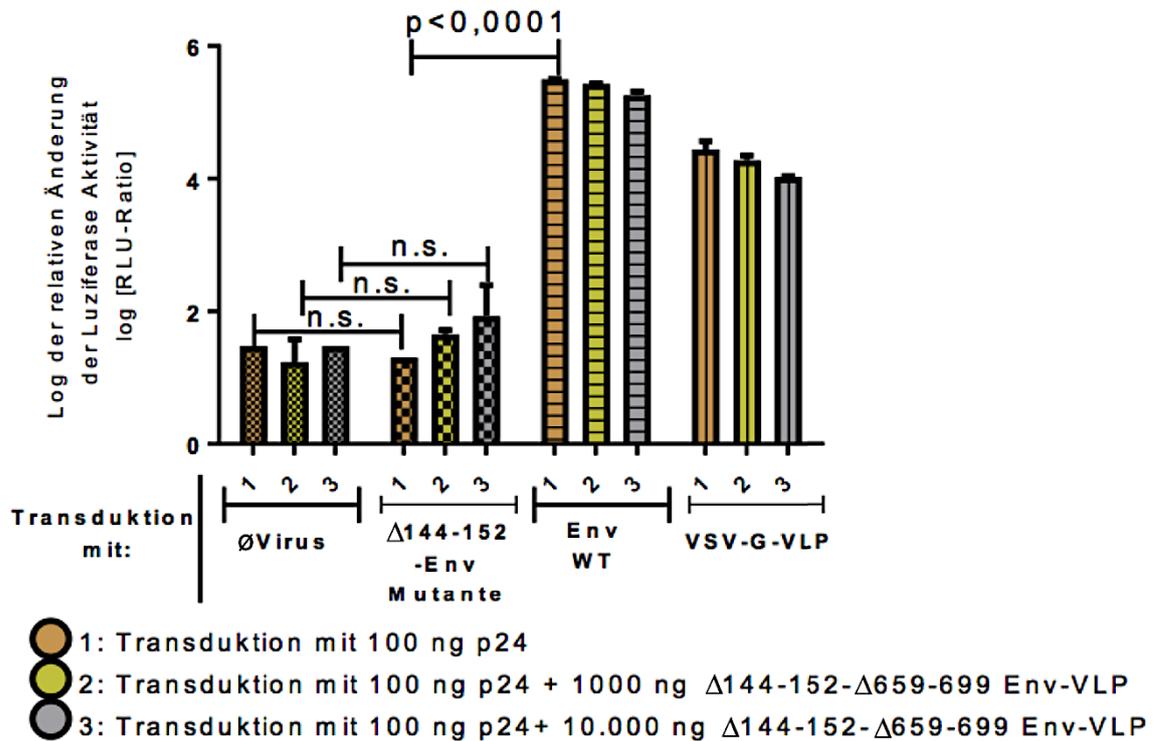


Abbildung 14: Die im Virus eingebaute Deletionsmutante $\Delta 144-152$ -Env kompetitiert nicht mit dem Wildtyp-Env um die Rezeptorbindung.

8.3.2. Die N-Glykosylierungsmutanten der RBS von HML-2-Env werden in Viruspartikel eingebaut, sind aber nicht funktionell.

Wie bereits im Einleitungsteil erwähnt, werden im Golgi-Apparat nach der Proteinsynthese dem neuen synthetisierten Protein verschiedenen Gruppen hinzugefügt. Zu diesen sogenannten posttranslationalen Modifikationen gehört die Glykosylierung. Bei der N-Glykosylierung wird ein Glykan an einen Asparagin-Rest mit der Consensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr angeknüpft. Dabei stellt X jede Aminosäure dar, mit Ausnahme von Prolin (Pro). Vom MMTV-Env-Protein sind vier Glykosylierungsstellen bekannt, zwei davon befinden sich in der Nähe der Rezeptor-Bindende-Stelle. Dahingegen zeichnet sich das Env-Protein vom HML-2 durch zwölf potentiellen Glykosylierungsstellen auf. Zum besseren Verständnis der molekularbiologischen Implikation der potentiellen N-Glykosylierungsstellen von HML-2, insbesondere derjenigen, die sich in der Nähe der als RBS-identifizierten Region befinden, in der Interaktion mit zellulären Oberflächenproteinen, wurde eine

Ergebnisse

Mutationsstudie innerhalb dieser Region vorgenommen. Die Mutation erfolgte an zwei Stellen, die Position 128 und 153 des Env-Proteins, welche sich innerhalb bzw. in der unmittelbaren Nähe der als Rezeptor-Bindenden-Stelle vermuteten Region des HML-2-Proteins befinden. Durch die Mutation wurde die sehr polare Aminosäure Asparat durch das hydrophobe unpolare Alanin ausgetauscht. Zusätzlich zur Mutation von diesen zwei potentiellen N-Glykosylierungsstellen wurde eine Stelle bestehend aus einer dreifachen Wiederholung von der Aminosäure Glutaminsäure (E) ebenfalls verändert. Auch hier befand sich diese Stelle in der unmittelbaren Nähe der RBS, so dass die Annahme aufgestellt werden kann, dass sie eine wichtige Rolle bei dem Vorgang der Rezeptor-Erkennung spielt. Es ist nämlich von anderen Proteinen bekannt, dass solche Wiederholungen, auch „*amino acid repeats (AARs)*“ genannt, unterschiedliche Wirkungen auf die Struktur und damit die Funktion des Proteins zeigen können und dass sie oft zu Proteinbindungsstelle gehören [62]. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der dreifache Repeat EEE durch eine Wiederholung bestehend aus drei Alanin, AAA, ersetzt. Die Kontrolle der Proteinexpression der mutierten HML-2-Proteine erfolgte mittels Immunoblotting. Zu diesem Zweck wurden 293T mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert und drei Tage posttransfektion lysiert. Die auf diese Weise geernteten Proteine wurden im Western blot mithilfe des Antikörpers gegen den V5-Tag nachgewiesen. Das Wildtyp- HML-2-Env Δ 659-699 (in der untenstehenden Abbildung als Δ C1 bezeichnet) sowie die Mutante D139A dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

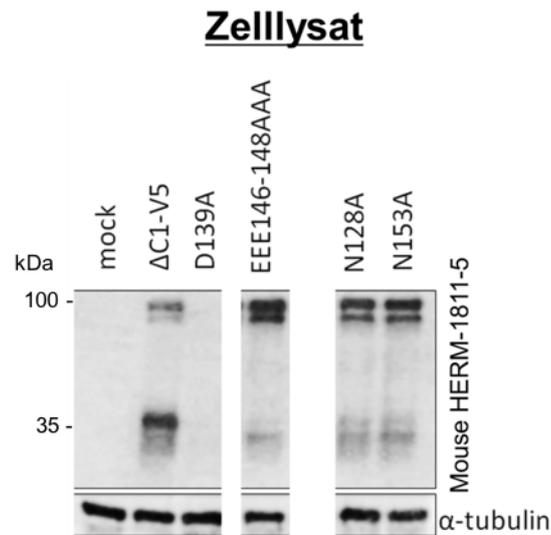


Abbildung 15: Die N-Glykosylierungsmutanten von HML-2-Env, N128A und N153A sowie die AAR-Mutante EEE146-148AAA, werden wie das Wildtyp HML-2- Env Δ 659-699 (hier als Δ C1 bezeichnet) gut exprimiert.

In der oberen Abbildung 15 sind die Banden der drei HML-2- Env Mutanten zu sehen. Das Vorläufer-Protein erscheint als ein Duplett zwischen ca. 80 und ~ 95 kDa. Erstere Bande entspricht dem unprozessierten und glykosylierten, letztere dem unprozessierten Vorläufer. Die beiden Banden zwischen 33 und 45 kDa sind auf die TM- Untereinheit zurückzuführen, wobei die ~ 45 kDa-Bande der glykosylierte TM-Untereinheit entspricht. Bei den Mutanten N128A, N153A und EEE146-148AAA sind die TM-Banden viel schwächer als die des Kontrollproteins HML-2- Env Δ 659-699, vermutlich bewirken diese Mutationen eine Störung der Prozessierung des Vorläufers in seine Untereinheiten.

Nachfolgend zur Überprüfung der positiven Proteinexpression wurde der Einbau der Mutanten in den Pseudoviren untersucht. Dazu wurden die entsprechenden VLPs in 293T produziert, zwei und drei Tage posttransfektion geerntet und pelletiert und das virale Env-Protein in Virus-Pellet mittels Western blot nachgewiesen. Pelletierte D139A-VLPs dienten hierbei als Negativkontrolle für den Einbau in VLP.

Mann erkennt in der Abbildung 16A den Einbau der HML-2-Env-Mutanten N128A, N153A und EEE146-148AAA in den VLPs.

Die Untersuchung, ob diese Env-Mutanten in der Lage sind, den Viruseintritt der damit pseudotypisierten VLPs zu vermitteln, wurde mittels Transduktionsversuchen und auf die selbe Weise durchgeführt, wie bereits im Punkt 8.3.1 beschrieben. In der Abbildung 16B sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Die Luciferase-Aktivität von Zellysaten aus Zellen, die mit den VLPs behandelt wurden, wurde

Ergebnisse

hierbei als ein Maß für den Eintritt der Viren in die Zellen herangezogen. Hierbei wurde die Schwelle für eine erfolgreiche Transduktion, welche in der genannten Abbildung als Cut-off bezeichnet wurde, auf einen Log-Wert von 3 festgelegt, denn der Log-Wert der Negativkontrolle (Behandlung von SK-Mel 28 mit $\Delta 144-152$ -VLPs) lag bei ca. 2. Die Luciferase-Werte der VSV-G- und der HML-2-Env-WT-VLPs, die als Positivkontrollen herangezogen wurden, lagen oberhalb dieses Werts. Im Gegensatz dazu wiesen alle Zelllysaten aus Zellen, die mit den N128A-, N153A- sowie AAR-Mutante EEE146-148AAA-Pseudoviren behandelt wurden, Werte unterhalb der Schwelle auf. Dies deutet darauf hin, dass keiner der VLPs trotz korrekten eingebauten Env-Proteinen in das Cytoplasma gelangen konnte. Hochwahrscheinlich führte die Veränderung der Aminosäuresequenz an diesen bestimmten Positionen zur Abschwächung oder sogar Aufhebung von Zell-Virus-Wechselwirkungen, die zu einer Membranfusion hätten führen sollen. Dies deutet darauf hin, dass diese Region tatsächlich eine RBS von HML-2 ist. Eine interessante Beobachtung sind hierbei die Luciferase-Werte der Negativkontrolle, $\Delta 144-152$ -VLPs. Wie bereits in der Abbildung 13 und Abbildung 14 gezeigt, konnte der Einbau der Env-Mutante $\Delta 144-152$ in VLPs festgestellt werden, die pseudotypisierte Viren konnten jedoch in den untersuchten Zelllinien keinen Zelleintritt ermöglichen. Erstaunlicherweise sind jedoch in der unten stehenden Abbildung 16B positive Transduktionswerte für die Zelllinie CrFK, aber nicht für SKMel28 zu erkennen. Man könnte in Erwägung ziehen, dass diese VLPs in CrFK alternative Wege benutzt haben, um in das Cytoplasma zu gelangen. Untersuchungen zu den MMTV-HML-2-Env-Chimären (siehe auch Punkt 8.3.4) lieferten analoge Ergebnisse.

Ergebnisse

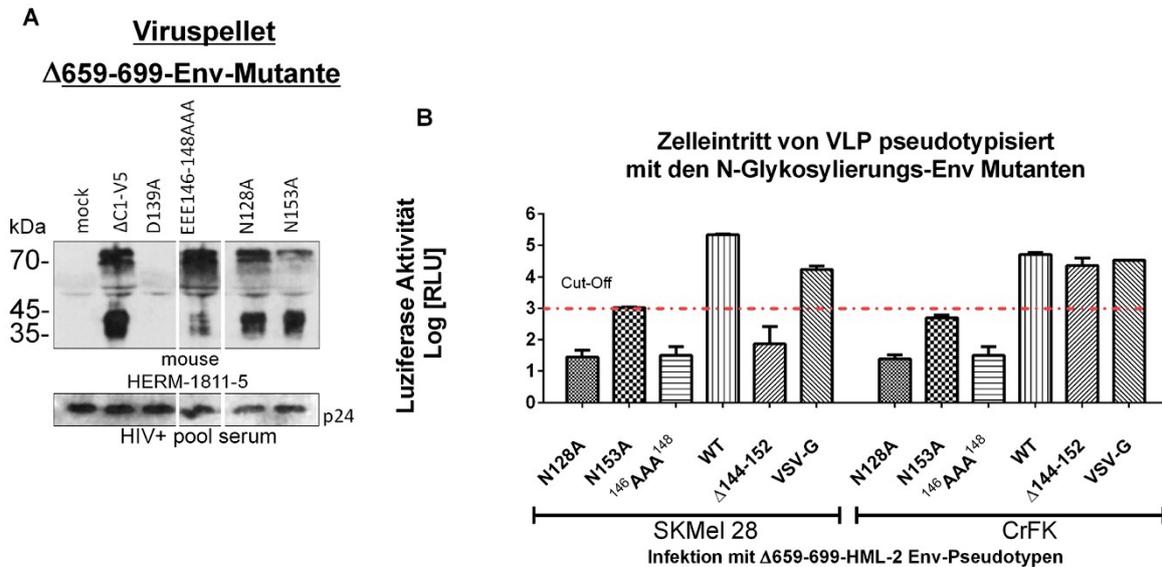


Abbildung 16: Die N-Glykosylierungsmutanten N128A und N153A sowie die AAR-Mutante $^{146}\text{AAA}^{148}$ vermitteln keinen Virus-Eintritt. **A:** Kontrolle des korrekten Einbaus der Env-Protein- Mutanten: Die Viren wurden in 293T produziert und anschließend ultrazentrifugiert. **B:** Transduktionsexperiment mit HIV-VLP, die mit den Mutanten pseudotypisiert wurden.

8.3.3. Konstruktion und Expressionsnachweis von HML-2/MMTV-Env-Proteinchimären

Chimäre-Env-Proteine wurden konstruiert, die aus dem HML-2-Env und MMTV-Env-Abschnitten bestanden. Hierbei wurden Bereiche innerhalb von HML-2 durch die homologe Region von MMTV-Env ersetzt. Alle umgetauschten Bereiche beinhalteten die RBS des jeweiligen Envelope-Proteins. Die Zusammensetzung der Chimären ist in der Abbildung 17 dargestellt.

Die Chimäre K-Env-N-MMTV wurde durch den Ersatz des N-Terminus-Bereichs von HML-2 bis zur Position 161 durch den MMTV-Env-Homologen Sequenzabschnitt kreiert. Die Konstruktion der Mutante K-Env-CIP-MMTV erfolgte auf eine ähnliche Weise, indem der HML-2-Env-Sequenzabschnitt von der Aminosäure 125 bis 161 gegen den korrespondierenden Bereich von MMTV-Env ausgetauscht wurde.

Ergebnisse

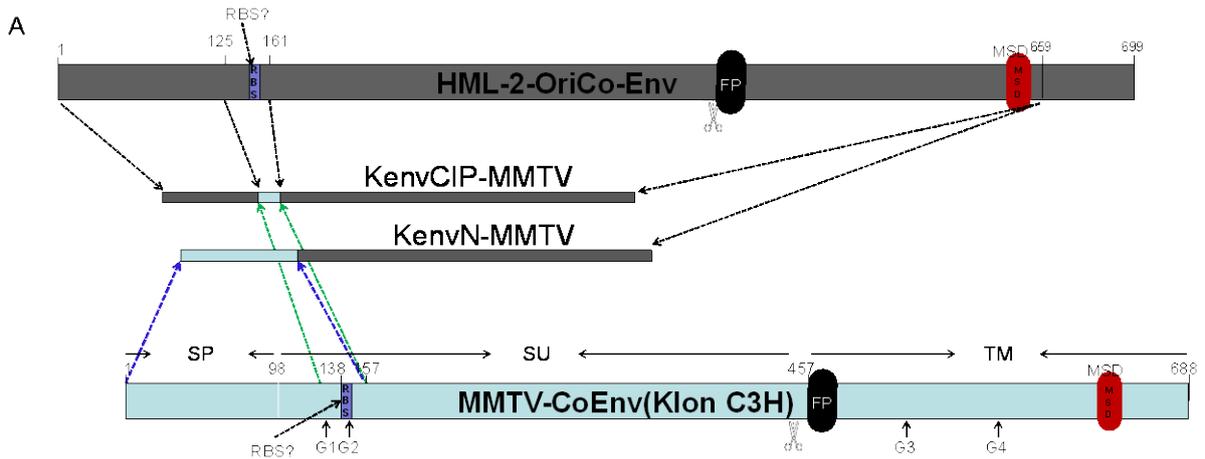


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Sequenzvergleichs zwischen HML-2-Env und MMTV-Env und deren Chimären KenvCIP- und KenvN-MMTV. KenvCIP-MMTV wurde durch den Ersatz von den Aminosäuren der Position 125 bis 161 in HML-2-Env durch die homologe Region von MMTV-Env bestehend aus den Aminosäuren 124 bis 157 zusammengesetzt. KenvN-MMTV wurde ähnlich wie KenvCIP erzeugt, in dem der N-Terminus-Bereich bis zur Position 161 von HML-2-Env durch den vergleichbaren Bereich von MMTV-Env bis zur Position 157 ersetzt wurde. Alle ausgetauschten Bereiche trugen die RBS von dem jeweiligen Envelope-Protein. Die Sequenz-Alignierung zwischen den drei β -Retroviren HML-2-HERVK113, MMTV und JSRV ist der nachfolgenden Abbildung 18 zu entnehmen. Die Bedeutungen der in der Darstellung verwendeten Abkürzungen können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden.

Ergebnisse

Nach Kontrolle der korrekten Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz und Western blot wie in der Abbildung 19A und B dargelegt, wurden HIV- virale Partikel, welche mit den Env-Chimären pseudotypisiert wurden, in 293T-Zellen produziert und der Einbau der Chimären in die viralen Partikel durch die immunologische Detektion des eingebauten Envs untersucht. Abbildung 19C veranschaulicht diese Untersuchung. Zu erkennen ist eine sehr schwache Detektion der Chimären bei einem positiven starken Signal des viralen Capsid-Proteins p24 in den pelletierten Viruspartikeln. Hierbei erkennt man im Gegensatz zur Negativkontrolle (\emptyset) und im Bereich von ~37 kDa ein schwaches Signal bei den Env-Chimären. Das Signal repräsentiert die Transmembrandomäne vom HML-2-Env, die in beiden Chimären beinhaltet ist. Man kann erkennen, dass bei K-Env-CIP-MMTV ein stärkeres Signal der Transmembrandomäne (TM) vorhanden ist als bei der N-Terminus-Mutante K-Env-N-MMTV. Dies deutet auf einen stärkeren Einbau der ersteren in den Pseudoviren hin. Insgesamt ist der Einbau der chimären Env-Proteine aber sehr viel geringer, als der Einbau des HML-2-Env-Proteins.

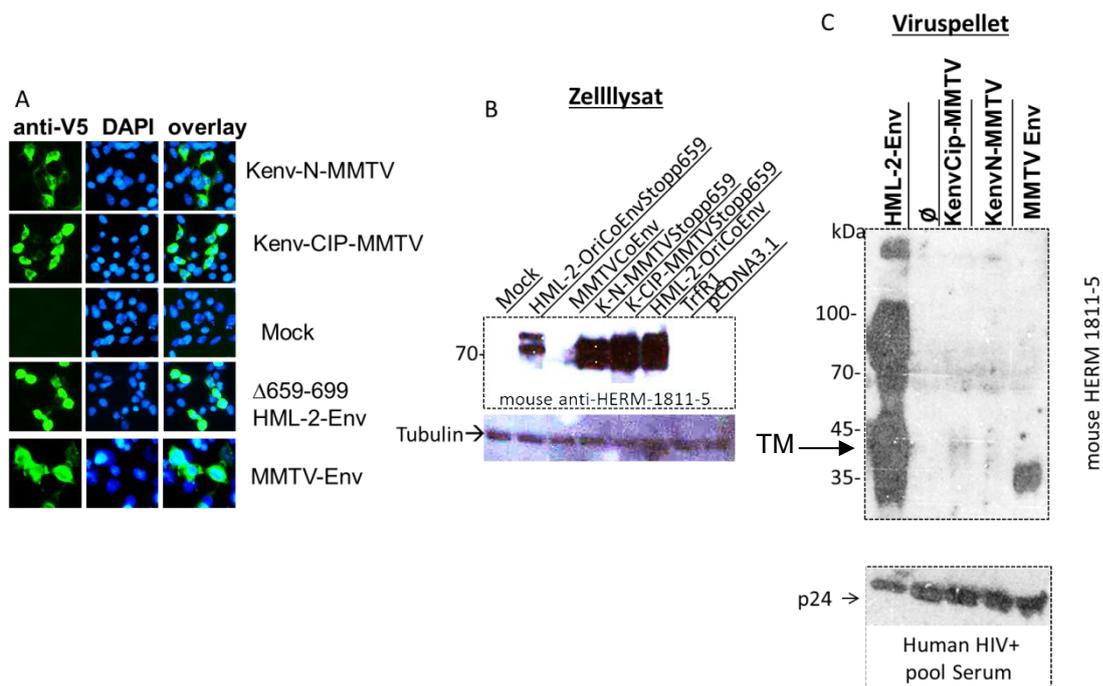


Abbildung 19: Expressionsnachweis von MMTV-Env, HML-2-Env-OriCo Env, der Mutante Δ 659-699 sowie den Chimären K-N-MMTV und K-CIP-MMTV. K-N-MMTV und K-CIP-MMTV sind in der Membranhülle der VLP unzureichend eingebaut. A und B: Die positive Expression der Chimären wurde mittels Immunfluoreszenz mit dem anti-V5-AF488 bzw Western blot mit dem HML-2 anti-Env-Antikörper anti-HERM-1811-5 nachgewiesen. C: Zur Überprüfung des Einbaus der Env-Chimären in die Viruspartikel wurden VLP produziert und die Env-Detektion erfolgte mittels anti-HERM-1811-5.

Bei der Konstruktion der Chimären wurde die RBS-Region von MMTV-CoEnv in das HML-2-Env übertragen und ein, wenn auch sehr geringer, Einbau in Viruspartikel nachgewiesen. Es sollte nun überprüft werden, ob diese Übertragung zur Erkennung des MMTV-Rezeptors, das „mouse Transferrin Rezeptor 1“ (mTrfR1), durch die entstandenen Chimären führen konnte.

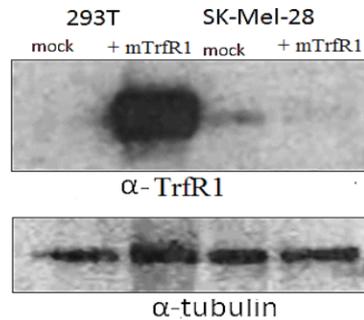
8.3.4. MMTV-Env-HIV-Viren können mTrfR1 mit hoher Effizienz zum Zelleintritt nutzen, MMTV-HML-2-Env-HIV-Chimäre-VLPs können es nicht.

Zunächst wurde überprüft, ob eine Expression von mTrfR1 ausreichend war, um den Zelleintritt von MMTV-Env-Pseudo-HIV zu ermöglichen. Dazu wurden mit HEK 293T und SKMel28 zwei Zelllinien herangezogen. MMTV kann nicht den humanen Transferrin-Rezeptor verwenden, sondern nur den murinen (mTrfR1). Die Zellen wurden mit einem mTrfR1-Expressionsvektor transfiziert und die Expressionshöhe des Transgens wurde zwei Tage posttransfektion mittels Western blot nachgewiesen. Man erkennt in der Abbildung 20.1, dass im Vergleich zu 293T, SKMel28 das exogene mTrfR1 nur schwach exprimierten.

293T zeigten dagegen eine sehr starke mTrfR1-Proteinsynthese. Eine Transduktion von GFP-tragenden-MMTV-Env-HIV-Pseudotypen in SKMel28-Zellen führte zu einer spezifischen Erhöhung der Anzahl an transduzierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die nicht mit mTrfR1 transfiziert wurden. Diese Erhöhung betrug aber lediglich ca. das 4-fache des Mock-Werts, höchstwahrscheinlich aufgrund der schwachen Expression von mTrfR1 als Rezeptor für das MMTV-Env-Hybrid-Virus. Dies ist den Teilabbildungen A und B der Abbildung 20.2. zu entnehmen. Im Vergleich dazu betrug bei mTrfR1-Positiv-293T diese Erhöhung bis zu 250-fache des Referenzwerts. (Abbildung 21 A).

Damit wird eindeutig ersichtlich, dass alleine die Oberflächenexpression von mTrfR1 in den beiden Zellen in Kombination mit der Anwesenheit eines funktionellen MMTV-Env-Proteins in der Membranhülle des Virus ausreichend ist, um den Eintritt des Virus in die Zellen einzuleiten. Wird mTrfR1 nicht oder nicht ausreichend exprimiert, wie es bei den SKMel28-Zellen der Fall war, unterbleibt eine effiziente Transduktion der Zellen durch die Viren.

1) Überexpression vom mTrfR1/ Proteinnachweis im Zellsat



2)

Transduktionsversuche mit SKMel28

A: Mock

B: Transfektion mit mTrfR 1
+ Transduktion mit MMTV-ENV-HIV-Like-Partikeln

C: Transfektion mit mTrfR 1
+ Transduktion mit K-CIP-MMTV-Env-HIV-Like-Partikeln

D: Transfektion mit mTrfR 1
+ Transduktion mit K-N-MMTV-Env-HIV-Like-Partikeln

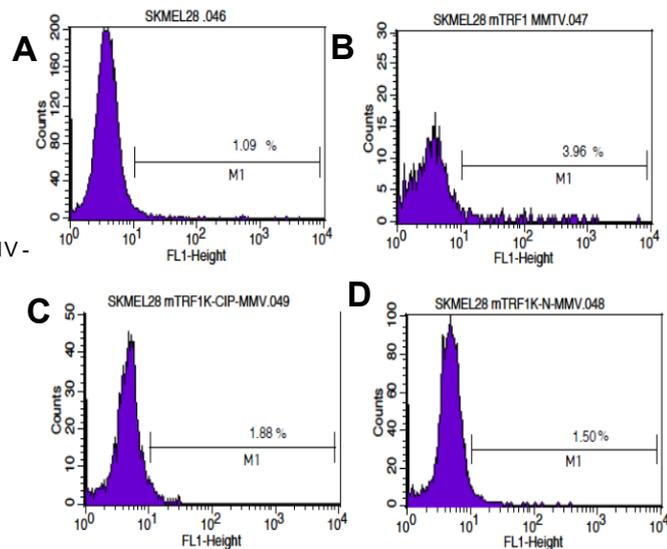


Abbildung 20: Versuch zur Überexpression von mTrfR1 und Transduktion von MMTV-Env-, K-N-MMTV und K-CIP-MMTV-HIV in SKMel 28. 1) 293T und SKMel28 wurden mit mTrfR1 transfiziert und die Proteinproduktion mittels Western blot nachgewiesen. SKMel28 zeigten im Vergleich zu 293T kaum eine Expression vom Transgen mTrfR1. 2) Die mit mTrfR1 behandelten Zellen wurden mit MMTV-Env- und den Chimären-Env-HIV-Pseudoviren inkubiert.

Da SKMel28 das exogene mTrfR1 kaum exprimieren konnten, wurden die Zelllinien 293T und CrFK als Versuchszellen zur Untersuchung der Funktionalität von MMTV-HML-2-Env-HIV-Chimären herangezogen. Hierbei diente Luziferase als Reporterprotein, um einen erfolgreichen Viruseintritt zu quantifizieren. Die schematische Darstellung der Chimären Viren ist der Abbildung 17 entnehmen. Die Zellen wurden mit den Luziferase-tragenden-Virus-like-Partikeln inkubiert, die mit jeweils einer der Chimären pseudotypisiert wurden. Um eine Erhöhung der Expression des Transgens ausschließlich auf die positive Oberflächenexpression des Rezeptors mTrfR1 zurückzuführen, wurden zwei parallele Ansätze mit und ohne Überexpression von mTrfR1 in den Zellen durchgeführt. Die Inkubation der Zellen mit

Ergebnisse

den jeweiligen Viren erfolgte einen Tag nach der Transfektion. Die positive Detektion von überexprimiertem mTrfR1 in CrFK ist der untenstehenden Abbildung 21 C zu entnehmen. Hierbei erkennt man ein verstärktes Proteinsignal bei dem Ansatz, in dem die Zellen mit dem Expressionskonstrukt transfiziert wurden. Die schwächeren Banden stellen hochwahrscheinlich das endogen exprimierte feline TrfR1 dar. In der Abbildung 21 A und B sind die Ergebnisse der Transduktionsversuche mit den oben genannten Zellen zu finden. Hierbei wurde die Schwelle für einen erfolgreichen Viruseintritt auf das 2,5-fache des relativen mittleren Luziferase-Werts der Negativkontrolle festgelegt (Dargestellt durch eine gestrichene Linie). Zur Bestimmung der relativen Luziferase-Werte wurde als Bezugswert die mittlere Luziferase-Aktivität von Zelllysaten aus Nicht-Transfizierten Zellen, die mit dem MMTV-Env-VLP behandelt wurden, festgelegt.

In Bezug auf die Permissivität für MMTV-Env-Pseudotypen als Positivkontrolle ist aus der Abbildung 21 zu entnehmen, dass sich mTrfR1-Positivzellen der Erwartung entsprechend verhielten und daher im Vergleich zur Negativkontrolle, eine ca. 250-fache höhere Suszeptibilität für die VLPs aufwiesen. Dies galt sowohl für 293T- (Teilabbildung A) als auch CrFK-Zellen (Teilabbildung B).

Versuche mit Env-Chimären-VLP führten dahingegen in 293T zu keiner Erhöhung der Luziferase-Werte oberhalb der Schwelle. Als Negativkontrolle wurde hierbei Viren ohne eingebautes Env-Protein herangezogen. Das Signal des Reporter-Proteins Luciferase blieb sowohl bei den untransfizierten als auch den mit-mTrfR1-transfizierten Zellen im Bereich des Hintergrundsignals, was, angesichts der Ergebnisse zur Untersuchung des Einbaus von Envs-Chimären in VLP, wie im Punkt 8.3 bereits besprochen, nicht erstaunlich ist, denn die Proteine schienen nur schwach eingebaut zu sein. 293T-Zellen ließen sich trotz positiver Expression von mTrfR1 mit den MMTV-HML-2-Env-Chimären-HIV-VLP nicht transduzieren.

Eine interessante Beobachtung lieferte allerdings die Zelllinie CrFK (Abbildung 21 B). In der Tat konnte eine leichte, bis zum Faktor 10, Erhöhung der Aktivität von Luziferase über die Schwelle bei dieser Zelllinie gemessen werden, wenn die mTrfR1-exprimierenden Zellen mit den Chimären inkubiert wurden.

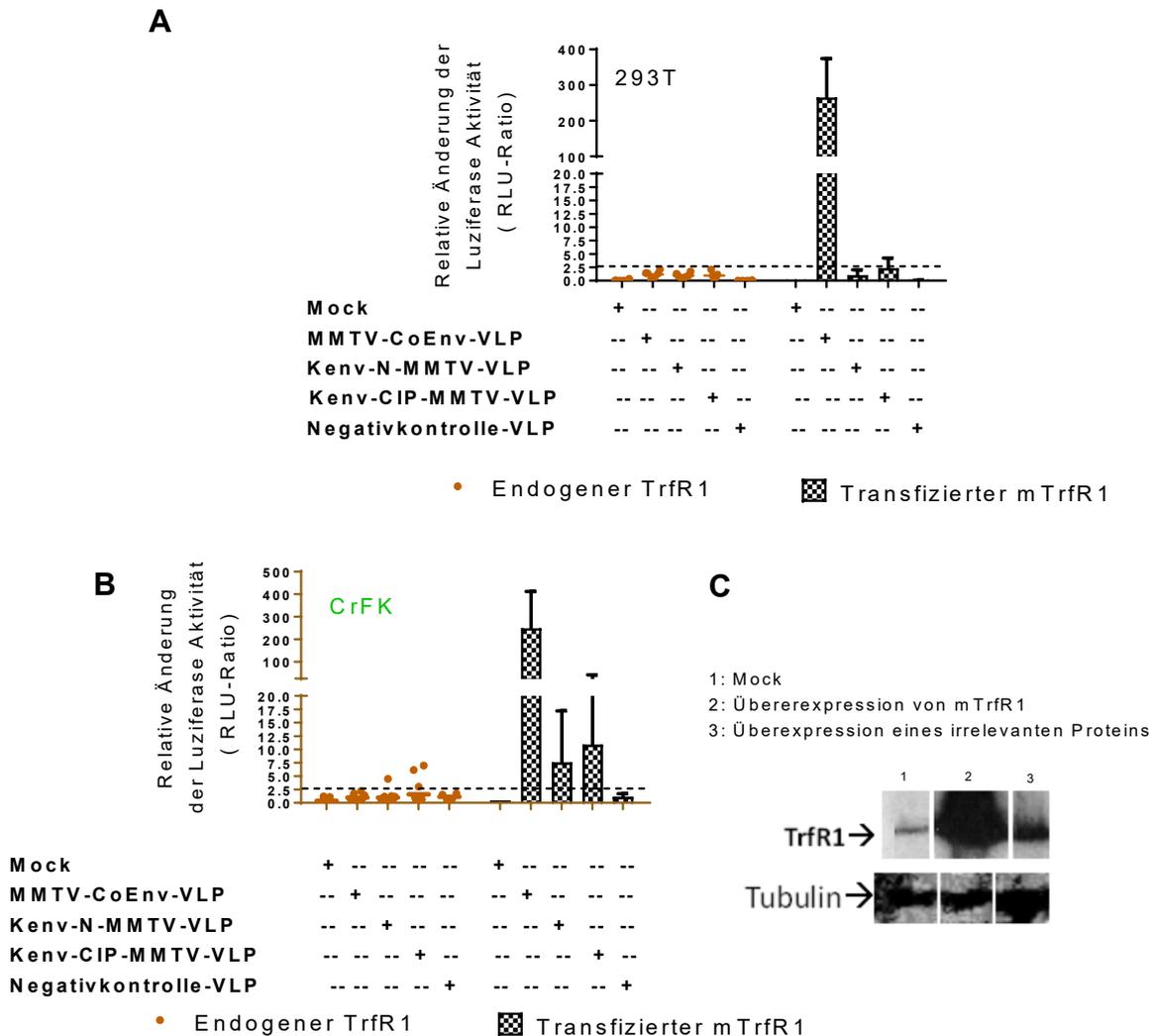


Abbildung 21: Überexpression von mTrfR1 und Transduktion von MMTV-Env-, K-N-MMTV- und K-CIP-MMTV- HIV-VLP in CrFK und 293T. 293T (A) bzw. CrFK (B) wurden zusammen mit den Env-Chimären-tragenden- VLP unter Bedingungen inkubiert, die eine virale Transduktion ermöglichten und die Transduktionseffizienz der VLP wurde drei Tage nach der Transduktion mittels Messung der Luziferase-Aktivität bestimmt.

Durchflusszytometrische Untersuchung zu den Env Chimären und Vergleich mit dem Wildtyp HML-2-Env

Zur Bestätigung der in der Abbildung 21 und dem Abschnitt 8.3.4 Ergebnisse, wurden weitere Experimente mit GFP-tragenden VLPs durchgeführt. Hierbei sollte mittels Expression vom Reporterprotein GFP einzelne erfolgreich transduzierten Zellen markiert werden.

Ergebnisse

Für diese Untersuchung wurde, drei Tage nachdem die HML-2-permissiven CrFK und SK-Mel 28 mit den VLPs behandelt wurden, die Zelleintrittsrate der VLPs über eine Messung der Aktivität des Reporterproteins GFP ermittelt.

Erkennbar in der nachstehenden Abbildung 22 ist die positive Detektion des Reporterproteins in den HML-2-permissiven Zellen SK-Mel28 und CrFK, wenn die Zellen dem Wildtyp-Virus ausgesetzt wurden. Der prozentuale Anteil an GFP-Positivzellen betrug hierbei ca. 45% für SK-Mel 28 und ca. 5% für CrFK. Im Gegensatz dazu blieb eine Detektion von GFP-Positivzellen bei den Versuchen mit den Chimären-VLP aus. Bei diesen Ansätzen blieb die Anzahl an GFP-Positivzellen im Bereich des Hintergrundsignals, letzteres wurde durch den prozentualen Anteil an GFP-Positivzellen von den Nicht-permissiven Hep-2 auf ca. 1% festgelegt.

Die GFP-VLPs führten zu dem selben Ergebnis wie in den Experimenten mit den Luciferase-VLPs, es konnte durch die chimären Env-Proteine kein wirksamer Virus-Eintritt über mTrfR1 detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Schlüsselrolle der Interaktion des viralen Envelope-Proteins mit zellulären Oberflächenproteinen, um einen effektiven Eintritt des viralen Materials in die Zelle zu gewährleisten.

Die als RBS postulierte Region innerhalb des HML-2-Env spielt bei der spezifischen Erkennung des Rezeptors und Ermittlung des Eintritts vom HML-2-Virus sicherlich eine nicht-unbedeutende Rolle. Dies wird im Weiteren näher untersucht.

Ergebnisse

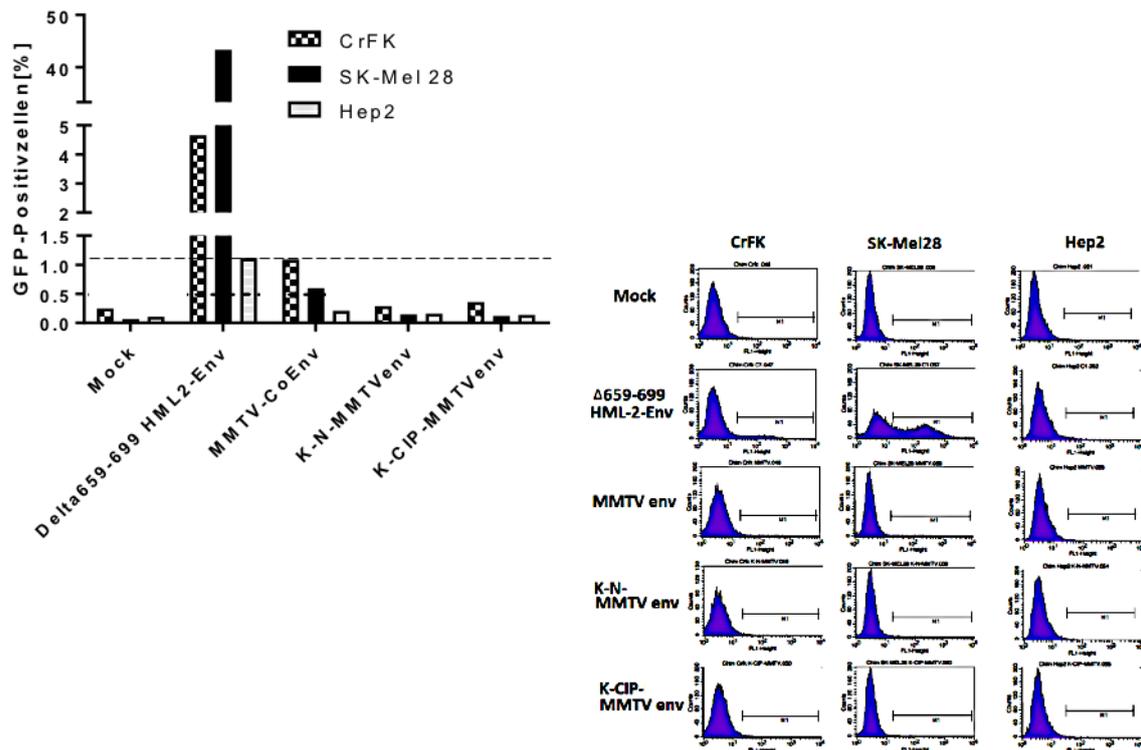


Abbildung 22: Fehlende Detektion der Expression des viralen Reporter-Gens GFP bei HML-2-permissiven Zellen, die mit HIV-VLP mit den HML-2-MMTV-Env-Chimären, K-N-MMTV- und K-CIP-MMTV-Env, inkubiert wurden.

8.4. Untersuchung einer möglichen Interferenz vom exogen überexprimierten HML-2-Env mit dem Zelleintrittsvorgang von HML-2-Env-HIV-VLP.

Die bereits erfolgten Untersuchungen zu endogenen Retroviren zeigten, dass endogen exprimierte Envelope-Proteine Rezeptoren so blockieren können, dass den exogenen Viren keinen Eintritt in die Zelle ermöglicht wird [36].

Im Falle vom β -Retrovirus Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) wurde berichtet, dass das endogene Virus dem Zelleintritt von exogenen JSRV entgegenwirken konnte. Hierbei lag die Annahme nah, dass die Inhibition des Zelleintritts durch Rezeptor-Interferenz erfolgte [37].

Die vorliegende Untersuchung sollte die Frage beantworten, ob eine transgene Expression von HML-2-Env ebenfalls in einer Beeinträchtigung des Zelleintrittsvorgangs von HML-2-Env-HIV-VLP resultieren konnte. Die Untersuchung wurde in 293T-Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden, zwei Tage vor der

Ergebnisse

Inkubation mit den VLPs, die Zellen mit einem HML-2-Env-V5-Expressionplasmid transfiziert.

Dass die Zellen das exogene Env-Protein tatsächlich exprimierten, ist in der nachstehenden Abbildung 23 wiedergegeben. Der Nachweis einer korrekten Überexpression von HML-2-Env in den Zellen erfolgte dabei mittels Immunfärbung vom V5-getagged-Protein in den Zelllysaten von transfizierten Zellen. Ein Anti-V5-Antikörper wurde zu diesem Zweck verwendet. Man erkennt ab einer transfizierten DNA-Menge von 90 ng drei eindeutigen Proteinbanden bei den Größen zwischen 120 und 37 kDa, die auf drei unterschiedlichen Prozessierungsstufen des Env-Proteins zurückzuführen sind.

Zur Beurteilung der Transduktionsrate der HML-2-Env-HIV-VLPs in den transfizierten Zellen wurde drei Tage nach der Inkubation der Zellen mit den VLPs die Aktivität des Reportergens Luziferase im Zelllysate gemessen. Zur Transduktion wurden drei unterschiedlichen HIV-VLPs herangezogen, $\Delta 659-699$ - Env, seine Mutante $\Delta 144-152$ -Env als Negativkontrolle sowie VSV-G-HIV-VLP als Positivkontrolle, wobei bei jedem Ansatz mit vier unterschiedlichen transfizierten DNA-Mengen gearbeitet wurde. Zusätzlich wurde ein Ansatz ohne Überexpression von HML-2-Env mitgeführt (\emptyset Env). Dieser Ansatz diente als Referenzansatz. Bezogen auf letzteren sollte sich eine spezifische Blockierung des Eintritts durch eine Verminderung der Luciferase-Aktivität mit aufsteigender Überexpression des exogenen HML-2-Env abzeichnen. Die Ergebnisse der Untersuchungen können der nachfolgenden Abbildung 23 entnommen werden. Hierbei sind sie als Verhältnis zwischen den Messwerten der Behandlungsgruppe und dem gemittelten Wert des Referenzansatzes dargestellt (RLU-Ratio). Zur Feststellung von Abweichungen zwischen der Referenzgruppe und der verbleibenden Behandlungsgruppe wurde der Bonferroni-Test ausgewählt, wobei ein Konfidenzintervall (CI) von 95% eingesetzt wurde.

Ergebnisse

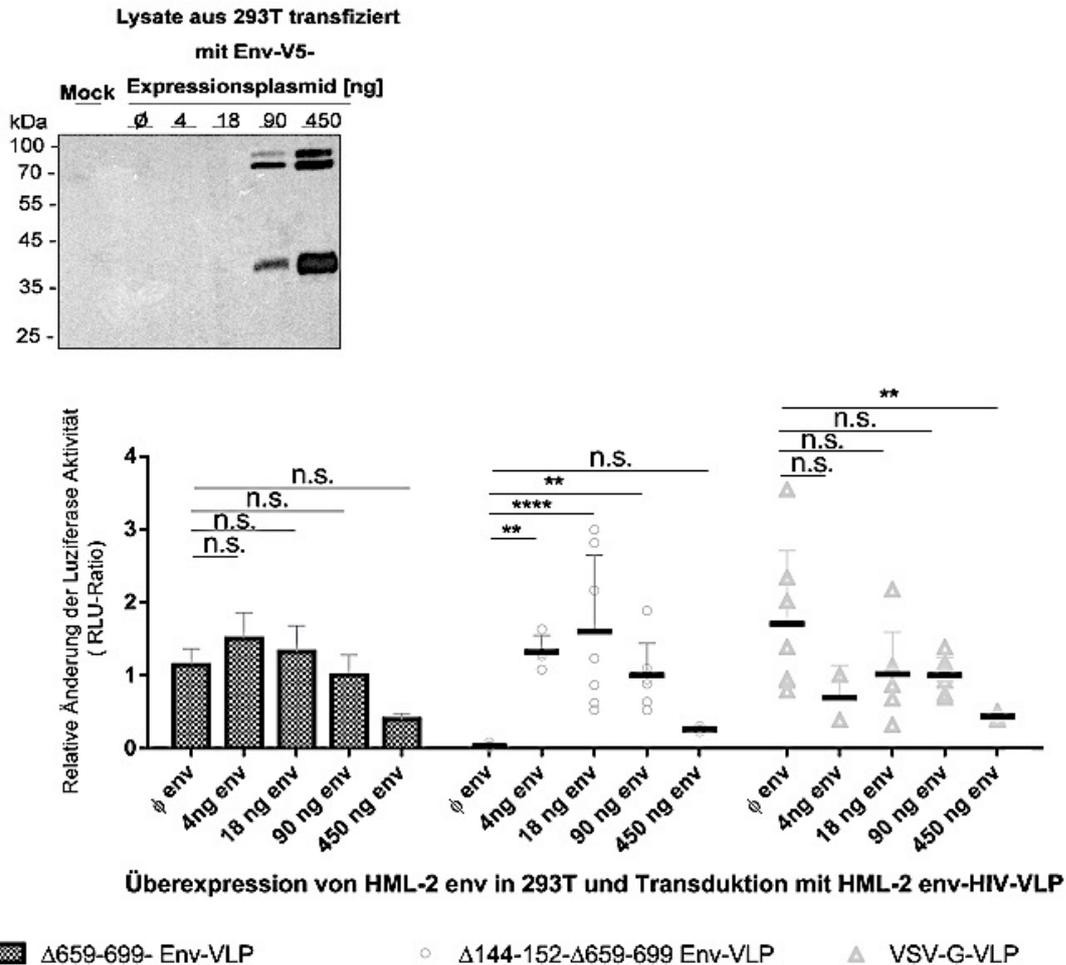


Abbildung 23: Oben: Überexpression von HML-2-Env und Transduktion von HML-2-Env-VLP. Unten: Transduktionsversuch in Zellen, die mit HML-2-Env- transfiziert wurden.

Für die Zellen, die mit Δ 656-699-HML-2-Env- sowie VSV-G-HIV-VLPs behandelt wurden, erkennt man bis zu einer transfizierten DNA-Menge von 90 ng keine statistisch signifikante Änderung der Expression des Reportergens Luciferase. Für solche, die mit 450 ng DNA transfiziert wurden, ist eine mäßige Abnahme der Aktivität von Luciferase, jedoch lediglich nach einer Inkubation mit VSV-G-HIV-VLPs, zu beobachten. Es wird hier ein nicht-spezifischer Effekt vermutet. Letzterer könnte durch eine Zerstörung der Zellen, aufgrund der über das physiologische Maß hinaus stattgefundenene Expression von HML-2-Env, hervorgerufen worden sein.

Erstaunlicherweise erkennt man nach einer Behandlung der Zellen mit Δ 144-152-HML-2-Env-HIV-VLP, und wenn die Zellen mit einer DNA-Menge von 4- bis 90 ng zuvor transfiziert wurden, eine Zunahme der Luciferase-Aktivität über den Wert des Referenz- Ansatzes. Diese Zunahme weist eine statistische Signifikanz auf und deutet insofern auf Zelleintrittsereignisse hin. Mit der Erhöhung der transfizierten

HML-2-Env-DNA auf 450 ng fiel die Luciferase-Aktivität wieder ab und wies Werte auf, die wieder im Bereich des Referenz-Ansatzes lagen.

Die Beobachtungen aus dieser Untersuchungsreihe geben keinen eindeutigen Hinweis auf eine spezifische Blockierung des Rezeptors durch das überexprimierte HML-2-Env-Protein.

8.5. Nachweis der Interaktion zwischen einer HML-2-Env-Chimäre und dem Rezeptor

8.5.1. Bindung-Assay

Zelluläre Rezeptoren für ein bestimmtes Virus können anhand unterschiedlicher Verfahren identifiziert werden. Eine Methode, die in Betracht gezogen werden kann, besteht in der Identifizierung von Bindungspartnern der in Frage kommenden Zelloberflächenmoleküle anhand von Screeningsverfahren. Dazu soll eine bestehende spezifische Interaktion mithilfe von Bindungs-Assays belegt werden. In weiteren Verfahren kann man sich diese spezifische Interaktion zunutze machen und somit den (die) Rezeptorkandidaten z.B. mittels Affinitätsverfahren aus der Zelle isolieren. Massenspektrometrische Analysen erlauben die Identifizierung der isolierten Proteine. Weiterführende Ansätze liefern Hinweise darauf, ob die Kandidaten tatsächlich als Rezeptoren fungieren könnten. Zu diesen Ansätzen zählen z.B. die Transformation von nicht-permissiven Zellen mit dem (den) Kandidaten und nachfolgende Transduktionsversuche mit den transformierten Zellen. Ziel der nachstehenden Untersuchungen war die Überprüfung, ob ein Protein bestehend aus der Oberflächeneinheit von HML-2-Env (SU) und Fc-Region des humanen Immunglobulins, HML-2-SU-h-Fc, als Interaktionspartner des zellulären Rezeptors für HML-2 fungieren konnte. Die Annahme, dass HML-2-SU mit dem Rezeptor interagieren könnte, lässt sich mit der Tatsache begründen, dass bei einem Infektionsvorgang mit umhüllten Viren, diese Untereinheit, die SU, den ersten Kontakt mit dem Rezeptor herstellt. SU vermittelt den Zelleintritt, indem sie den Rezeptor spezifisch erkennt und bindet. Daher stellt sie den perfekten spezifischen Interaktionspartner des entsprechenden zellulären Rezeptors dar und könnte verwendet werden, um letzteren aus der Zelloberflächenmembran zu isolieren.

Optimierungsversuch zum Bindungs-Assay mit Zellen in Suspension.

Die spezifische Bindung von HML-2-SU-h-Fc auf Oberflächenkomponenten von HML-2-permissiven Zellen sollte belegt werden. Zur Detektion dieser Interaktion sollte ein an die Fc-Region der Chimäre HML-2-SU-h-Fc spezifisch bindender Fluorophor-gekoppelter-anti-human-IgG Antikörper angesetzt werden. Da letzterer ebenso unspezifisch mit weiteren Oberflächen Komponenten wechselwirken könnte, wurde im Rahmen eines Optimierungsansatzes, um die bestmöglichen Untersuchungsbedingungen für die späteren Binding-Assays zu gewährleisten, verschiedene experimentellen Bedingungen getestet, so dass es zu möglichst wenigen unspezifischen Bindungsereignissen von Fluorophor-gekoppelten-anti-human-IgG kommt und demzufolge die Rate an falsch-positiven Ereignissen minimiert wird. Abbildung 24 gibt die Ergebnisse dieser Optimierungsstrategie wieder. In dieser Versuchsreihe wurden die Zellen in Suspension gebracht und vor der Inkubation mit dem fluorophor-markierten Anti-human- IgG-AF488 mit zwei unterschiedlichen Blockierungspuffern behandelt. Dabei wurde der Antikörper in den Verdünnungsfaktoren 250, 500 und 1000 parallel angesetzt. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse des Ansatzes. Daraus zu entnehmen sind die niedrigen unspezifischen Bindungsereignisse beim Ansatz vom Blockpuffer mit 2,5% BSA. Im Vergleich dazu erzielte der Ansatz mit dem FcR-Inhibitor-haltigen Blockpuffer eine höhere Rate an unspezifische Bindungsereignissen. Für die weiteren Untersuchungen wurden aus diesem Grund die Zellen stets mit dem Blockpuffer mit 2,5% BSA vorbehandelt.

Detektion von unspezifischer Bindung von a-h-IgG AF 488

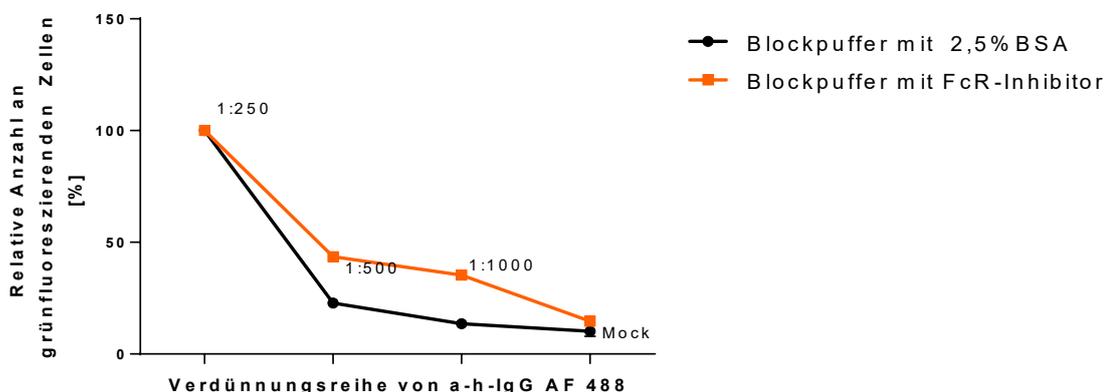


Abbildung 24: Versuch zur Minimierung vom Hintergrundsignal von anti-human-IgG für die späteren Bindungs-Assays. Zellen wurden vor der Inkubation mit Anti-human-IgG-AF488 mit entweder einem 2,5%igen-BSA- oder FcR-Inhibitor-haltigen Puffer vorbehandelt. Die Inkubation mit Anti-human-IgG-AF488

erfolgte im Anschluss daran. Der Blockpuffer mit 2,5% BSA lieferte im Vergleich zum Blockpuffer mit dem FcR-Inhibitor die niedrigeren unspezifischen Bindungsereignisse.

8.5.2. Die Env-Chimäre HML-2-SU-h-Fc bindet spezifisch auf der Oberfläche von HML-2-permissiven Zellen.

Eine spezifische Bindung von HML-2-SU-h-Fc an Zelloberflächenmoleküle, die in Viruseintrittsereignissen von HML-2- involviert sind, sollte in den vorliegenden Untersuchungen überprüft werden. Eine solche Wechselwirkung sollte die Bestätigung dafür liefern, dass HML-2-SU-h-Fc in der Lage ist, an potentielle Rezeptoren für das HML-2-Virus zu binden und wäre somit ein geeigneter Kandidat für zukünftige Strategien zur Isolierung von diesem Rezeptor. Dies wurde bereits im Punkt 8.5.1 erwähnt.

Die oben genannte Wechselwirkung sollte anhand von Wettbewerbsuntersuchungen überprüft werden. Es handelte sich dabei um eine indirekte Nachweismethode, wobei gleichzeitig HML-2-Env-HIV-VLP und das Fusionsprotein HML-2-SU-h-Fc den Zellen zugegeben werden sollten. Eine Besetzung und Blockierung von für den Zelleintritt relevanten Zelloberflächenfaktoren durch letzteres sollte sich durch die Abnahme der Transduktionsrate von HML-2-Env-HIV-VLP in den permissiven Zellen bemerkbar machen. HML-2-Env-HIV-VLPs hätten in diesem Fall weniger Wechselwirkungen mit Oberflächenmolekülen, wie z.B. Rezeptoren, zur Verfügung, um einen spezifischen Zelleintritt zu vollziehen. Hierbei sollte die Abnahme der Transduktionsrate stets bezogen auf einen Kontrollansatz mit einem SU-Fc eines Envs durchgeführt werden, das nicht an den HML-2 Rezeptor bindet.

1. HML-2-SU-h-Fc und NSU-h-Fc (XMRV-SU-Fc) können exprimiert und aufgereinigt werden.

Zu den Wettbewerbsuntersuchungen, die so eben vorgestellt wurden, sollte eine geeignete Negativkontrolle gefunden werden. Zu diesem Zweck wurde ein ähnlich aufgebautes Fusionsprotein herangezogen, NSU-h-Fc, das anstelle der Oberflächeneinheit von HML-2-Env, SU, die SU von einem anderen Retrovirus, das XMRV, trägt. XMRV gehört zur Familie der γ - Retroviren, sodass es anzunehmen war, dass bei Letzterem für den Zelleintritt ein anderer Rezeptor als den des HML-2, welches ein β -Retrovirus ist, verwendet wird.

Ergebnisse

Die erste Untersuchungsphase bestand darin, die spezifische Blockierung des Zelleintritts von XMRV-Env-HIV-VLP in die entsprechenden permissiven Zellen durch das immunogen NSU-h-Fc⁷ zu bestätigen. Dieser Schritt fungierte als „Proof of principle“ und sollte daher belegen, dass eine spezifische Besetzung von einem Virus-Rezeptor durch ein Immunogen-Chimärprotein unter den in der vorliegenden Arbeit experimentellen Bedingungen möglich war und tatsächlich zur Beeinträchtigung des Zelleintritts vom Virus führen konnte.

Expression der Chimärproteine

Die korrekte Expression der Fusionsproteine HML-2-SU- und NSU-h-Fc wurde in 293T nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit dem Expressionsvektor für das Erstere bzw. pCSI-XSU-Fc transfiziert. Letzterer codiert für die xenotropische Variante der Oberflächeneinheit des Envelopeproteins vom N-tropen⁸ Maus-Leukämie-Virus, die als NSU bezeichnet wurde. Die Lyse der transfizierten Zellen erfolgte einen Tag oder zwei Tage posttransfektion und der Proteinnachweis mittels Immunaффinität mit dem anti-h-IgG. Dabei wurden die Proteine aus dem Zelllysat oder aus dem Zellkulturüberstand- Affinitätsaufgereinigt und detektiert. Zusätzlich dazu wurde ein Ansatz mit dem leeren pcDNA 3-Vektor als Negativkontrolle mitgeführt. Beide korrekt exprimierten Proteine, NSU- und HML-2-SU-h-Fc, sind in der untenstehenden Abbildung 25 zu sehen. Die Proteinbanden unterscheiden sich erwartungsgemäß in ihren Größen, welche unter denaturierenden Bedingungen ~110 kDa für das erstere und ~90 kDa für das letztere betragen. Dies ist eindeutig in der Abbildung zu erkennen.

⁷ Der Expressionsvektor von NSU-h-Fc, pCSI-XSU-Fc, wurde uns freundlicherweise von Dr. Dusty Miller zur Verfügung gestellt.

⁸ N-trope Viren vermehren sich vorwiegend in Zellen von NIH/Swiss(N)-Mäusen

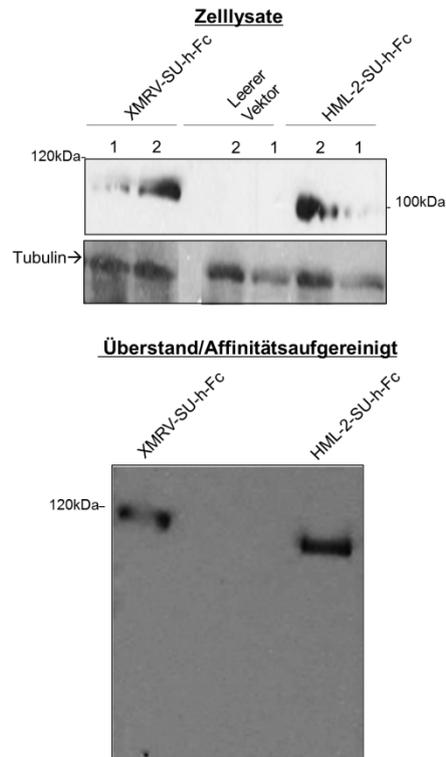


Abbildung 25: Expressionsnachweis von HML-2-SU- und XMRV-SU-h-Fc (NSU-h-Fc) in 293T-Zellen.

2. Auf XMRV-Env-HIV-basierte-VLPs binden spezifisch an die Zelllinien A549 und DU145

Die Permissivität der humanen Zelllinien A549 und DU149 gegenüber dem XMRV wurde in früheren Studien bereits bestätigt [63]. In der vorliegenden Untersuchung sollte nun festgestellt werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten HIV-basierten VLPs, die das Envelope-Protein von XMRV trugen, ebenfalls in der Lage waren, die beiden Zelllinien spezifisch zu binden. Zu diesem Zweck wurde als Erstes ein Adhäsionsassay durchgeführt.

8.5.2.2.1. Adhäsionsassay mit XMRV-Env-HIV-VLP

Die Adhäsion eines Virus an die Wirtszelle ist ein entscheidender Infektiositätsfaktor. Dies geschieht über Interaktionen zwischen viralen Oberflächenkomponenten und Zelloberflächenfaktoren, wozu Rezeptoren gehören. Um eine eventuelle Interaktion zwischen den viralen und zellulären Komponenten zu erfassen und ggf. zu quantifizieren, wurden konfluente monolayer von A549 und DU145-Zellen in Suspension gebracht und die Zellen gezählt. In der Untersuchung wurden zwei Mengen von HIV-VLPs verwendet, 30 ng- und 240 ng- p24. Des Weiteren wurden

Ergebnisse

zur Erfassung von falsch-positiven Fluoreszenzsignalen zwei weiteren Ansätze mitgeführt, die experimentell gleichbehandelt wurden wie die Behandlungsgruppen, jedoch keine Behandlung mit VLPs erfuhren. Diese Zellen wurden als Naivzellen bezeichnet. Von diesen Kontrollgruppen wurde lediglich eine mit dem Fluoreszenzgekoppelten anti-V5-AF488 gefärbt während die andere ungefärbt blieb. Erstere fungierte somit als Kontrolle zur unspezifischen Bindung vom Fluoreszenzgekoppelten anti-V5-AF488 an die Zellen, während letztere als Negativkontrolle diente.

Die Adsorption von XMRV-Env-pseudotypisierten HI-Viren auf die Zelllinien A549 und DU145 ist in der nachstehenden Abbildung 26 abgebildet. Die VLPs konnten auf beiden Zelllinien adhären. Dies ist durch die prozentuale Erhöhung der Anzahl von grün-fluoreszierten Zellen über den Wert der gefärbten Naivzellen wiedergegeben. Die Erhöhung betrug bis zum 8-fachen des Referenzwertes. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten XMRV-Env-HIV-VLPs können somit an die Zellen spezifisch adhären.

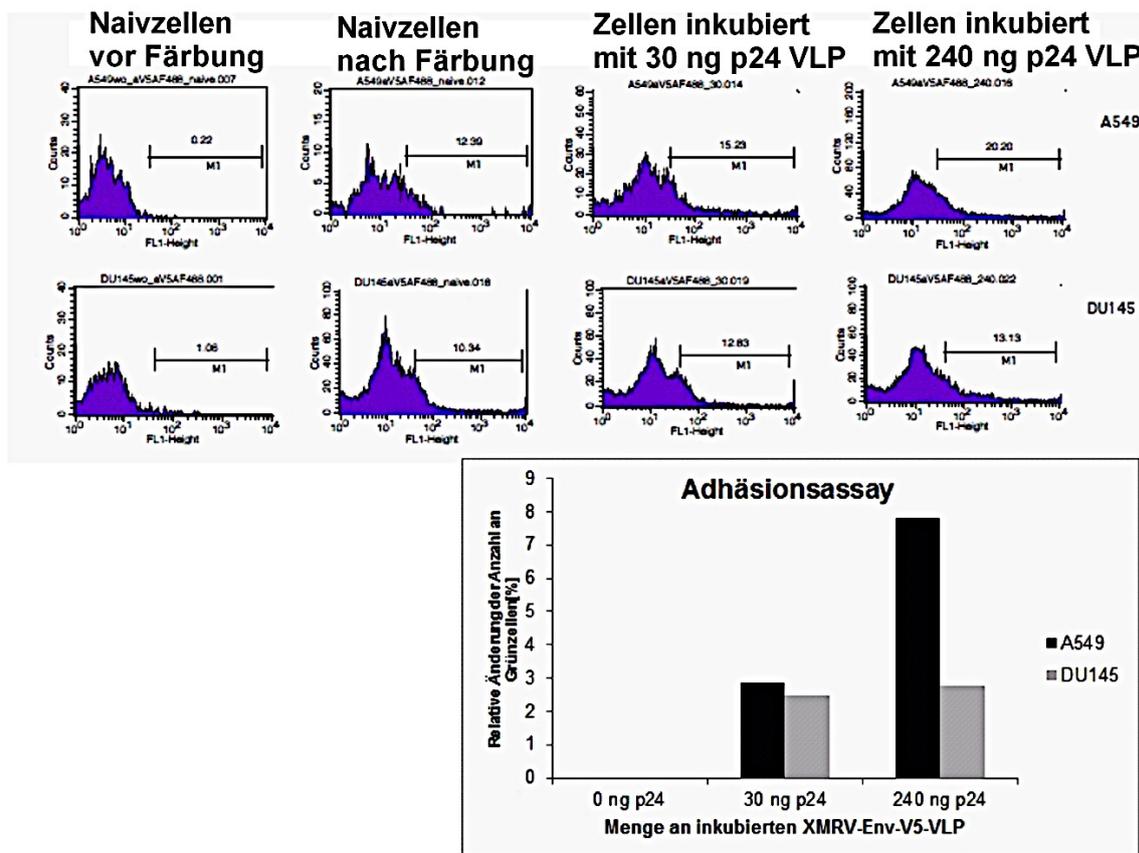


Abbildung 26: XMRV-Env-V5-HIV-VLPs können an die humanen Zelllinien DU145 und A549 adhären.

Oberes Bild: Rohdaten zum unteren Bild. Unteres Bild: Relative Änderung der Anzahl an

grünfluoreszierenden Zellen. Als Nullwert wurde die prozentuale Anzahl von naiven und mit anti-V5-AF488-gefärbten Zellen herangezogen. In Bezug auf diesen Wert wurde, nach einer Behandlung der Zellen mit V5-markierten-XMRV-Env-HIV-VLPs, eine bis zu 8-fache Erhöhung der Anzahl an grünfluoreszierenden Zellen detektiert.

8.5.2.2.2. Auf XMRV-Env-HIV-basierte-VLP können die Zelllinien 293T, A549, DU145 und SKMel 28 transduzieren.

Wie bereits erwähnt, sollte eine Kompetition zwischen XMRV-Env-HIV-VLP und NSU-h-Fc belegt werden. Aus diesem Grund wurde der Zelleintritt von XMRV-Env-HIV-VLP in die humanen Zelllinien A549 und DU149 untersucht. Darüberhinaus wurde die Zelllinie 293T ebenso untersucht.

Den Zellen wurden mit XMRV-Env-tragenden HIV-VLPs transduziert. Als Negativkontrolle wurden Δ 144-152-HML-2-Env-Mutanten-HIV-VLP herangezogen. Des Weiteren dienten Naivzellen (Mock) als weitere Kontrolle, um zellkulturbedingte zelluläre Antworten, die nicht auf die virale Belastung zurückzuführen wären, zu erfassen. Die Beurteilung der Rate der erfolgreichen Zelleintrittsereignisse wurde mittels durchflusszytometrischer Zählung von grün-fluoreszierenden Zellen bestimmt, denn die virale RNA codierte u.a. für das Reporter-Protein GFP. Die Ergebnisse sind der Abbildung 27 zu entnehmen. Es lässt sich erkennen, dass XMRV-Env-HIV-VLP ein gutes Transduktionsvermögen in den Zelllinien 293T und A549 aufwiesen, wobei die Zelllinie 293T, mit ca. 69% GFP-Positivzellen, sich durch eine um das 2-fache höhere Permissivität für die VLP als die Lungenkarzinom-Zelllinie A549 auszeichnete, deren Transduktionsrate ca. 33% betrug. Erstaunlicherweise wies die Prostata-Krebszelllinie DU145 dahingegen mit lediglich 1% GFP-Positivzellen eine geringe Permissivität für die oben genannten VLPs auf. Im Gegensatz dazu und als Positivkontrolle zeigten VSV-G-HIV-basierte-VLPs in der letzteren Zelllinie eine Transduktionseffizienz von 37,59% (siehe unterste Spalte in der Abbildung 27). Diese geringe Permissivität entsprach nicht der Erwartung, weshalb die Zelllinie DU145 genauer untersucht wurde. Dies ist dem nachfolgenden Abschnitt *“Nähere Betrachtung der Zelllinie DU145“* zu entnehmen.

Ergebnisse

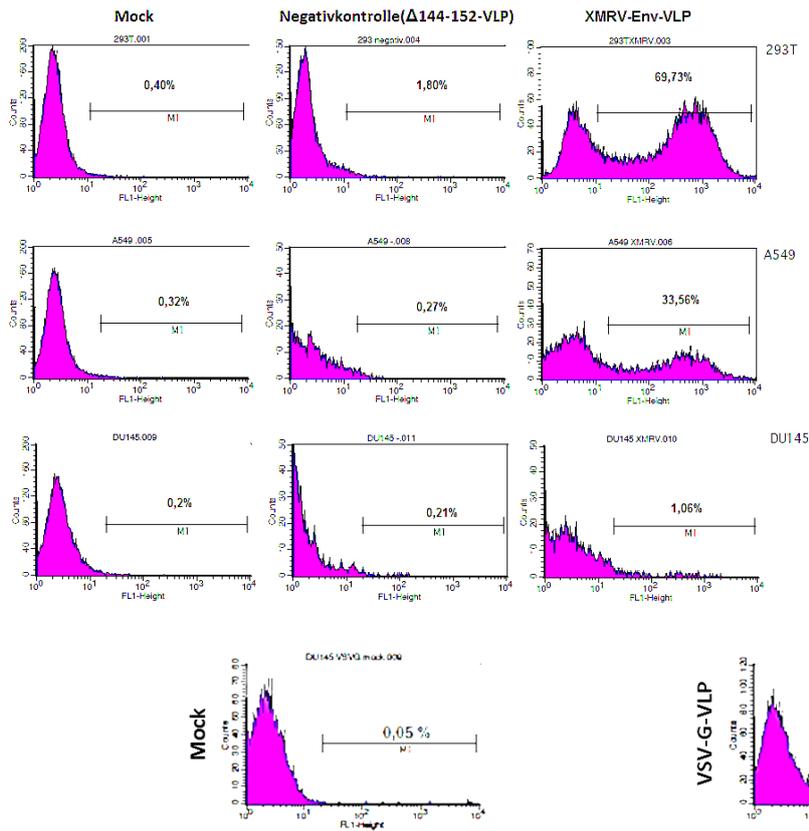


Abbildung 27: 293T- und A549-Zellen sind gut transduzierbar mit XMRV-Env-HIV-VLP. Die Zellen wurden mit XMRV-Env-HIV-GFP-Pseudotypen behandelt und die Expression des Reportergens drei Tage posttransduktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Nähere Betrachtung der Zelllinie DU145: DU145 lassen sich mit titriertem XMRV-Env-HIV-VLP transduzieren.

Die Antwort von DU145- Zellen auf eine Behandlung mit XMRV-Env-HIV-VLPs wurde näher analysiert, denn, wie so eben beschrieben, konnte nur eine sehr geringe Anzahl von GFP-Positiv-Zellen nach einer Behandlung mit den VLP detektiert werden.

Es wurde eine Virustitration durchgeführt wobei, bezogen auf die Konzentration des Capsid-Proteins p24, die Zellen mit 1-, 10-, 50-, 100- sowie 150 ng VLP behandelt wurden. Hierbei wurden Pseudoviren verwendet, die die Luciferase-RNA trugen. Die Expression von Luciferase in den behandelten Zellen wurde posttransduktionell mittels Luciferase-Assay bestimmt. Der Luciferase-Assay zeichnet sich nämlich gegenüber der im Punkt 8.5.2.2 verwendeten durchflusszytometrischen Analyse durch eine höhere Empfindlichkeit, weshalb ersterer in diesem Titrationsversuch herangezogen wurde.

Ergebnisse

Als Positivkontrolle fungierte ein Parallelansatz, bei dem die Zellen mit VSV-G-HIV-basierten-VLP belastet wurden.

Abbildung 28 gibt die Ergebnisse der Virustitration wieder. Dargestellt sind die logarithmischen Werte der p24-Konzentration in Korrelation mit den gemessenen Luciferase-Aktivitäten (RLU). Darin zu erkennen ist ein gleicher Verlauf der Kurve sowohl bei der Positivkontrolle als auch bei der XMRV-Env-HIV-VLP-Behandlungsgruppe. Bei Letzterer zeigten Zellen nach einer Behandlung mit 1 ng p24-VLP (Log 0) eine entsprechende niedrige Luciferase-Aktivität von unter 1000 RLU. Die Aktivität des Reporter-Gens stieg mit zunehmender Konzentration der VLP an und erreichte mit dem p24-Log-Wert von ca. 2,3 den Wert von ca. $3,5 \cdot 10^7$ RLU. Die der untenstehenden Abbildung 28 zu entnehmende dosisabhängige-Beziehung zwischen Ausmaß der viralen Belastung und Expression des viralen Reporter-Gens Luciferase in den analysierten Zellen belegt, dass DU145- Zellen tatsächlich für XMRV-Env-HIV-VLP permissiv sind.

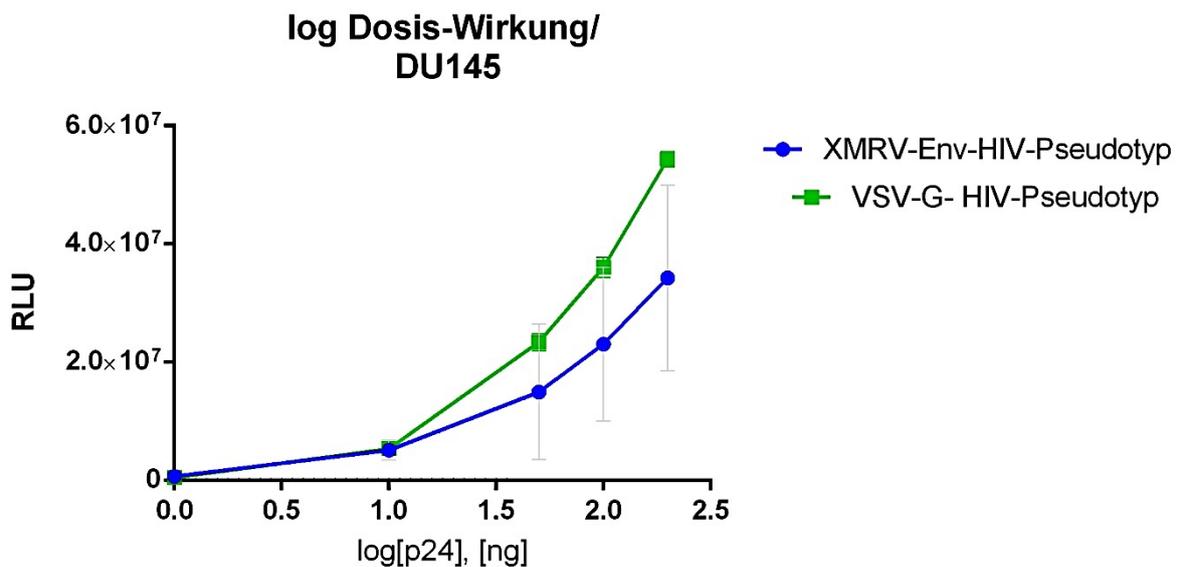


Abbildung 28: HIV-VLP, die mit dem XMRV-Env pseudotypisiert sind, können DU145-Zellen in einer Dosis-abhängigen Weise transduzieren. Log Dosis-Wirkungskurve: Die Prostata-Krebszellen DU145 wurden unter Bedingungen inkubiert, die eine Transduktion von den HIV-Pseudotypen erlaubten. Der Viruseintritt in den behandelten Zellen wurde mittels Luciferase-Assay nach Hersteller's Angaben gemessen.

8.5.2.2.3. SKMel 28 und XMRV-Env-HIV-VLP

Ein Titrationsversuch wurde ebenfalls mit der Zelllinie SK-Mel28 durchgeführt, denn die humane Melanoma-Zelllinie erwies sich in der vorliegenden Arbeit mit bis zu ca. 47% transduzierten Zellen als besonders gut permissiv für HML-2-Env-VLP (siehe auch Punkt 8.1.1). Die Titration wurde auf die gleiche Weise durchgeführt, wie bereits im obenstehenden Abschnitt *“Nähere Betrachtung der Zelllinie DU145“* beschrieben. Die nachstehende Abbildung 29 stellt die Ergebnisse des Titrationsversuchs dar und zeigt deutlich, dass SKMel28 in Dosis-abhängiger Weise für XMRV-Env-HIV-Pseudoviren empfindlich sind.

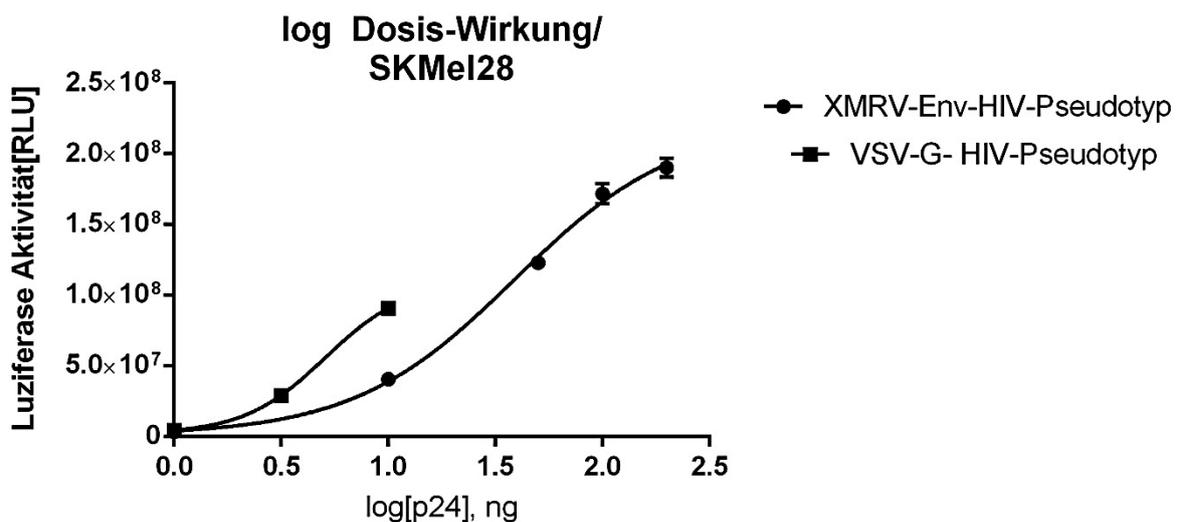


Abbildung 29: SKMel28- Zellen werden erfolgreich und dosisabhängig durch HIV-VLP, die mit dem XMRV-Env pseudotypisiert sind, transduziert.

8.5.2.2.4. Ein Chimärprotein kann den spezifischen Zelleintritt von HIV-Basierten VLP in einer Dosis-abhängigen Weise verhindern: Fall von Chimären NSU-h-Fc und XMRV-Env-HIV-VLP

Kompetitionsassay

Wie im obenstehenden Abschnitt 8.5.2.2 eindeutig gezeigt wurde, wurden vier Zelllinien für einen Eintritt durch XMRV-Env-basierte-Pseudoviren positiv getestet. Nun sollte eine mögliche spezifische Blockierung des Zelleintritts von diesen VLP in einer dieser Zelllinien durch das Chimäre NSU-h-Fc untersucht werden. Wie bereits erwähnt, sollte dieser Schritt nachweisen, dass der Zelleintritt eines pseudotypisierten VLPs durch ein SU-Fc Protein inhibiert werden kann.

Der Assay wurde mit den Zelllinien CrFK, HEK 293T und A549 durchgeführt. Das zugrundeliegende Prinzip ist die gleichzeitige Rezeptorerkennung sowohl durch den Virus-Pseudotyp, der das Env-Protein entweder von XMRV oder HML-2 trug, als auch eine Chimäre bestehend aus der extrazellulären Domäne (SU) des HML-2-Env oder XMRV und dem humanen Fc-Teil. Durch die Anwesenheit dieses Kompetitors sollten insgesamt weniger entsprechende VLPs an den Rezeptor binden als wenn dieser fehlte. Für die Untersuchung wurden die als permissiv bestätigten Zellen ein Tag Vorab ausgesät und am nächsten Tag unter Bedingungen, die eine Transduktion begünstigten, gleichzeitig mit dem Virus und dem jeweiligen SU-Fc-Protein inkubiert. Zwei Stunden später wurde das virushaltige Medium abgenommen und die Zellen mit frischem Medium für weitere 48 Stunden inkubiert. Die Detektion des viralen Reporterproteins als Indikator für den erfolgten Zelleintritt erfolgte mittels Luciferase-Assay oder Durchflusszytometrie.

NSU-h-Fc kompetitiert mit XMRV-Env-HIV-VLP um die Bindung an den Rezeptor in den rezeptiven Zellen

Um diesen Nachweis zu erbringen wurde ein Wettbewerbsassay durchgeführt. Dabei wurden die Prostata-Krebszellen DU145 ein Tag nach der Zellaussaat mit XMRV-Env-HIV-VLP belastet und unter Bedingungen inkubiert, die eine Transduktion ermöglichte. Es wurden 5 Parallelansätze geführt, wobei jeweils die Konzentration des aufgereinigten Proteins NSU-h-Fc variiert wurde. Eine Kontrolle des Proteins erfolgte mittels Western blot mit dem α -h-IgG und ist dem oberen rechten Bild der Abbildung 30 zu entnehmen. Dabei wurden 2-, 4- und 8 μ g des Proteins aufgetragen. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels Bradford-Assay.

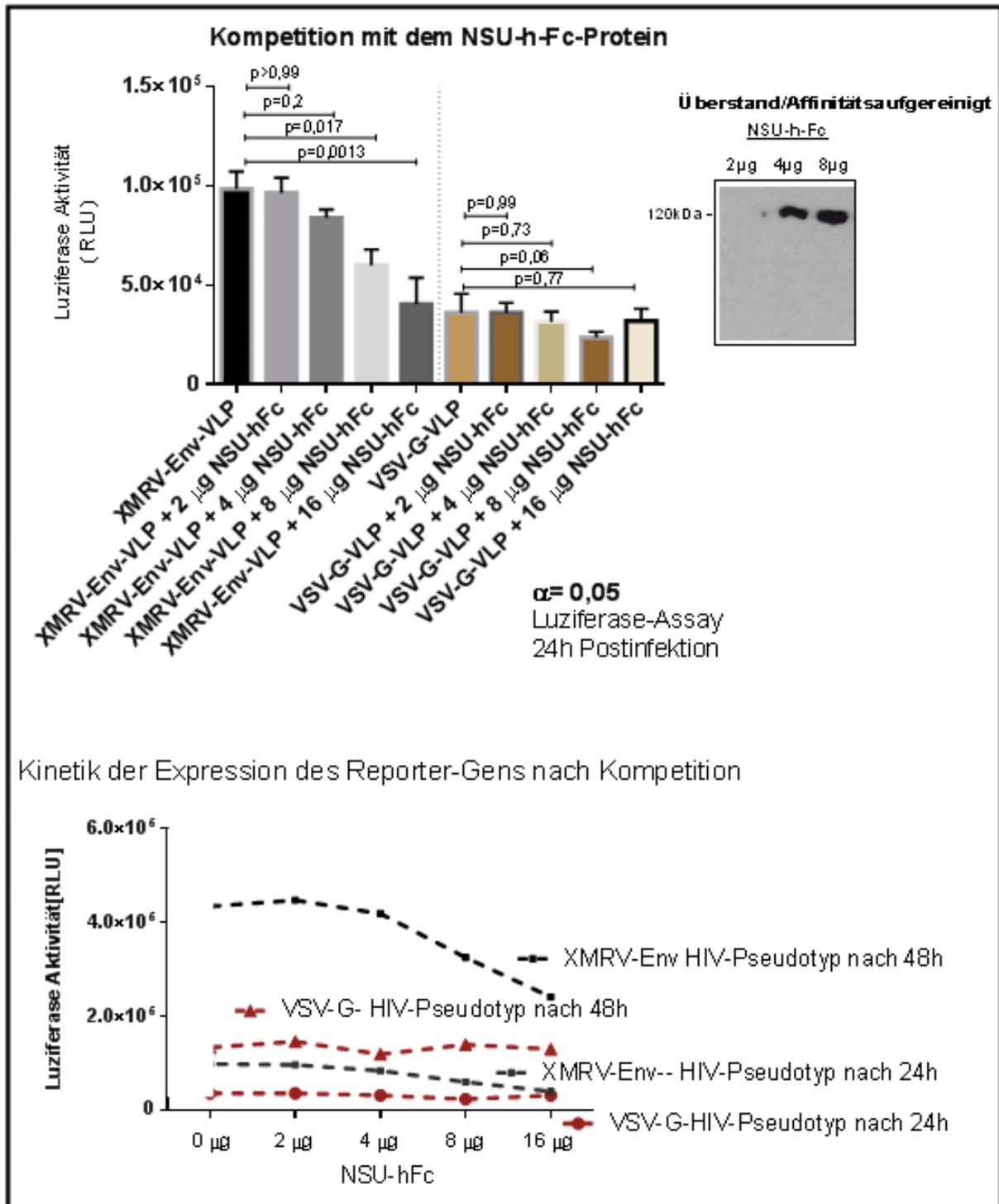
Als Kontrolle einer spezifischen Antwort der Zellen auf die Behandlung wurden Parallelansätze mit VSV-G-HIV-VLP geführt. Die Messung des Reporter-Proteins in der erfolgreich transduzierten Prostata-Krebszelllinie DU145 erfolgte 24 Stunden posttransduktion. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse des Assays. Man kann daraus entnehmen, dass sich die Luciferase-Aktivität erst bei einer Zugabe von 4 μ g NSU-h-Fc von dem Bezugswert, der durch die Luciferase-Aktivität ohne eine NSU-h-Fc-Behandlung dargestellt ist, signifikant unterscheidet (p-Wert = 0,2). Hierbei sinkt in den Zellsaten von den behandelten Zellen die Luciferase-Aktivität. Weitere stärkere Abnahmen der Luciferase-Aktivität wurden mit 8 μ g (p-Wert = 0,017) und 16 μ g (p-

Ergebnisse

Wert = 0,0013) NSU-h-Fc-Mengen erreicht. Im Gegensatz dazu, zeigten die Ansätze mit VSV-G-HIV-VLP, auch bei zunehmender Menge an NSU-h-Fc und in Bezug auf eine Kontrollgruppe ohne NSU-h-Fc-Zugabe, keine statistisch signifikante Änderung der Luciferase-Aktivität. Die p-Werte liegen hierbei zwischen 0,73 und 0,99 auf. Eine Ausnahme stellt der Ansatz mit 8 µg NSU-h-Fc dar, bei dem eine statistische Signifikanz errechnet wurde (p-Wert = 0,06). Bei der höheren NSU-h-Fc-Menge von 16 µg wurde jedoch mit einem p-Wert von 0,77 keine statistisch signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe beobachtet, so dass die Annahme nahegelegt werden kann, dass dieser Effekt durch eine experimentell bedingte Schwankung der Messwerte hervorgerufen wurde.

Eine Vergleichsanalyse, in der die Inkubationsdauer nach der viralen Belastung auf 48 Stunden erhöht wurde, ist im unteren Bild der Abbildung 30 abgebildet („*Kinetik der Expression des Reporter-Gens nach Konkurrenz*“). Es ist dabei, und im Vergleich zu der soeben genannten Analyse, keine Veränderung des Verlaufs der Kurve zur Luciferaseaktivität zu beobachten. In beiden Fällen, d.h. nach 24 und 48 Stunden, trat nämlich eine Verminderung der Aktivität des Reporter-Gens von XMRV-Env-HIV-VLP erst bei einer Zugabe von 4 µg NSU-h-Fc auf, während die Transduktionsrate der Kontroll-VLPs, VSV-G-VLP, bei jeder angesetzten Immunogen-Menge unverändert blieb. Diese zeitlich gleichbleibende Tendenz zeigt, dass NSU-h-Fc einen systematischen Einflussfaktor für die Stärke der Expression des Reporters-Gens hat.

Der systematische Rückgang der Expression von Luciferase mit zunehmender Konzentration an NSU-h-Fc im Medium weist darauf hin, dass das NSU-h-Fc den Rezeptor für XMRV-Env-HIV-VLP blockiert.



Kinetik der Expression des Reporter-Gens nach Kompetition

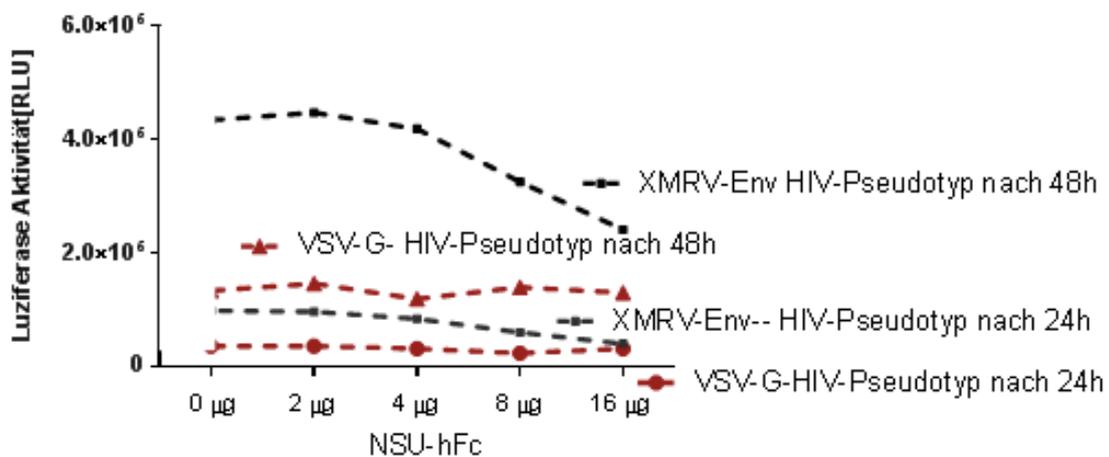


Abbildung 30: Das Chimärprotein NSU-h-Fc kompetiert mit XMRV-Env-Basierten VLPs um den zellulären Rezeptor in DU145-Zellen. **Obere Bilder:** Links: XMRV-Env-HIV-VLP und NSU-h-Fc wurden DU145-Zellen in Kultur zugegeben. Unterschiedliche Mengen an affinitätsaufgereinigtes NSU-h-Fc, die den Zellen zugegeben wurden, sind im oberen Bild **rechts** dargestellt. **Unteres Bild:** Die Tendenz zur Abnahme der Luciferase-Aktivität mit zunehmender Menge von NSU-h-Fc blieb bei XMRV-Env-HIV-VLP über die Zeit gleich.

3. Invitro-Detektion der Zelloberflächenbindung vom Chimärprotein HML-2-SU-h-Fc

Die Untersuchung zur Detektion einer spezifischen Zelloberflächenbindung vom Immunadhäsin HML-2-SU-h-Fc (auch als OriCoEnvSUFc bezeichnet) erfolgte mit der Zelllinie CrFK. Zur Detektion der Interaktion des Chimärproteins mit Membranproteinen wurde zunächst eine Optimierungsversuchsreihe durchgeführt, wobei verschiedene Parametern getestet und optimiert wurden. Zu diesen Parametern gehörten u.a. die anzusetzende Menge an Immunadhäsin, die Inkubationsdauer, die anzuwendenden Temperaturen in den verschiedenen Vorbereitungsphasen, die anzusetzenden Reagenzien und ihre Konzentration. Einige der Ergebnisse dieser Versuchsreihe können dem Abschnitt 8.5.1 entnommen werden. Aus den gewonnenen Kenntnissen wurden im Fall von einer Detektion mittels konfokalem Laser Scanningmikroskop folgende experimentellen Bedingungen angewendet: Zwei Tage nach Zellaussaat wurde das Zellkulturmedium gewechselt, dem frischen Zellkulturmedium ein affinitätsaufgereinigtes HML-2-SU-h-Fc-Präparat zugesetzt und die Zellen für weitere zwei Stunden mit dem Medium im Brutschrank inkubiert. Parallel dazu und als Kontrolle erfolgte eine gleichartige Behandlung von einem CrFK-Zellkulturansatz, wobei bei dem Letzteren kein HML-2-SU-h-Fc zugesetzt wurde. Im Anschluss daran wurden beide Ansätze für die Konfokal-Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet (zur Vorbereitung siehe Abschnitt 7.2.5.2). Auf der nachstehenden Abbildung 31 A, B und C erscheinen Fluoreszenz-Intensitätspeaks, die wahrscheinlich auf spezifische Bindungsereignisse vom HML-2-SU-h-Fc zurückzuführen sind. Die Zellen wurden in diesem Fall mit dem Immunadhäsin-Chimär inkubiert. Im Gegensatz dazu zeigten CrFK des Kontrollansatzes, der in den Teilabbildungen D, E und F veranschaulicht ist, keine Fluoreszenz-Intensitätpeaks, was die Annahme einer Bindung von HML-2-SU-h-Fc an eine Zelloberflächenkomponente bekräftigt.

Immunfluoreszenz-Detektion der Bindung von OriCoEnvSU-Fc auf der Zelloberfläche von CrFK

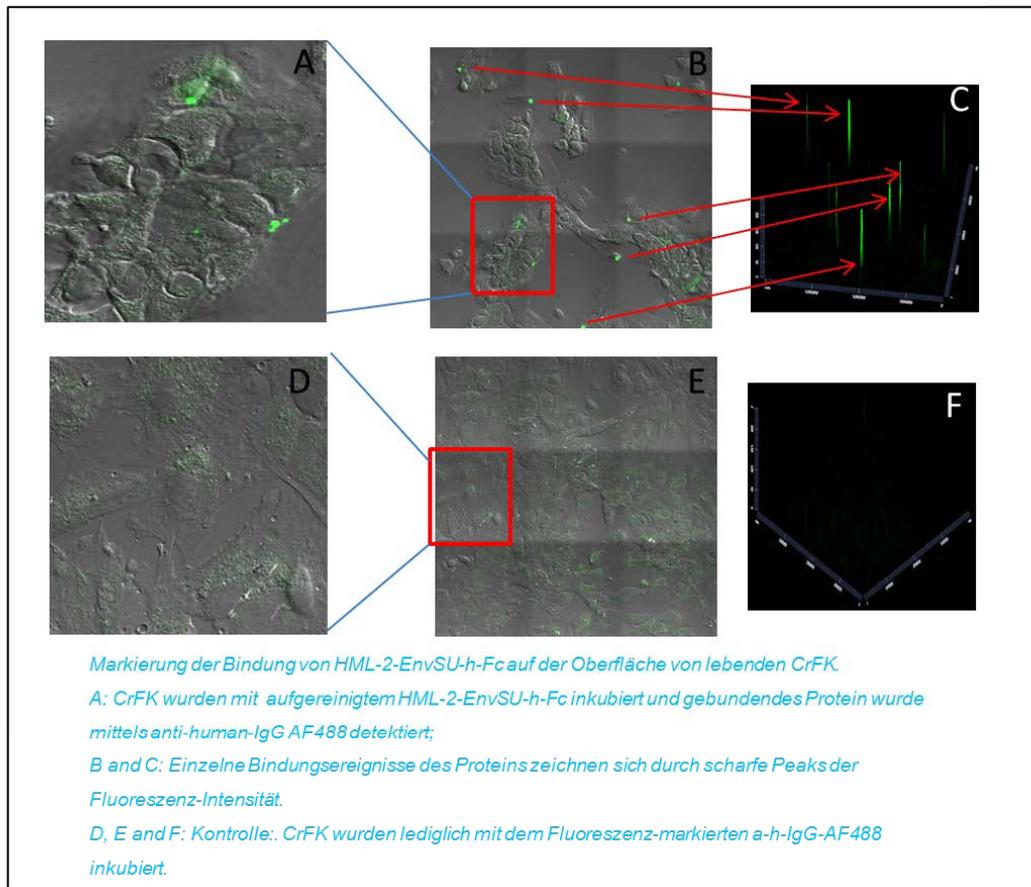


Abbildung 31: Immunfluoreszenz-Detektion der Bindung von HML-2-SU-Fc auf adhärenzte CrFK.

Zur Überprüfung, ob diese Oberflächenkomponente, die HML-2-SU-h-Fc binden konnten, ebenfalls in Eintrittsereignissen vom HML-2-Env-Pseudoviren involviert waren, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Diese sind im nachfolgenden Abschnitt 8.5.2.4 näher beschrieben.

4. Die Transduktionsrate von HML-2-Env-HIV-VLPs in der CrFK-Zelllinie wird durch das Chimärprotein HML-2-SU-Fc vermindert.

Nach erfolgreicher Erbringung des Nachweises, dass ein HML-2-Fc-Chimärprotein, wie in der vorliegenden Arbeit und unter den experimentellen Bedingungen, die angewendet wurden, auf einer permissiven Zellen adhärirt (s. Punkt 8.5.2.3), wurde nun eine mögliche Interaktion zwischen dem HML-2-SU-h-Fc und dem HML-2-Rezeptor untersucht.

Ergebnisse

Das HML-2-SU-h-Fc (auch als OriCoEnvSU-IgG bezeichnet) wurde von 293T sezerniert, die drei Tage zuvor mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt transfiziert wurden. Abbildung 32 zeigt den Nachweis von unterschiedlichen Mengen vom aufgereinigten Protein. Der Nachweis erfolgte mittels Immunverfahren mit dem anti-h-IgG. Die Proteinkonzentration wurde zuvor durch einen Bradford-Assay bestimmt. Zur Aufreinigung wurde die Affinität von h-Fc zum Protein G ausgenutzt. Dabei erfolgte die Aufreinigung unter Bedingungen, die die Tertiärstruktur des Proteins bewahrten.

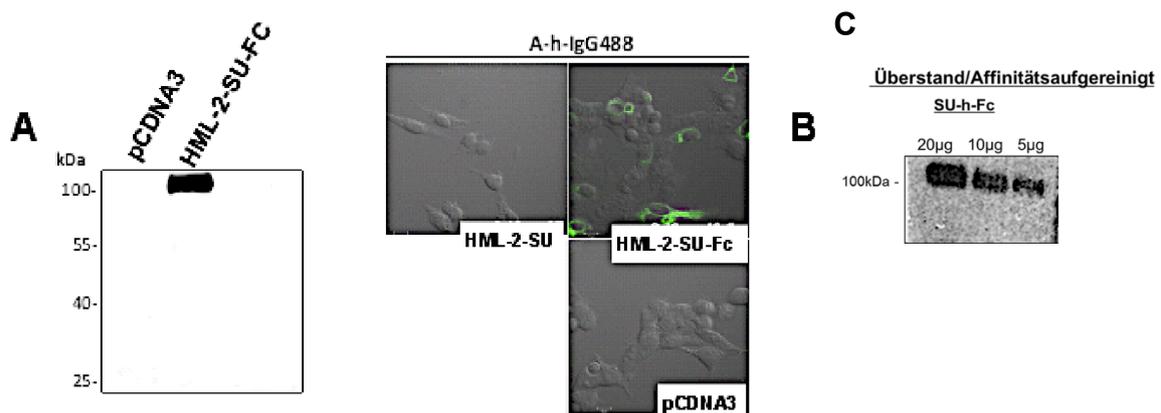


Abbildung 32: A: Aufgereinigte HML-2-SU-h-Fc. Nachweis der Proteine mittels Western blot mit anti-h-IgG. B: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der intrazellulären Expression von HML-2-SU-h-Fc. C: Verdünnungsreihe von HML-2-SU-h-Fc

Zur Untersuchung einer möglichen Wechselwirkung zwischen dem sezernierten HML-2-SU-h-Fc und dem unbekanntem Rezeptor auf HML-2-permissiven Zellen wurden CrFK-Zellen unter Zellkulturbedingungen gleichzeitig mit HML-2-Env-HIV-VLP und dem Chimärprotein-haltigen Zellkulturüberstand oder dem aufgereinigten Proteinpräparat inkubiert. Grundlegend erfolgte die Untersuchungsreihe in gleicher Weise wie im oben genannten Abschnitt 8.5.2.2.4 „*Kompetitionsassay*“ beschrieben. Mittels Messung der Aktivität des Reporters Luciferase wurde eine Schlussfolgerung über die Interaktion zwischen HML-2-SU-h-Fc und dem Rezeptor für HML-2 gezogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe ist in der Abbildung 33 zusammengefasst. Darin abgebildet sind die gemittelten Werte von mehr als 20 zeitlich unabhängigen und zum Zweck der Reproduzierbarkeit durchgeführten Versuchen.

Ergebnisse

Die nachstehende Abbildung 33 A stellt die Ergebnisse der experimentellen Ansätze dar, bei denen HML-2-SU-h-Fc (OriCoEnvSU-IgG) vor der Anwendung aufgereinigt wurde. Hierbei wurden Proteinmengen bis zu 30 pmol eingesetzt. Dargestellt sind die Verhältnisse der Luciferase-Aktivität bezogen auf eine Referenzgruppe (RLU-Ratio). Als Referenz wurde die Luciferase-Aktivität nach einer Zugabe von 2 pmol HML-2-SU-h-Fc (RLU-Ratio = 1) ausgewählt. Die Kontrollgruppe, in der kein Protein zugesetzt wurde (ϕ Protein), wies hierbei eine 3-fache höhere Luciferase-Aktivität als die der Referenzgruppe auf. Mit zunehmender Konzentration an HML-2-SU-h-Fc sanken die Luciferase-Aktivitäten in den transduzierten Zellen, was durch RLU-Ratios kleiner als 1 erkennbar ist. Im Gegensatz dazu war keine Veränderung der Luciferase-Werte zu beobachten, wenn die Zellen mit VSV-G-HIV-VLP transduziert wurden, was durch quasi gleichbleibende RLU-Ratios von ca. 1 wiedergegeben ist. Dass das HML-2-Fc-Protein auf CrFK-Zellen adhärert, wurde bereits im Abschnitt 8.5.2.3 gezeigt. Die soeben genannten Ergebnisse sowie die der Abbildung 33 B geben den starken Hinweis, dass diese Bindung an Moleküle erfolgt, die im Eintrittsvorgang von HML-2-HIV-VLP involviert sind. In der so eben erwähnten Abbildung 33 B sind die prozentualen Änderungen der Luciferase-Aktivitäten immer auf die Aktivität von Kontrollansätzen bezogen, bei denen kein HML-2-SU-h-Fc vorhanden war. Diese werden in der Abbildung als „ ϕ Protein“ bezeichnet. Zur Bestätigung der Ergebnisse des Kompetitionsassays wurde das Experiment mit nicht aufgereinigtem und nicht aufkonzentrierten Überstand von HML-2-SU-h-Fc produzierenden Zellen wiederholt. Dabei wurde mit dem jeweiligen Zellkulturüberstand eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 B dargestellt. Mit jeder Verdünnung des proteinhaltigen Überstands erkennt man eine stetige Zunahme der relativen Luciferase-Aktivität (als blaue Striche dargestellt). Zellen, die mit Überständen mit dem höchsten Verdünnungsfaktor von 32 behandelt wurden, zeigten dementsprechend die höchsten Luciferase-Aktivitätswerte von der gesamten Verdünnungsreihe. Diese blieben jedoch unterhalb der Luciferase-Aktivität der Proben ohne Zugabe von HML-2-SU-h-Fc („kein Überstand“). Proben, die mit VSV-G-HIV-VLP unter vergleichbaren Bedingungen inkubiert wurden (als grüne Striche dargestellt), zeigten eine andere Tendenz. Hierbei, und ähnlich wie die VSV-G-HIV-VLP- Behandelten Proben der Untersuchungen mit aufgereinigtem HML-2-SU-h-Fc (Abb 33A), wurde keine Veränderung in den Luciferase-Aktivitäten bei der

Ergebnisse

gesamten Verdünnungsreihe beobachtet werden. Dabei unterschieden sich die ermittelten Werte der Proben mit einer Co-Inkubation mit HML-2-SU-h-Fc (Verdünnungsfaktoren von „1“ bis „32“) von denen ohne das Chimärprotein (in der Abbildung 33B als „ \emptyset Protein“ bezeichnet) nicht.

Darüberhinaus lieferte eine Inkubation mit der $\Delta 144-152$ -Version des Fusionsproteins, wie es der Abbildung 34 entnommen werden kann, erhöhte Luciferase-Werte im Vergleich zu dem HML-SU-Fc-Wildtyp.

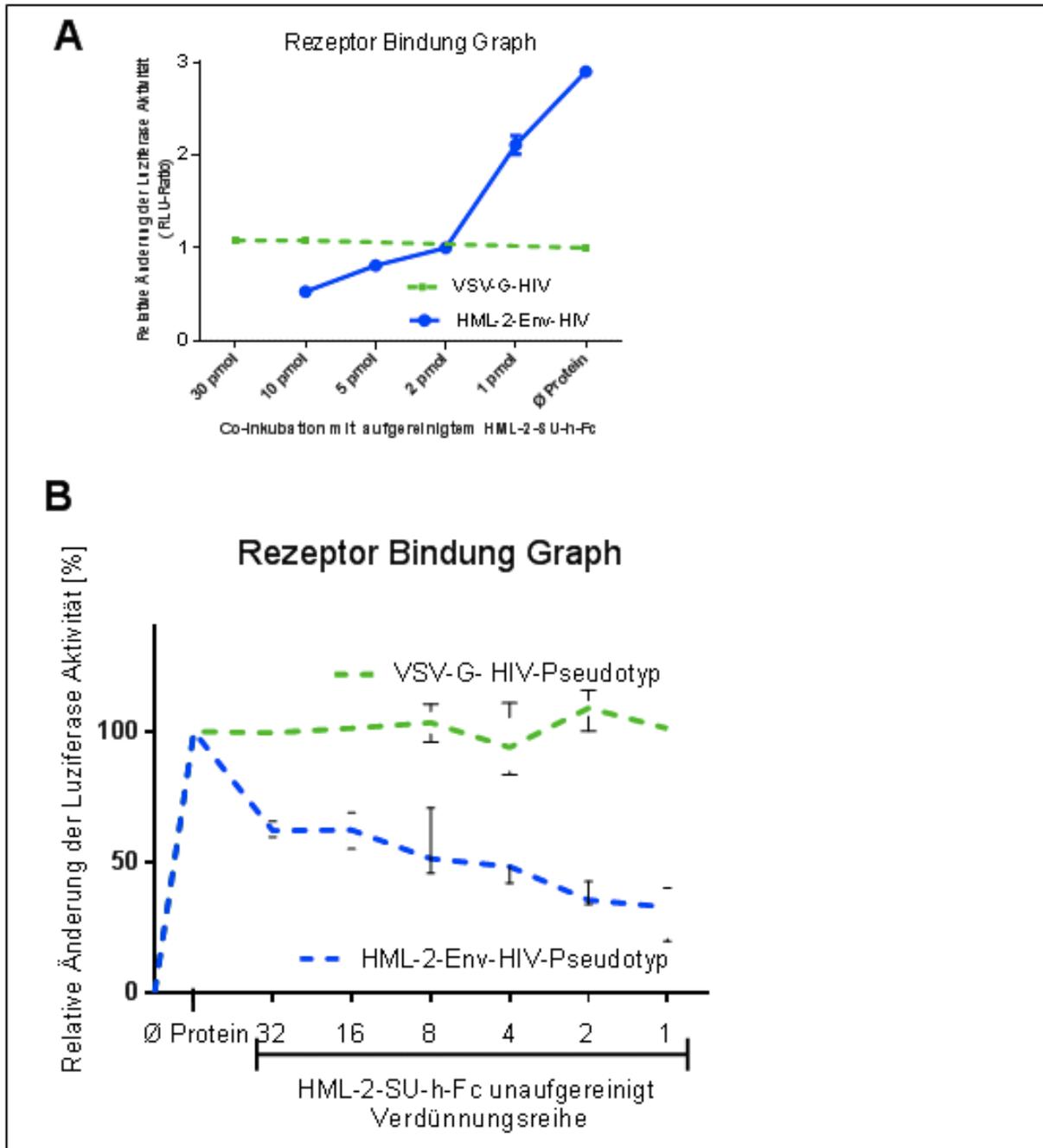


Abbildung 33: Konkurrenz zwischen HML-2-SU-h-Fc und HML-2-Env-Pseudotypen.

Ergebnisse

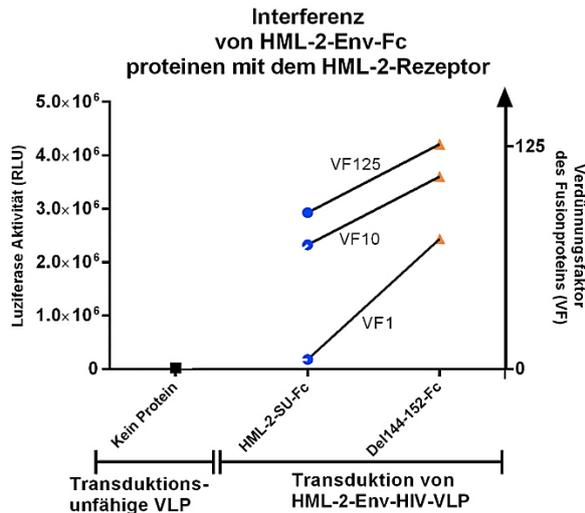


Abbildung 34: Interferenz von Chimärproteinen HML-2-SU-Fc und Δ 144-152-Fc mit HML-2-Env-HIV-VLPS

Diese Beobachtungen zeigen eindeutig, dass die gemessenen Luciferase-Aktivitäten mit der Anwesenheit von transduktionsfähigen VLPs korrelieren. Die negative Korrelation zwischen Konzentration an co-inkubiertem HML-2-SU-h-Fc und Transduktionsrate der HML-2-Env-HIV Pseudotypen belegt außerdem, dass es zu einer spezifischen Konkurrenz zwischen den Pseudotypen und dem HML-2-Fc-Chimärprotein um den HML-2-Rezeptor auf die CrFK-Zellen kommt.

Die Reduktion der Transduktionseffizienz von HML-2-Env-HIV-VLP in Anwesenheit des HML-2-SU-Fc und die Dosisabhängigkeit dieses Effekts und insbesondere die Tatsache, dass VSV-G-pseudotypisierte Reporterviren durch das HML-2-SU-Fc nicht gehemmt werden, geben einen starken Hinweis auf die Spezifität der Wechselwirkung zwischen HML-2-SU-Fc und den Zelloberflächenfaktoren, die für den Eintritt des Virus HML-2 ausschlaggebend sind.

Diese vorhandene Interaktion deutet auf eine spezifische Erkennung des Rezeptors für HML-2 durch HML-2-SU-h-Fc hin.

8.5.3. Pulldown von HML-2-SU-h-Fc-reaktiven Plasmamembran-Proteinen

1. Pre-Screening von Zelllysaten auf HML-2-SU-h-Fc-reaktive Proteine

Untersuchungen, die in den vorstehenden Abschnitten 8.5.1 und 8.5.2 vorgestellt wurden, gaben den starken Hinweis, dass HML-2-SU-Fc mit dem Rezeptor für das HML-2-Virus interagiert. Um diesen Sachverhalt zu untermauern und als Proof-of-

Ergebnisse

Principle des Vorhabens einer Extraktion des Rezeptors mithilfe von HML-2-h-Fc, wie bereits im Punkt 8.5.1 dargestellt, wurde die Bindung an Proteine analysiert, die aus einer HML-2- permissiven Zelllinie extrahiert wurden.

Zu diesem Zweck wurden CrFK-Zellen lysiert und das Zelllysate auf einer Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Die Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde zuvor mittels BCA-Verfahren bestimmt. Es wurde 0,1 μ g und 1 μ g Gesamtprotein aufgetragen und eine einstündige Inkubation erlaubte die Adsorption der Proteine auf die Membran. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem reinen HML-2-h-Fc-Präparat. Als Kontrolle, wurde die Membran ohne HML-2-h-Fc inkubiert. Zur Erfassung einer Reaktivität der zellulären Proteine aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen wurden einerseits Hep2-Zelllysate als Negativkontrolle verwendet, denn Hep-2-Zellen ließen sich nachweislich nicht mit HML-2-Env-HIV-VLP transduzieren (s. Abbildung 12), so dass die Vermutung nahe gelegt werden kann, dass sie keine oder nur sehr wenig Oberflächenproteine exprimieren, die mit dem HML-2-h-Fc spezifisch interagieren und als HML-2-Rezeptor dienen. Andererseits wurden CrFK-Zellen mit einem für die Untersuchung irrelevanten Protein transfiziert und die Zelllysate gleichermaßen behandelt. Dieser letzte Ansatz diente der Erfassung von einem eventuellen Falsch-Positivsignal aufgrund einer eventuell veränderten Zellphysiologie, welche z.B. durch Stressfaktor hervorgerufen werden kann. Die Überexpression von dem irrelevanten Protein sollte hierbei eine Stresssituation darstellen.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Die Ponceau-Färbung, die zur allgemeinen Markierung aller Proteine des Präparats durchgeführt wurde, zeigt, dass Proteine tatsächlich auf die Nitrozellulose-Membran adhärerten. Hierbei erkennt man eine Verstärkung des Signals, diese korreliert mit der Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration von 0,1 auf 1 μ g. Die Immunfärbung erfolgte mit anti-h-IgG. Dabei zeigt das fehlende Signal bei allen Proben, die nicht mit HML-2-h-Fc behandelt wurden, dass HML-2-SU-h-Fc der entscheidende Faktor für das Vorhandensein eines Signals ist. Es ist anzunehmen, dass HML-2-SU-Fc mit zellulären Proteinen, die auf der Membran immobilisiert sind, komplexiert und dass der Komplex durch das anti-h-IgG spezifisch erkannt wird, wodurch letztendlich ein Signal entsteht. Dahingegen sind bei einer Inkubation mit HML-2-SU-h-Fc und bei 1 μ g-Gesamtprotein im Zelllysate, starke Positivsignale bei Zelllysaten aus CrFK, nicht

Ergebnisse

aber aus Hep2-Zellen, zu sehen. Eine Überexpression von einem irrelevanten Protein führte zu keiner Verstärkung des Signals, dies und die anderen so eben erwähnten Beobachtungen weisen darauf hin, dass das Signal alleine durch die spezifische Wechselwirkung der Proteine mit HML-2-h-Fc zustande kommt. Es scheint also möglich, bestimmte zelluläre Proteine mithilfe von HML-2-h-Fc zu extrahieren, denn sie können hochwahrscheinlich auch in gelöster Form mit HML-2-SU-h-Fc spezifisch wechselwirken. Man kann sich vorstellen, dass diese Proteine, wenn sie in der Zellmembran als integrale oder periphere Proteine lokalisiert sind, als Rezeptor oder Co-Rezeptor für HML-2-Env-HIV-VLP fungieren.

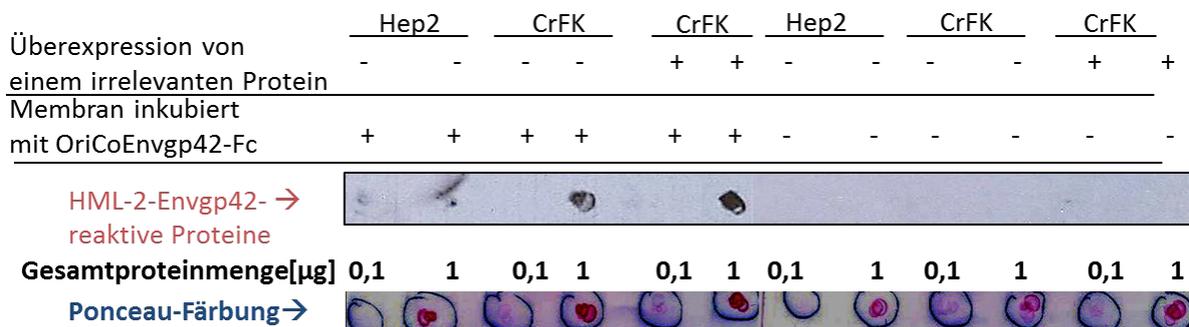


Abbildung 35: Dot-Blot von Zelllysaten zum Nachweis HML-2-Envgp42-reaktiver Proteine.

2. Extraktion aus CrFK-Zellen von Zellmembranproteinen, die für HML-2-SU-h-Fc reaktiv sind.

In der folgenden Untersuchung wurden Oberflächenproteine markiert und aus der Plasmamembran von CrFK-Zellen mittels Pulldown-Verfahren extrahiert. Hintergrund dieser Untersuchung war die Überprüfung, ob Plasmamembranproteine selektiv und aufgrund Ihrer Wechselwirkung mit HML-2-SU-Fc nachgewiesen werden konnten. Das im Rahmen dieser Untersuchung angewendete Pulldown-Verfahren basiert auf der Affinität von bestimmten Zelloberflächenkomponenten zum Chimärprotein HML-2-SU-h-Fc, so dass, über die affine Bindung des entstandenen Komplexes zu Protein G, eine selektive Anreicherung möglich gemacht wurde. Letzteres ist auf eine Matrix immobilisiert. Eine anschließende Aufreinigung des Eluats mittels immobilisiertem Streptavidin sollte die Extraktion derjenigen Proteinfraction erzielen, die aus Glykan-Proteinen bestand, denn lediglich sie waren mithilfe eines Membran-undurchlässigen Reagens zuvor biotinyliert. Hierbei wurde zur spezifischen Markierung der Oberflächenproteine u.a. Aminoxy-biotin, ein Membran-undurchlässiges Reagenz,

Ergebnisse

welches mit Glykanen der Zelloberflächenmembran eine kovalente Bindung eingeht, verwendet.

Diese Proteinfraction beinhaltet Proteine, die mit hoher Wahrscheinlichkeit im Eintrittsvorgang von HML-2 involviert sind.

CrFK-Zellen wurden zu diesem Zweck durch vorsichtiges Schaben in Suspension gebracht und für 2 Stunden bei 4°C mit dem HML-2-SU-h-Fc- Präparat inkubiert. Die weiteren Vorgänge wurden nach einem im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifizierten Protokoll von Zeng et al [64] ausgeführt, wobei BS3 als Crosslinker nach Hersteller's Angaben (Thermofisher Scientific) angesetzt wurde. Letzterer reagiert mit Primäraminen und wird u.a. angewendet, um schwache bzw. transiente Proteinwechselwirkungen zu fixieren. Weitere Schritte sind im Abschnitt "Material und Methoden; Punkt 7.2.8.1" näher beschrieben.

Zum Nachweis isolierter Proteine wurde ein Dot-Blot durchgeführt, dessen Ergebnis in der nachstehenden Abbildung 36 A abgebildet ist. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Affinität der biotinylierten Plasmamembran-Glykoproteine zum Fluorophor-gekoppelten IRDye Streptavidin CW800. Eindeutig zu erkennen ist, dass ein starkes Signal im Eluat des Ansatzes mit zugesetztem HML-2-SU-h-Fc nach der zweifachen Aufreinigung (Protein G- und Streptavidin-Aufreinigung), vorhanden ist, wohingegen ohne Zusatz vom Chimärprotein nur ein sehr schwaches Hintergrundsignal im Eluat erkennbar ist. Die Proteinfraction nach der zweifachen Aufreinigung mittels Streptavidin-Affinität stellen hierbei Oberflächenproteine dar, mit denen HML-2-SU-Fc eine Bindung eingehen konnte. Der Output nach der ersten Aufreinigung mit Protein G stellt Glykoproteine dar, die keine Wechselwirkung mit HML-2-SU-h-Fc eingegangen sind und deshalb durch das immobilisierte Protein G nicht zurückgehalten werden konnten.

Aus dieser Untersuchungsreihe ist ersichtlich, dass HML-2-SU-h-Fc mit Glykoproteinen der Zelloberflächen von CrFK-Zellen interagieren kann und dass die wechselwirkenden Proteine mittels Affinitätschromatographie angereichert werden können.

Diese Annahme konnte nach einer weiteren Pulldown-Prozedur gemäß einem anderen Protokoll überprüft werden. Das Protokoll ist im Punkt 7.2.8.2 näher beschrieben. Bei diesem Versuch erfolgte der Proteinnachweis immunologisch über den Fluorophor-gekoppelten A-h-IgG 680, nachdem die biotinylierten

Ergebnisse

Plasmamembran-Glykoproteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen wurden und die Membran mit HML-2-SU-h-Fc inkubiert wurde. Die Proteinbanden sind der nachstehenden Western blot-Bildaufnahme zu entnehmen. Die Spur 8 der so eben erwähnten Abbildung 36 B stellt das Eluat nach der doppelten Aufreinigung über die Protein G- sowie Streptavidin-Affinität dar. Die Proteine dieser Fraktion, die mit dem Chimären HML-2-SU-h-Fc wechselwirkten, sind in der Spur D der selben Abbildung als Banden zu erkennen. Man erkennt dabei tatsächlich eine viel höhere Anzahl an Proteinbanden in der Silberfärbung der Proteinfraction (Spur 8), als nach der immunologischen Detektion der selben Fraktion mittels A-h-IgG 680 (Spur D). In der Spur D sind nämlich lediglich weniger als zehn Proteinbanden zu erkennen. Fünf davon befinden sich in molekularem Größenbereich oberhalb von 100 kDa und könnten somit sicherlich interessante Proteinkandidaten für weiterführende Untersuchungen sein. Die nebenstehende Spur E stellt die Proteinfraction dar, die nicht biotinyliert wurde, und somit für die Untersuchung irrelevant ist, denn es handelt sich höchstwahrscheinlich um Proteine, die nicht auf der Zelloberfläche lokalisiert waren, oder um Plasmamembranproteine, die jedoch keine Glykoproteine sind. Man erkennt in dieser Spur eindeutig viel mehr Proteine als in der Spur D. Solche Proteine, die in letzterer Spur nachgewiesen wurden, könnten sicherlich isoliert und proteinanalytisch weiteruntersucht werden. Diese Arbeiten sollen in nachfolgenden Projekten stattfinden.

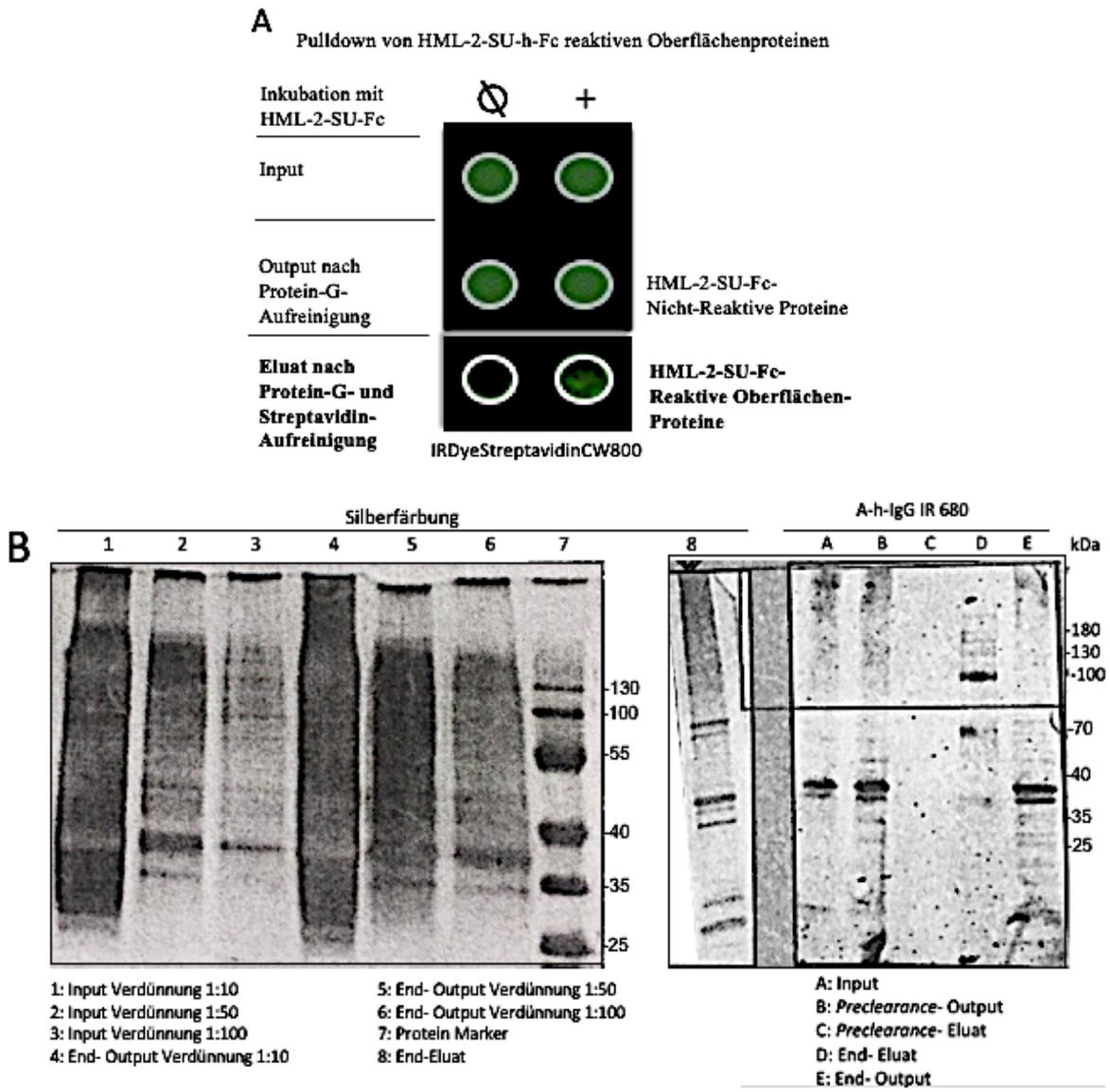


Abbildung 36: Pulldown von Oberflächen-Glykoproteinen, die mit HML-2-SU-h-Fc reagieren.

9. Diskussion

9.1. Permissivität von ausgewählten Zelllinien für HIV-VLP mit eingebautem HML-2- Env

Unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten optimalen Virusproduktionsbedingungen wurden nun HIV-basierte Viren angezüchtet und in unterschiedlichen Studien eingesetzt. Die ermittelten optimalen Parameter erlaubten eine effektive Produktion von HIV-VLPs in relativ kurzer Zeit unter standardisierten Bedingungen, die VLPs erwiesen sich in allen Transduktionsversuchen als hoch effizient.

Die Untersuchung zur Permissivität für die hergestellten HIV-Viren zeigte, dass die Zelllinien Cf2Th und CrfK aber nicht Hep2 für die hergestellten HIV-Pseudopartikel mit eingebauten HML-2-Envelop-Proteinen gut permissiv sind. Die Vermutung liegt dabei sehr nah, dass es sich hierbei um eine durch das HML-2-Env spezifisch vermittelte Interaktion handelt, denn man erkennt einerseits bei den Zelllinien CrfK und Cf2Th, nicht aber bei Hep2, eine eindeutige dosisabhängige Wirkung, diese ist der Ausdruck eines spezifischen Effekts. Andererseits zeigten die gleichen Zelllinien bei der Behandlung mit HIV-VLP, die nun mit dem VSV-G, das Glyco-Envelop-Protein vom Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), pseudotypiert wurden, eine andere Antwort als nach der Behandlung mit HML-2-Env-Pseudotypen. VSV ist wegen seines sehr breiten Wirtsspektrums gut bekannt und wird deshalb sehr oft als Positivkontrolle in Transduktionsversuchen angesetzt. Neuste Untersuchungen demonstrierten die zentrale Rolle des zellulären LDL⁹-Rezeptors bei der Erkennung der Zielzellen und Einleitung des zellulären Eintrittsereignisses dieses Virus [65][66][67].

Der Eintritt des Virus alleine ist nicht ausreichend, um eine Infektion herbeizuführen. Nach dem Eintritt, muss das Virus in den Nukleus gelangen. Im Gegensatz zu den meisten Retroviren, die nur mitotisch aktive Zellen infizieren können, denn die Kernhülle ist eine undurchlässige und unüberwindbare Barriere, sind einige Viren, wie z.B. die Lentiviren oder Adenoviren, in der Lage, aktiv ihr genetisches Material

⁹ LDL: Low-density lipoprotein

durch die Kernporen einzuschleusen und somit sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen zu infizieren. Antivirale Strategien nutzen deshalb, neben Inhibitoren des viralen cytoplasmatischen Pathways, ebenfalls Inhibitoren der nuclearen Lokalisation.

Trotz vergleichbaren experimentellen Bedingungen zeigten Cf2Th, CrFK und Hep2 dennoch verschiedene Empfindlichkeiten für VSV-G- und HML-2-Env-HIV-VLP. Erstere Zelllinie erwies sich nach einer Behandlung mit VSV-G-HIV-LP als am stärksten permissiv, im Gegensatz zur letzteren, die sich am geringsten permissiv zeigte. Nach der Behandlung mit HML-2-Env-HIV-VLP zeigten sich nun nicht mehr die Cf2Th-Zelllinie, sondern die CrFK, als am stärksten permissiv für die VLPs, während Hep2 in diesem Fall bei allen eingesetzten Virusverdünnungen untransduziert blieben. Alle in dieser Untersuchung angesetzten HIV-VLP unterschieden sich lediglich in ihren Env-Proteinen. Die differenzierte Antwort der untersuchten Zelllinien kann daher nicht durch den intrazellulären antiviralen Abwehrmechanismus, sondern die Verwendung von unterschiedlichen Rezeptoren für den Eintritt beider HIV-VLPs erklärt werden. Es ist anzunehmen, dass eine größere Anzahl von zellulären Erkennungsproteinen für VSV-G, LDL-R, auf der Oberfläche präsentiert wurde, als für HML-2-Env, und erlaubte somit eine deutlich höhere Rate von Zelleintrittsereignissen von VSV-G- HIV-VLP. Vermutlich exprimiert die Zelllinie Cf2Th deutlich mehr LDL-R- als CrFK. Dass die HML-2-Env- HIV-VLP eine bessere Transduktion in CrFK als in Cf2Th erzielte, liegt vermutlich daran, dass erstere Zelllinie eine höhere Oberflächenexpression von dem Rezeptor für dieses Env-Protein als die Cf2Th aufweist. Diese Annahme könnte in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

9.2. Betrachtung der postulierten interagierenden RBD von HML-2-Env und seiner phylogenetischen Verwandten

Eine Infektion mit einem umhüllten Virus setzt die Interaktion zweier Proteine voraus, dem viralen Envelope und zellulären Oberflächenprotein. Proteine interagieren über ihre funktionellen Untereinheiten, deren Aktiven Zentren, Domänen, und Motiven (auch Signaturen genannt) die Interface darstellen, wodurch Interaktionen ermöglicht werden [68]. Dabei bestimmen die chemischen Eigenschaften der Seitenketten der Aminosäuren in einer Untereinheit (auch als Subdomäne bezeichnet) die geometrischen Strukturen, die die bindenden Interface darstellen.

Im Fall vom *Middle East respiratory syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), ein Vertreter von viralen Membranfusionsproteinen der Klasse I, besteht innerhalb der RBD diese Rezeptor-Erkennende Struktur aus vier antiparallelen β -Strängen ($\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ and $\beta 8$), wobei 14 Reste, über hydrophile und hydrophoben Wechselwirkungen, Ionenbindungen, Wasserstoffbrücken, mit 15 passenden Resten des Rezeptors in Wechselwirkungen treten [69].

Die Wahl eines zellulären Oberflächenproteins als Virusreceptor unterliegt nicht dem Zufall, sondern ist durch strukturelle und evolutionäre Faktoren bestimmt. Ein positiver Selektionsdruck resultiert meistens in einer relativ hochgradigen Sequenzkonservierung innerhalb phylogenetisch verwandten Viren, die Aminosäuren der RBD sind in diesem Fall in der Regel stark konserviert und ergeben aufgrund dessen einen konservierten Muster von Rezeptorbindenden Subdomänen. Die SU-Domänen von ENTV und JSRV beispielsweise weisen eine 94%ige Übereinstimmung der Primärstruktur auf [70], erwartungsgemäß nutzen auch beide β -Retroviren Hyaluronidase-2 als gemeinsamer Rezeptor.

Ein negativer Selektionsdruck, z.B. durch das Immunsystem des Wirts, erzwingt dagegen die Evolution der betroffenen Subdomäne und resultiert in einer Diversifizierung der Primärstruktur und damit den bindenden Interfacen, was wiederum zu der Nutzung von einem abweichenden Rezeptor führen kann. JSRV und MMTV weisen einen ca. 30%igen Konservierungsgrad der Aminosäuren innerhalb der RBD¹⁰, man beobachtet demzufolge, dass letzteres Virus Transferrin-Receptor-Protein, aber nicht Hyaluronidase-2, als Receptor verwendet. MMTV ist z.Z. das einzige Virus seiner Gattung, das keinen gemeinsamen Rezeptor mit einem anderen teilt.

Die Aminosäuren L⁹⁰ bis T⁶³² bilden die Ectodomäne von eingebauten HERV-K-HML-2-Env. Vor der Endogenisierung des Virus war der Bereich, der sich auf der oberen Spitze des durch die Trimerisierung gebildeten *Spike*-Struktur befindet, der dem Immunsystem am stärksten exponiert war. Folglich wäre anzunehmen, aufgrund von adaptiven Veränderungen um dem Immunsystem zu entkommen, dass dieser Bereich große Sequenzvariationen mit verwandten Viren beinhaltet. Tatsächlich findet man in diesem Bereich, wie es dem untenstehenden Sequenzvergleich der

Abbildung 18 entnommen werden kann, eine ca. 25%¹⁰ Sequenzhomologie zwischen HERV-K-HML-2 und MMTV und ca. 25%¹⁰ zwischen HERV-K-HML-2 und JSRV. Dies bedeutet, dass zwischen den Viren, für 100 Aminosäuren der Ectodöman, 75 divergieren. Aufgrund dieser Sequenzdivergenz wäre es begründet zu erwarten, dass HERV-K-HML-2 eine andere Rezeptorverwendung aufweist als die seiner phylogenetisch Verwandten. Man kann annehmen, dass das humane endogenisierte Virus weder das Transferrin-Receptor-Protein noch Hyaluronidase -2 als Rezeptor nutzte.

Darüber hinaus spielt nicht nur die Abfolge der Aminosäuren, sondern auch die Natur der Aminosäuren-Seitenketten eine wesentliche Rolle in der Funktion und der Wahl der Reaktionspartner eines Proteins. Die Beschaffenheit der Seitenketten bestimmt die physikalischen und chemischen Eigenschaften einer funktionellen unabhängigen Einheit, denn diese Eigenschaften sind für die Bildung der sekundären und/ oder tertiären Struktur des Moleküls entscheidend. Konvergierende Eigenschaften lassen einen ähnlichen strukturellen Aufbau, und damit eine gemeinsame Protein-Signatur von phylogenetisch verwandten Proteinen annehmen, während mit divergierenden chemischen Eigenschaften Unterschiede in der sekundären und/ oder tertiären Struktur vorhergesagt werden können. Da Proteine mit sehr ähnlichen Strukturen eine größere Wahrscheinlichkeit haben, sich einen gleichen Interaktionspartner zu teilen, kann man, wenn dies für zwei virale Proteine nicht zutrifft, eine gleiche Rezeptor-Spezifität ausschließen.

Trotz dem oben erwähnten Divergenzgrad in der Abfolge der Aminosäuren zwischen den drei β -Retroviren, erkennt man, wenn man sich näher die Rezeptor-bindenden Domänen von MMTV und HML-2 anschaut und sie in Vergleich zueinander setzt, dass es Teilbereiche gibt, wo eine relativ hohe Übereinstimmung in der chemischen Natur der Aminosäuren herrscht, und andere Teilbereiche, wo divergierende chemische Eigenschaften stärker ausgeprägt sind. Beispielsweise erkennt man im Teilbereich von HML-2, von A¹⁰⁵ bis I¹⁶³, dass von den 53 Aminosäuren dieses Bereiches, 32, also 54%, eine chemische Ähnlichkeit aufweisen mit dem korrespondierenden MMTV-Bereich. Der in diesem Bereich erhöhte

¹⁰ Wert ermittelt mit dem Web-Tool „*Protein multiple sequence alignments von Clustal Omega*“ vom *European Bioinformatics Institute (EBI)*

Konservierungsgrad der chemischen Eigenschaft der Aminosäuren zwischen den beiden phylogenetischen Verwandten veranschaulicht einerseits, dass beide virale Proteine einen gemeinsamen Ursprung haben, andererseits weist er auf einen Selektionsdruck hin, was zur Konservierung der Natur der Aminosäuren in diesem Bereich führte. Es ist anzunehmen, dass beide β -Retroviralen Env-Proteine in diesem Bereich strukturell ähnlich sind, und dass diese Struktur in der evolutionären Geschichte eine vorteilhafte Auswirkung auf die Weitergabe der Viren gewährleistete. Auch die umhüllten Viren SARV- und MERV-CoV, beide sind Vertreter der Familie der Coronaviren, weisen einen hochgradigen strukturellen Konservierungsgrad ihrer RBD auf [69]. Bekanntlich werden strukturelle Eigenschaften, die die Ausbreitung eines Virus sichern, z.B. indem sie eine stabile Rezeptor-Bindung ermöglichen, evolutionär konserviert [71].

Die oben erwähnten Coronaviren erkennen trotz hochgradigen strukturellen Ähnlichkeiten unterschiedliche Rezeptoren, denn es existiert bei ihnen innerhalb der RBD eine kleine Region mit einer ausgeprägten Diversifizierung der Aminosäuren. Diese Region fungiert als Rezeptor-bindende Subdomäne [69]. Wie bei den so eben erwähnten Coronaviren findet man bei HML-2 und MMTV (siehe Abbildung 18) mitten in einem Bereich, mit sehr hoher chemischer Aminosäuren-Ähnlichkeit, ebenfalls Gruppierungen von Aminosäuren, wo keine Übereinstimmung in der chemischen Natur zwischen den Verwandten herrscht. Man findet in der Tat zwischen beide β -Retroviren eine starke Veränderung der chemischen Natur der Aminosäuren ab D¹³⁹ bis P¹⁶² von HML-2 Env (D¹³⁹/F¹³⁸, D für HML-2 an der Position 139 und F für MMTV an der Position 138; P¹⁶¹/L¹⁵⁷, gleiche Bezeichnung), (Für HML-2: D¹³⁹ RCPAKPEEEGMMINISIGYRYPP¹⁶²). Aufgrund dessen könnte man erwarten, dass die Wechselwirkungen, die durch die chemische Natur der Aminosäuren dieser Region zustandekommen, sich in ihrer Natur, Anzahl und Stärke zwischen beiden Viren erheblich unterscheiden und somit in individuelle Protein-Signaturen resultieren. Tabelle 4 fasst für die RBS von MMTV und die korrespondierende HML-2 Region diese Unterschiede zusammen. Beispielsweise wäre eine Disulfidbrücke bei HML-2, aber nicht bei MMTV möglich, desweiteren wären polare Wechselwirkungen stärker ausgeprägt bei ersterem Virus als bei MMTV. Auch stärkere hydrophobe Wechselwirkungen bei MMTV als bei HML-2 sind zu erwarten.

Interessanterweise liegt die Rezeptorbindende Sequenz (RBS) von MMTV, FHGF, innerhalb des soeben genannten Bereiches. Solche Unterschiede, und die dadurch hervorgerufenen individuellen Protein-Signaturen sind ausschlaggebend für die Bestimmung der Interaktionen, in denen das jeweilige Protein involviert ist, sowie der Interaktionspartner. Es ist daher begründet zu erwarten, dass wie SARS-CoV und MERS-CoV, MMTV und HML-2 unterschiedliche Wirtsrezeptoren erkennen.

Env-Protein	Anzahl der möglichen Wechselwirkungen			
	RBD- bzw. vergleichbare Sequenz	Disulfidbrücken	Van-der-Waals	polare Wechselwirkungen
HERV-K-HML-2	D ¹³⁸ D ¹³⁹ R ¹⁴⁰ C ¹⁴¹ P ¹⁴² A ¹⁴³	1	2	4
MMTV	D ¹³⁷ F ¹³⁸ H ¹³⁹ G ¹⁴⁰ F ¹⁴¹ R ¹⁴²	0	3, davon 2 besonders stark ¹¹	3

Tabelle 4: Natur der Aminosäuren der RBD und Umgebung von HERV-K-HML-2, Vergleich mit dem phylogenetisch Verwandten MMTV.

Wenn eine Receptor-Erkennungssubdomäne Neutralisation-Epitope enthält und somit dem Wirtsimmunsystem ausgesetzt ist, kommt es bekanntlich, um das Wirtsimmunsystem zu entkommen, zu natürlichen Mutationen innerhalb dieser Domäne [42][71]. Vermutlich ist dies die treibende Kraft, die zur Diversifizierung der Aminosäuresequenz vom HML-2 im Vergleich zu MMTV führte. Es wäre sicherlich interessant, um diese Hypothese zu überprüfen, experimentell zu bestimmen, welche Regionen vom HML-2-Env-Protein von Antikörper- Paratopen erkannt werden. Auch die Suche nach Rezeptoren höherer Bindungsaffinität, um die Weitergabe des Virus zu vereinfachen oder um das Wirtsspektrum zu erweitern, kann der Motor für

¹¹ davon zwei besonders stark aufgrund der aromatischen Gruppe Phenylalanin (F).

die Diversifizierung der RBS von Viren einer Familie sein [71]. Dies resultiert letztendlich in die Verwendung eines alternativen Rezeptors.

9.3. Alle erzeugten RBD-Env- Mutanten sind nicht funktionell

9.3.1. MMTV-Env-HIV-VLPs infizieren mTrfR1-exprimierende Zellen

Die Ergebnisse zu den Mutanten K-Cip- und K-N-MMTV veranschaulichen den Sachverhalt, dass im Kontext von β -Retroviren, zwei Ereignisse, und zwar die Erkennung des zellulären Rezeptors und die Fusion von viraler Membran mit der Wirtzellenmembran, für den komplexen Vorgang des Viruseintritts in die Wirtszelle unentbehrlich sind. Die Studie machte fest, dass mit einer Expression von mTrfR1 und einer funktionsfähigen MMTV-Envelope die HIV-Pseudotypen in der Lage waren, das virale Reportergen in die Zielzellen zu liefern. Zahlreiche Studien mit anderen Virus-Like-Partikeln berichteten bereits davon, unsere Ergebnisse veranschaulichen diesen Befund anhand unseren hergestellten MMTV-Env-HIV-Pseudotypen.

Die Fusogenität von MMTV-TM wird erst in einem sauren Milieu aktiviert, wobei ein niedrigerer pH-Wert als 5 die Konformationsänderung des Proteins auslöst. Als Eintrittshelfer eignet sich deshalb mTrfR1 durch seine zelluläre Funktion hervorragend, denn dieser oberflächenexprimierte Rezeptor vermittelt im Zuge einer Ligandbindung die Internalisierung in spezielle Endosomen. Aufgrund der Aktivität der in der endosomalen und lysosomalen Membran verankerten ATP-Abhängigen Protonenpumpen, herrschen in den Endosomen pH-Werte von 4,5 bis 6,5, sodass nach der Endocytose die Virus-Zellfusion unter optimalen Bedingungen erfolgt. Auch hTrfR1 erfüllt in Menschen eine ähnliche Carrier-Funktion wie seine Mouse-Homologes Protein. Trotz einer hohen Sequenzhomologie von 86% erlaubt mTrfR1, aber nicht hTrfR1, den zellulären Eintritt und *trafficking* von MMTV. Letzterer Vorgang veranlasst die Freisetzung des viralen Materials in das Cytoplasma [72][73][74]. Der Grund für diesen Tropismus liegt laut einigen Aussagen in der Stärke der Expression von hTrfR1 in humanen Zellen [74]. Humane Zelllinien wie die in dieser Studie verwendeten SK-Mel-28, weil sie das exogene mTrfR1 nicht bzw. nur unzureichend exprimieren könnten, waren resistent gegenüber den MMTV-Env-HIV- Pseudotypen.

Dahingegen, wenn sowohl humane als auch feline Zellen das Protein ausreichend stark exprimierten, erwies sich in unseren Studien mTrfR1 als ein hoch effizienter Rezeptor für die Transduktion von MMTV-HIV-VLPs.

Die Transduktion von $\Delta 144-152$ -Pseudotypisierten Virus-Like-Partikeln in CrFK führte wiederholt zur Detektion von Signalen, die auf Eintrittsereignisse hindeuteten, obwohl die Env-Mutante in die viralen Partikeln nur sehr schwach eingebaut werden konnte. Es scheint als gäbe es zur Aufnahme diese VLP in die Zielzellen weitere, Nicht-Rezeptor-Abhängigen Eintrittsmöglichkeiten. Andere Studien berichteten von ähnlichen Beobachtungen, dass einige Für-Ein-Bestimmtes-Virus-Normalerweise-Nicht-Permissiven-Zellen, wenn sie mit VLPs ohne Eingebauten-Env-Protein behandelt wurden, eine positive Expression der viralen Reportergene zeigten [74].

9.3.2. Einbau in Virionen von den Env-Mutanten K-Cip- und K-N-MMTV, $\Delta 144-152$, EEE146-148AAA, N128A und N153A

Die Funktionalität des C-terminalen Bereiches von Env-Proteinen wurde für Retroviren verschiedener Genera durch Studien von vielen Arbeitsgruppen bereits etabliert. Beispielsweise haben die C-terminalen Domänen vom Gammaretrovirus MuLV, Betaretrovirus JSRV sowie Lentivirus HIV, trotz fehlender Sequenzhomologie und somit hochwahrscheinlich geringer struktureller Ähnlichkeit, eine homologe funktionelle Eigenschaft [75]. Alle drei C-terminalen Bereiche regulieren nämlich die virale Fusogenität des jeweiligen Virus durch Modulation der Konformation des TM-Ectodomäns [76] [77] [78].

Die gezielte Veränderung von HML-2-Env, vom Start bis zur Aminosäure P¹⁶¹, also von komplettem N-Terminus-Bereich (Mutante K-Env-N-MMTV) beweist die entscheidende Rolle des N-Terminus-Bereiches des Proteins im Vorgang des Einbaus des HML-2-Env-Proteins in das Virion, denn durch diese Mutation verlor das Protein die Fähigkeit, in das Virion effektiv inkorporiert zu werden. Eine Substitution des N-Terminus durch das von MMTV führte nicht zur Wiederherstellung dieser Fähigkeit. Es ist anzunehmen, dass dieser Bereich eine regulatorische Aufgabe im Transport des Proteins an die Plasmamembran, den Ort, wo das Protein vor der Inkorporation in das Virion verankert wird, erfüllt. Eine viel spezifischere Untersuchung, wodurch unterschiedliche Aminosäuren innerhalb des N-Terminus verändert wurden (durchgeführt durch die Mutanten K-envCip-MMTV, D144-152,

EEE146-148AAA sowie den N-Glycosylierungsmutanten N128 und N153), bringt ans Licht, dass die Aminosäuresequenz G¹⁴⁹M¹⁵⁰M¹⁵¹I¹⁵² mit hoher Wahrscheinlichkeit eine zentrale Rolle in diesem Vorgang spielt, denn eine Abschwächung des Einbaus von HML-2-Env in den VLPs wurde nur beobachtet, wenn infolge der Mutationen dieser Sequenzabschnitt betroffen war (s. Abbildung 19C; Abbildung 13B3; Abbildung 16A). Tabelle 5 fasst die oben genannten Mutationen und die beobachteten Effekte zusammen. Diese Sequenz beinhaltet die zwei hydrophoben Aminosäuren, G¹⁴⁹ und I¹⁵², sowie zwei aufeinanderfolgenden Methionine (M¹⁵⁰M¹⁵¹). Erstere können bekanntlich Van-Der-Waals-Wechselwirkungen mit lipophilen benachbarten Molekülen eingehen, letztere haben das Potential stabilisierende Wasserstoffbrücken zu bilden. Diese Kombination aus dem hydrophoben Charakter von den Zweien und der polaren Wasserstoffbrückenbildende Fähigkeit von den anderen Aminosäuren und den oben genannten experimentellen Beobachtungen lassen vermuten, dass wahrscheinlich dieser Sequenzabschnitt mit amphipatischen Interfacen, wie z.B. Kopfgruppen von zellulären Lipiddoppelschichtigen Membranen, interagieren könnte. Die Anwesenheit von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten in der unmittelbaren Nähe dieses Sequenzabschnittes bekräftigt diese Hypothese, denn es ist bekannt, dass sie sich in Oberflächenproteinen präferentiell zu den Carbonylgruppen von Membranlipiden richten [79][80][81][82]. Diese könnten daher eine stabilisierende Rolle bei den so eben genannten hydrophoben Interaktionen innerhalb des Sequenzabschnitts übernehmen.

Bekanntlich erfordert das *Targeting* eines Proteins in den richtigen Subkompartimenten spezifische Sequenzen oder Topologien [83], wie z.B. α -helikalen oder β -Faltblatt-Strukturen. Diese treten in Wechselwirkungen mit den involvierten Proteintranslokationssystemen und den damit verbundenden Rezeptoren- Systemen, die in den Ziel-Subkompartimenten eingebettet sind. Weil ungefaltete Proteine aus thermodynamischen Gründen die polaren Köpfe von Zu-Durchdringenden Membranen nicht überqueren können, erweist sich eine Faltung zu α -helikalen oder β -Faltblatt-Strukturen daher günstig, um das Protein durch ein subzelluläres Kompartiment zu transportieren oder darin einzubetten [84][85]. Sequenzen, wie diese so eben genannte G¹⁴⁹ M¹⁵⁰M¹⁵¹ I¹⁵², können durch Beeinflussung der zwei sowie dreidimensionalen Struktur des zu transportierenden Proteins die effiziente Translokation modulieren und somit eine entscheidende

regulatorische Rolle beim korrekten *Targeting* des Proteins spielen. Vorstellbar ist, dass die vier Aminosäuren eine Mikrodomäne bilden, wobei die individuellen Aminosäuren Kontakten mit den Bestandteilen der Membranlipiden vom Ziel-Subzellulären Kompartiment vermitteln und so den Export des Proteins bis auf die Plasmamembran einsteuern. In die Oberflächenmembran exportierte und eingebettete HML-2-Envs können anschließend mit dem Gag-Protein wechselwirken, und in die aussprossenden Virionen eingebaut werden.

Der N-Terminus-Bereich von HML-2-Env scheint also nicht nur einen Beitrag in die Erkennung des zellulären Rezeptors der Wirtszelle zu leisten, vielmehr kann man anhand der vorliegenden Daten den Bereich einer wichtigen Rolle im Vorgang des posttranslationalen Transports vom Protein bis in seinen Zielort, die Plasmamembran der Wirtszelle zuordnen. So eine bifunktionelle Aktivität einer Domäne ist nicht einmalig bei β -Retroviren-Env-Proteinen. Es wurde z.B. von Arbeitsgruppen berichtet, dass die C-terminale-Domäne von JSRV sowohl in der Tumorgenese von vielen Zelllinien als auch der Verstärkung der Fusogenität des Env-Proteins involviert ist. Interessanterweise spielt bei der ersteren Aufgabe ebenfalls ein Motif, das YXXM, die Schlüsselrolle [86][87][76].

Strukturelle Analysen, beispielsweise mittels Proteinkristallographie, NMR-Spektroskopie oder der Cryo-Electronenmikroskopie von markierten HML-2-Env-Mutanten, die man aus solubilisierten Subkompartimenten isolieren würde, könnten präzisere Informationen über die hiermit angenommenen Vorgänge liefern.

Abkürzung	Bezeichnung	Effekt			GMMI - Sequenz vorhanden ?
		Protein-Expression	Einbau in das Virion	Virusentry und Transgen-Expression in Wirtszelle	
OriCoHML					
-2-					
Env Δ 659-699	Nicht-Mutiertes HM-2-Env	ja	ja	ja	ja
Mutation					
Mut1	KEnv-N-MMTV	ja	schwach	nein	nein
Mut2	KEnv-cip-MMTV	ja	schwach	nein	nein
Mut3	Δ 144-152	ja	schwach	nein	nein
Mut4	EEE146-148AA	ja	ja	nein	ja
Mut5	N128A	ja	ja	nein	ja
Mut6	N153A	ja	ja	nein	ja
Mut7	D139A	nein	nein	nein	ja

Die Mutationen an den Positionen N¹²⁸, D¹³⁹, E¹⁴⁶ bis E¹⁴⁸, N¹⁵³ führten ebenfalls zum Ausfall der Funktion des Proteins als Entry-Vermittler. Ausgenommen von der Veränderung an der Position 139 (D¹³⁹), wird durch die jeweilige Mutation den Einbau des Proteins in die Virionen jedoch nicht negativ beeinflusst. Der Ausfall der Funktion des Proteins kann durch die drastische Veränderung der chemischen Natur der Aminosäuren, von hydrophilen Bausteinen zu dem hydrophoben Alanin, erklärt werden. Es ist nicht zu bezweifeln, dass dies zur Abschwächung bzw. Aufhebung von bestimmten Wechselwirkungen führte, welche Wechselwirkungen für die Ausbildung von Interaktionen mit Rezeptoren, bzw. zur Stabilisierung dieser Interaktionen, entscheidend sind. Somit kann behauptet werden, dass diese Region (D¹³⁹ RCPAKPEEEGMMIN¹⁵³) auf direkter oder indirekter Weise in den zellulären Eintritt des Virus in die Zelle beteiligt ist. Eine indirekte Beteiligung ist durchaus vorstellbar, denn die mutierten Aminosäuren könnten mit anderen Bausteinen intramolekulare Wechselwirkungen eingehen, die eine besondere Konformation des Proteins bewirken. Letztere wäre wiederum für die Bestimmung des Interaktionspartners, also des Rezeptors, notwendig. Durch das Aufheben dieser intramolekularen Wechselwirkungen, indem eine hydrophobe Aminosäure die

natürlichen Aminosäuren ersetzt, wurde die Ausbildung der notwendigen Topologie verhindert, wodurch Interaktionen mit dem Rezeptor ermöglicht werden sollten. Es konnte somit keine rezeptorbindende Domäne des Proteins entstehen. Handelt es sich jedoch um eine direkte Beteiligung dieser Region in der Erkennung des zellulären Rezeptors, indem über die Aminosäuren eine direkte Interaktion mit dem Rezeptor zustandekommt, kann angenommen werden, dass es sich hierbei um die RBS des HML-Env handelt.

Das funktionelle HML-2 Env ist ein heterodimeres Protein, was zwölf potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt. Einzelne N-Glycane eines Glykoproteins können sich in Ihren Funktionen erheblich unterscheiden. Beispielsweise können einige für die korrekte Faltung des Proteins eine entscheidende Rolle spielen, während andere die Bindung des Proteins an Adhäsionsfaktoren auf Plasmamembranen modulieren und somit die Zelladhäsion beeinflussen können [88][89][90]. Diese Studie zeigt durch *site directed -mutagenesis*-Analyse, dass die Stellen N128 und N153 nicht ausschlaggebend für eine effiziente Biogenese des Proteins, noch für seinen Einbau in das Virion sind, jedoch eine entscheidende Rolle für die funktionelle Aktivität des Proteins spielen. Eine tatsächliche Verlinkung dieser Stellen mit Polysacchariden kann mittels spektrometrischer Untersuchungen bestimmt werden. Wäre dies der Fall, stimmte die Aussage, dass die fehlenden Glycane die Freisetzung von defekten viralen Partikeln bewirken. Darüber wurde bei einigen Viren, wie z.B. dem Hepatitis C Virus (HCV), bereits berichtet. Fehlende N-Glycane können tatsächlich zur Störung der korrekten Faltung des viralen Proteins führen [91], sodass ein defektes VLP gebildet wird, das ein fehlgefaltetes Env trägt.

Auffällig ist die Mutation D139A, die die Expression dieser Env-Variante drastisch reduziert. Die stark polare Natur der Aminosäure Asparat (D) scheint hierbei für die Expression des Proteins ausschlaggebend zu sein. Der Austausch des negativ geladenen Asparat's gegen das unpolare hydrophobe Alanin bewirkte höchswahrscheinlich eine Aufhebung von bestimmten Wechselwirkungen (es könnte sich hierbei um die starken ionischen Bindungen handeln). Es ist bekannt, dass durch ionische Wechselwirkungen dreidimensionale Strukturen ausgebildet werden können, diese können eine Rolle z.B. bei der Abschirmung des Proteins gegen Proteasen spielen. Vermutlich bewirkte der Austausch von Asparat den Ausfall

einer besonderen Konformation, und machte die dadurch fehlgefaltete Mutante D139A anfällig für proteasomalen oder lysosomalen Abbau.

Aber auch ein durch die Mutation verursachter fehlerhafter Import des Proteins in subzellulären Kompartimenten, wo es schnell abgebaut wurde, ist ein Szenario, was gut vorstellbar ist. Im Allgemeinen können Mutationen die Expression eines Proteins in drei unterschiedlichen Arten beeinflussen, und zwar indem sie entweder die Biogenese, die Stabilität oder die Subzelluläre *Trafficking* negativ beeinflussen [92]. D¹³⁹ scheint eine Schlüsselrolle in der Expression von HML-2-Env zu spielen.

9.4. Rezeptorerkennung und Inhibition des Zelleintritts von HIV-Pseudoviren durch ein chimäres Protein.

Das Envelop-Protein des xenotropen Retrovirus Maus Leukämia-Viruses, XMRV, dass ursprünglich im Zuge der Etablierung der Prostatakarzinomzelllinie 22Rv1 durch ein Rekombinationsereignis von zwei endogenen retroviralen Sequenzen der Maus entstand [93], wurde im Rahmen eines Proof-of-Principles-Experiments für die vorliegende Arbeit herangezogen. XMRV, kann, im Gegensatz zu ecotropen und amphotropen MLV-Stämmen, nur in einer anderen Spezies als seine Wirtszelle, der Maus, replizieren [36][94].

Transduktionskompetente XMRV-Env-HIV-VLPs konnten erfolgreich produziert werden (siehe Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29) und ihre spezifische Bindung an den zellulären Rezeptor für XMRV wurde anhand der Inhibition der Expression des viralen Transgens beim Einsatz von NSU-h-Fc, ein SU-Fusionsprotein von XMRV, demonstriert. Somit wurde der Beweis erbracht, dass ein in Rahmen der vorliegenden Arbeit und unter den herrschenden experimentellen Bedingungen angesetztes chimäres SU-Protein erfolgreich mit HIV-VLPs, die das selbe Protein als Rezeptor nutzen, um die Bindungsstelle auf der Zelloberfläche von rezeptiven Zellen, kompetieren kann.

Die daran anschließenden Untersuchungen mit dem SU-Fusionsprotein von HML-2, HML-2-SU-h-Fc, und HML-2-Env-HIV-VLPs zeigten, dass HML-2-SU-h-Fc spezifisch mit zellulären Komponenten reagiert und mit dem Eintrittsvorgang der Pseudoviren interferiert. Letzterer Befund stellt einen starken Hinweis für die Nutzung eines gemeinsamen Oberflächenfaktors dar, wobei die Inhibition kompetitiver oder

allosterischer Natur sein könnte. Ein bekanntes Beispiel für eine kompetitive Inhibition stellen die zwei zellulären Proteine HFE und Transferrin dar, welche um die Bindung auf TrfR1 kompetieren [95][96], wobei sich die Bindungsstellen von HFE und Transferrin auf dem zellulären Rezeptor für MMTV überlappen [97]. Zur Bestätigung von mTrfR1 als zellulärer Rezeptor für MMTV nutzte die Arbeitsgruppe hierbei Immunglobuline, deren Epitope bekanntlich auf mTrfR1 lokalisiert waren und beobachteten eine inhibitorische Wirkung von letzteren auf den Zelleintritt [52]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Blockierung des Zelleintritts der VLPs könnte, so ähnlich wie die so eben erwähnten Immunglobuline, dadurch zustande gekommen sein, dass HML-2-SU-h-Fc, an einen überlappenden Bereich oder dieselbe Bindungsstelle wie die VLPs auf dem Rezeptor bindet.

Aber auch eine Bindung von HML-2-SU-h-Fc an auf der Oberfläche der HIV-VLPs verankerten Env-Protein, wie dies bei breitneutralisierenden Antikörpern der Fall ist, ist vorstellbar. Breitneutralisierende Antikörper (bNAbs) wirken dem Zelleintritt von allen HIV-Stämmen entgegen [98], indem sie entweder an die CD4- Bindungsstelle, oder die variablen Regionen (V1V2V3), oder die MPER¹², oder glycan-spezifisch auf die gp120 binden. Hierbei ist zu erwähnen, dass sich das HIV-Env durch eine extrem hohe Glycosylierungsrate auszeichnet, so dass ca. 97% seiner funktionellen Interfaces durch Glycane geschützt sind und damit das funktionelle Inner des Proteins für Antikörper unzugänglich macht [99]. Aufgrund dieser sterischen Hinderungen sowie der hohen Variabilität der V1V2V3-Regionen können lediglich ca. 2% von Immunglobulinen die virale Oberfläche durchdringen [98][100]. Daher nehmen bNAbs eine besondere Stellung in der Entwicklung von antiviralen Strategien gegen HIV. Durch ihre spezifische Bindung stabilisieren sie die geschlossene Prefusion-Konformation des Env-Trimers und verhindern somit die Aktivierung des Env-Proteins [101][102]. Fusogene Proteine der Klasse I zeichnen sich durch einen gemeinsamen Mechanismus und eine ähnliche Topologie, daher ist es durchaus möglich, dass HML-2-SU-Fc auf eine ähnliche Weise, durch seine Bindung am HML-2-Env, der konformationellen Dynamik dieses betaretroviralen Env entgegenwirkt, indem das HML-2 Env-Fc den Übergang von letzterem in eine

¹² Membrane-proximal external region

aktivierte fusionskompetente Konformation blockiert. Sollte die Bindung am zellulären Rezeptor von spezifischen vorhandenen Konformationen des viralen Oberflächenproteins abhängig sein, und dies wäre zu erwarten, würde das so eben erwähnte und durch das Chimärprotein hervorgerufene Ausscharren von HML-2-Env in einem bestimmten zwei- oder dreidimensionalen strukturellen Zustand die Ligandenspezifität bzw. -Avidität negativ beeinflussen und so die Ausbildung einer stabilen Bindung mit dem zellulären Rezeptor und/oder mit weiteren möglicherweise involvierten Oberflächenfaktoren hemmen. Munro und Kollegen schlagen für breitneutralisierende Antikörpern einen ähnlichen Mechanismus vor [103].

Weitereführende strukturelle Untersuchungen, beispielsweise mittels proteinanalytischer Verfahren, insbesondere der NMR oder proteinkristallographischen Untersuchungen von Komplexen, die aus HML-2-SU-h-Fc und dem Oberflächenfaktor und ihren vergleichbaren VLPs-Zellen-Komplexen bestehen, sollten die genauere Inhibitionsmechanismen aufklären.

Das chimäre Protein HML-2-SU-Fc wurde eingesetzt, um nach Zellmembranproteinen zu screenen, die in den Zelleintritt des HML-2 Virus involviert sind. Zur Detektion bzw. Isolierung der interagierenden Proteine, wurde die Affinität des Fc-Anteils des Chimärs zum Protein G zunutze gemacht. In dieser Arbeit wurde die Machbarkeit dieser Strategie demonstriert. HML-2-SU-Fc kann die Identifizierung von Proteinen, welche das Potential haben, als Rezeptor für HERV-K (HML-2) zu fungieren, erleichtern.

10. Zusammenfassung

HERV-K(HML-2) ist das jüngste und am besten erhaltene humane endogene Retrovirus. Menschliche Zellen, die diese Viren alle im Genom tragen sind in der Lage funktionelle virale Hüllproteine zu exprimieren. Diese Proteine können andere Retroviren pseudotypisieren und ihren Zelltropismus dadurch verändern. Wichtige Charakteristika des Eintrittsprozesses, der durch das Hüllprotein von HERV-K(HML-2) vermittelt wird, sind noch unbekannt und wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von pseudotypisierten lentiviralen Reporterviren analysiert. Als HERV-K(HML-2)-Hüllprotein wurde eine zuvor rekonstituierte Sequenz von HERV-K113 verwendet. Im Fokus der Untersuchungen stand die Identifizierung der Domäne des Hüllproteins, die an den noch unbekanntem Rezeptor bindet. Dafür wurde durch einen *in silico*-Vergleich mit Sequenzen verwandter β -Retroviren zunächst eine putative Rezeptorbindestelle gefunden. Durch gezielte Mutagenese wurde dieser Bereich mehrfach modifiziert. Die mutierten Hüllproteine waren nicht mehr in der Lage, den Zelleintritt der Viren zu gewährleisten oder verminderten ihn erheblich, was in Übereinstimmung mit einer Rezeptorbindungsfunktion dieser Proteinregion steht. Nachfolgend wurde der Versuch unternommen, durch Austausch der gefundenen Rezeptorbindedomäne von HERV-K(HML-2) gegen die des nahen Verwandten MMTV, den Virustropismus zu verändern. Die chimären Proteine wurden jedoch nicht in Retroviren eingebaut.

In einem weiteren Ansatz wurden lösliche Versionen der rezeptorbindenden SU-Einheit des HERV-K(HML-2)-Hüllproteins als Fusionsprotein mit einer C-terminalen Immunglobulin-domäne hergestellt. Als Kontrolle wurden homologe Proteine mit Hüllproteinen anderer Retroviren kloniert und augereinigt. In einer Reihe von Experimenten konnte die spezifische Bindung dieser Proteine an einen zellulären Rezeptor in permissiven Zellen nachgewiesen. In einem *proof-of principle* Experiment wurde dann die Möglichkeit zur Kopräzipitation des unbekanntem Rezeptors von HERV-K(HML-2) mit Hilfe dieser Fusionsproteine gezeigt. Im Zuge der Arbeit wurde der Rezeptor noch nicht isoliert. Die Herstellung und erfolgreiche Charakterisierung der SU-Ig-Fusionsproteine leistet dazu aber eine sehr aussichtsreiche und wichtige Voraussetzung.

Abstract

HERV-K(HML-2) is the youngest and best-conserved human endogenous retrovirus. Human cells, which are carrying these viruses in their genome, can express functional viral envelope proteins. These proteins can be used for pseudotyping other retroviruses and therefore for changing their cell tropism.

In the present work, important characteristics of the entry process mediated through the envelope protein of HERV-K(HML-2), which are still unknown, were analysed using pseudotyped lentiviral reporter viruses. A previously reconstituted sequence of HERV-K113 was used as an HERV-K(HML-2) envelope protein. This study focused on finding the domain of the envelope-protein that binds to the yet unknown receptor. To achieve this, an *in silico* comparison with protein sequences of closely related Betaretroviruses was performed. This comparison allowed a prediction of a putative receptor binding site, which then underwent site-directed mutagenesis leading to several modifications within the region. The generated envelope mutants were either unable to mediate the cell entry of the viruses or did it in a heavily depleted manner, indicating the receptor binding role of the region.

In order to alter the virus tropism, we interchanged the then found receptor binding domain of HERV-K(HML-2) with that of the most closely related MMTV, but the chimeric proteins couldn't be incorporated into the retroviruses.

A further approach consisted of expressing a soluble version of the receptor binding subunit of HERV-K(HML-2) envelope protein as a fusion protein with a C-terminal immunoglobulin domain. As control, homologous proteins based on envelope proteins from other retroviruses were cloned and affinity-purified. In a series of experiments, the specific binding of the proteins on a cellular receptor in permissive cells could be demonstrated. In a *proof-of principle* experiment, the possibility of a precipitation of the unknown receptor of HERV-K(HML-2) by using the fusion proteins was shown. In the course of this work, the receptor has not yet been isolated. The production and successful characterization of SU-Ig- fusion proteins supply however a promising and important requirement for future attempts.

11. Anhang

11.1. Sequenzierprimer

Primer	Sequenz (5'→3')
BGH-Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
CMV-For	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EF1- α -forward	TCAGCCTCAGACAGTGGTTC
H1-Forward	TCGCTATGTGTTCTGGGAAA
M13-Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13-Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
SP6-Reverse	CATACGATTTAGGTGACACTATAG
Screen-Stau1-Forward	AGCGTTGAGGATCCTGCAGAATGA
Screen-Stau1-Reverse	CCCCTGGTTTCTTTATGGGTGTCT
SeqSU-HERV-For	GCGGCTGCCAACTACACCTACTG
SeqSU-HERV-Reverse	G TTCAGCACGCCCTTCAGCAC
SeqEnvSU-For	ATGAACCCCAGCGAGATG
SeqEnvSU-Reverse	TGTGCTTGTGCTTGTCCAG
SeqIgG-For	CACATCCTGACAGAGTCTCG
SeqIgG-Rev	TTTAAACGGGCCCTCTAGATCTC
SeqIgG-Rev1	GAGGCTGATCAGCGGGTTTAAACG
Seq-cPPT-For	GAAAGAATAGTAGACATAATAGC
Seq-pCDNA3-For	GCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACG
Seq-pCDNA3-Rev	GGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCG
Seq-FcIgG-For	CTACAACGAGAGCGAGCACCAC
Seq-WPRE-Rev	CATAGCGTAAAAGGAGCAACA
T3-Promotor	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7-Promotor For	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

11.2. PCR-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')
fGADPH-For	GCCATCAATGACCCCTTCAT
fGADPH-Rev	GCCGTGGAATTTGCCGT
fALB-For	GATGGCTGATTGCTGTGAGA
fALB-Rev	CCCAGGAACCTCTGTTCATT
Puromycin-For	ATATGGATCCCCCATGGCTGACTAAT
Puromycin-Rev	TAATCATATGCCAAACCTACAGGTGGGGTCT
SflA-For	GGCCATTACGGCCGCCACCAAATGGATTA
SflB-Rev	GGCCGAGGCGGCCTCGAGTCAGCACCTCCC
Stau-BaHml-For	ATATGGATCCGGCCATTACGGCCGCCAC
Stau-NdeI-Rev	TAATCATATGGGCCGCCTCGGCCTCGAGT
cPPT-For	CTTCAGGGTACAGTGCAGGGGAAAG
WPRE-Rev	AATTCGTTGCGTCAGCAAACACAGT
XRVC-For	ACTTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGGAAAGCC
XRVC-Rev	ACCTGCTCGAGCCGCCCGCTTGTACTTGGT

11.3. Mutagenese-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')
ClaMutEnv-For	CCGTGCCCAGCACCTATCGAT GAACTCCTGGGGGGA
ClaMutEnv-rev	TCCCCCAGGAGTTCATCGATAGGTGCTGGGCACGG
DelgfpLIG-1-For	CCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCA
DelgfpLIG2-For	CTACCGGTGCGCCACCACTTCAAGATCCGCC
DelgfpLIG-2-Rev	TCCCGGGAATTCGAAGTTGAGCTCGACTAGC
DelgfpPCR-1-For	TTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAAAGAAGACA
DelgfpPCR-2-For	CGCTACCGGTGCGCCACCACTTCAAGATCCG
DelgfpPCR-2- Rev	AGGCCGAGGCGACCTCGGCCTCTGCA
DelgfpPCR-3-For	TATTTATGCAGAGGCCGAGGTCG
DelgfpPCR-3- Rev	TACTAAGTTTGTAGTACATATTTAACAAATACAATTTT
DelLig1-For	GTGGTGGAAATTCATGAACCCCAGCGAGATGC
DelLig2-Rev	GGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCAC
EEEMut-For	CCGCCAAGCCCGCTGCAGCTGGCATGATGAT
EEEMut-Rev	ATCATCATGCCAGCTGCAGCGGGCTTGGCGG
EnvDel144-152- For	CGACGACCGCTGCCCCGCCAACATCAGCATCGCCTACA
EnvDel144-152- Rev	TGTAGCCGATGCTGATGTTGGCGGGGCAGCGGTCGTCCG
EnvDel139A-For	GCCCCACCGACGCCCGCTGCCCCGCCA
EnvDel139A-Rev	TGGCGGGGCAGCGGGCGTCGGTGGGGC
Ins1-For	GGCTACAGATACCCCAAGCTTCCCATCTGCCTGGGC
Ins2-Rev	GCCCAGGCAGATGGGAAGCTTGGGGTATCTGTAGCC
MutDltLig1- ForPrimer	GTG GTG GAA TTC ATG AAC CCC AGC GAG ATG C
MutDltSULig2- Rev	GGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCAC
MMTVFor1	ATTAGAATTCATGCCCAAACACCAG
MMTVFor2	AGTAATCGATGTGCTGACTAATCAG

Anhang

MMTV-Rev	AGTGAAGCTTCAGGGTGTCTGACTT
NotMutEnv-For	CCTGTCTCCGGGTAA GCGCCCGCATGAGATCTAGAG
NotMutEnv-rev	CCCTCTAGATCTCATGCGGGCGCTTACCCGGAGACAGG
NotC1-Rev	ATTAGCGGCCGCCTGGGTGCACCGACA
NotC1V5-Rev	ATTATGCGGCCGCCTGGGTGCACCGACACACCAGCAGCAG
N128A-For	GAGGTCTACGTGGCCGACAGCGTGTGG
N128A-Rev	CCACACGCTGTCCGCCACGTAGACCTC
N153A-For	GAGGGCATGATGATCGCCATCAGCATCGGCTAC
N153A-Rev	GTAGCCGATGCTGATGGCGATCATCATGCCCTC
OverDel136-143- For	GTG TGG GTG CCA GGC AAG CCC GAG GAA GAG GGC ATG
OverDel136-143- Rev	CATGCCCTCTTCCTCGGGCTTGCCTGGCACCCACAC
PM1-For	GACAACCCCATCGATGTCTACGTGAACGAC
PM1-Rev	GTCGTTACGTAGACATCGATGGGGTTGTC
PWPXLDeltaGF	TCGAGGTTTAAACTACGGTATGATAATCAACCTC
P-Joiningprimer- For	
PWPXLDeltaGF	GTTGATTATCATACCGTAGTTTAAACCTCGAGGC
P-Joiningprimer- Rev	
XRVFc-For	ACTTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGGAAAGCC
XRVFc-Rev	ACCTGCTCGAGCCGCCCGCTTGTACTTGGT

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die N-Glykosylierungsstellen von MMTV- und HML-2-Env.....	29
Tabelle 2: β -Retroviren und Ihre Eintrittsmechanismen.....	34
Tabelle 3: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamidgels.....	63
Tabelle 4: Natur der Aminosäuren der RBD und Umgebung von HERV-K-HML-2, Vergleich mit dem phylogenetisch Verwandten MMTV.....	136
Tabelle 5: Sequenzen von HML-2-Env und seine Mutanten.....	141

13. Publikationsliste

Schriftliche Veröffentlichung

Hanke K, Hohn O, Liedgens L., Fiddeke K, **Wamara J**, Kurth R, Bannert N, *Staufen-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production*, Journal of Virology. 2013. **87**(20): p. 11019-11030

Posterpräsentationen

Fiddeke K., Rohde A., Hanke K, **Wamara J**, Hohn O, Bannert N., *Characterization of the Interaction Between Staufen-1 With HIV-1 Rev and HERV-K(HML-2) Rec*, Conference on Retroviruses and Opportunistic infections, 2014

Wamara J., Bannert N, *Entry Inhibition of HERV-K(HML-2) by an Env-IgG Fusion protein*, Frontiers of Retrovirology, 2016

Wamara J., Al-Shehabi H, Richter A, Bannert N., *Entry determinants of the humane endogenous retrovirus HERV-K(HML-2)*, Gesellschaft für Virologie, 2017

14. Lebenslauf

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

15. Literaturverzeichnis

1. Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*. Vol. 2. Auflage. 2010, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
2. Prasad, B.V.V. and M.F. Schmid, *Principles of Virus Structural Organization*. Adv Exp Med Biol., 2012. **726**: p. 17-47.
3. Brack-Werner, R., *Retroviren*. WS 2008/2009. <https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/IMV/PDF/Skripten/ssSegm.RNAVirus.pdf>
4. Weiss, R.A., *Retrovirus classification and cell interactions*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1996. **37**(Supplement B): p. 1-11.
5. Bukrinsky, M., *Molecular Medicine*. 2004. **10**: p. 1-5.
6. Vogt, P.K., *Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses*. Retroviruses, 1997. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press: p. 1-25.
7. Cohen, J.C. and H.E. Varmus, *Endogenous mammary tumour virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding*. Nature 29 March 1979. **278**: p. 418 - 423.
8. Aaronson, S.A. and J.R. Stephensen, *Endogenous type-C RNA viruses of mammalian cells*. Biochim. Biophys. , 1976. **Acta**(458): p. 323–354.
9. Hughes, S.H., et al., *Organization of the endogenous proviruses of chickens: Implications for origin and expression*. Virology, 1981. **108**: p. 189–207.
10. Repaske, R., et al., *Nucleotide sequence of a full-length human endogenous retroviral segment*. Virology. 1985(54): p. 764–772.

11. Löwer, R., et al., *Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation*. Proc. Natl. Acad. Sci. , 1993(90): p. 4480–4484.
12. Larsson, E., N. Kato, and M. Cohen, *Human endogenous proviruses*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1989. **148**: p. 115–132.
13. Bannert, N. and R. Kurth, *Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101** (Suppl 2): p. 14572-14579.
14. Escalera-Zamudio, M. and A.D. Greenwood, *On the classification and evolution of endogenous retrovirus: human endogenous retroviruses may not be 'human' after all*. APMIS, 2016.
15. Li, F., et al., *A systematic evaluation of expression of HERV-W elements; influence of genomic context, viral structure and orientation*. BMC Genomics, 2011.
16. Tristem, M., *Identification and Characterization of Novel Human Endogenous Retrovirus Families by Phylogenetic Screening of the Human Genome Mapping Project Database* Journal of Virology, 2000. **74 no. 8**: p. 3715-3730.
17. Jern, P. and J. Coffin, *Effects of retroviruses on host genome function*. Annu Rev Genet 2008. **42**: p. 709–32.
18. Belshaw, R., et al., *High Copy Number in Human Endogenous Retrovirus Families is Associated with Copying Mechanisms in Addition to Reinfection*. Mol Biol Evol. , 2005. **22**: p. 814-817.
19. Jern, P., G.O. Sperber, and J. Blomberg, *Use of Endogenous Retroviral Sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy*. Retrovirology, 2005.

20. Mariani-Costantini, R., T. Horn, and R. Callahan, *Ancestry of a human endogenous retrovirus family*. Virology, 1989.
21. Hayward, A., et al., *Pan-vertebrate comparative genomics unmasks retrovirus macroevolution*. Proc Natl Acad Sci USA, 2015.
22. R., G. and T. M., *The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses*. Virus Genes, 2003. **26**(3): p. 291-315.
23. E.D., S., *Perpetually mobile footprints of ancient infections in human genome*. FEBS Letters, 1998. **428**(1-2): p. 1-6.
24. Jens Mayer, a., et al., *Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity*. Journal of virology, 2004. **322**(1): p. 190-198.
25. Subramanian, R.P., et al., *Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K(HML-2) group of human endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2011. **8**(90).
26. Macfarlane, C. and P. Simmonds, *Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations*. J Mol Evol, 2004. **59** (642–656).
27. Mager, D. and P. Medstrand, *Retroviral repeat sequences*. Nature Encyclopedia of the Human Genome, 2003 (Cooper D, Editor): p. 57–63.
28. Hohn, O., K. Hanke, and N. Bannert, *HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease*. Frontiers of Oncology, 2013. **3** (246).
29. Mueller-Lantzsch, N., et al., *Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease*. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1993. **9** (4): p. 343–350.

30. Boller, K., et al., *Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K*. J. Virol., 1997. **71**(6): p. 4581–4588.
31. Sauter, M., et al., *Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas*. Journal of Virology, 1995. **69**(1): p. 414–421.
32. Sandrin, V., *Intracellular Trafficking of Gag and Env Proteins and Their Interactions Modulate Pseudotyping of Retroviruses*. Journal of retrovirology, 2004. **78**(13): p. 7153–7164.
33. Lodish H, Berk A, and Z. SL, *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, 2000. **4th edition**.
34. Rothman, J.E., *Felix Hoppe-Seyler Lecture 1996. Mechanisms of intracellular protein transport*. Biol. Chem., 1996. **377**: p. 407-410.
35. Spektrum, *Lexikon der Biologie*. 1999, Spektrum akademischer Verlag.
36. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2006.
37. Spencer E, T., et al., *Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses*. Journal of Virology, 2003. **77**(1): p. 749-753
38. Kurre, P., et al., *Efficient Transduction by an Amphotropic Retrovirus Vector Is Dependent on High-Level Expression of the Cell Surface Virus Receptor*. J Virol. , 1999 **73**(1): p. 495–500.
39. Battini, J.-L., J.E.J. Rasko, and A.D. T, *A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: Possible role in G protein-coupled signal transduction*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**(4): p. 1385–1390.

40. Fan, Hung Y., Jaagsiekte Sheep Retrovirus and Lung Cancer, Springer Verlag, 2003
41. John J. Holland, *Genetic diversity of RNA viruses*, Springer-Verlag, 1992.
42. Cotton, JA., *Retroviruses from Retrotransposons*, Genom Biology, 2001. **2**: 0006.
43. Robert A. Dick and Volker M. Vogt, Membrane interaction of retroviral Gag proteins, Front Microbiol. 2014; 5: 187.
44. https://viralzone.expasy.org/66?outline=all_by_species; Stand: 02.04.2018
45. Harrison Stephen C., *Viral membrane Fusion*, Nat Struct Mol Biol., 2008. **15**(7): p. 690-698
46. White et. al., *Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins*, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2008. **43**(3): p. 189-219.
47. Halil Aydin, Jonathan D. Cook, and Jeffrey E. Lee, *Crystal Structures of Beta- and Gammaretrovirus Fusion Proteins Reveal a Role for Electrostatic Stapling in Viral Entry*. Journal of Virology, 2014. **88**(1): p. 143–153.
48. R. J. Center, P. Schuck, R. D. Leapman et al., *Oligomeric structure of virion-associated and soluble forms of the simian immunodeficiency virus envelope protein in the prefusion activated conformation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(26), p.14877–14882.
49. F. Förster, O. Medalia, N. Zauberman, W. Baumeister, and D. Fass, *Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(13), p. 4729–4734.
50. T. Wilk, F. de Haas, A. Wagner et al., *The intact retroviral Env glycoprotein of human foamy virus is a trimer*, Journal of Virology, 2000. **74**(6), p. 2885–2887.

51. David Bhelle, The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015. **370**(1661): p. 20140035
52. Ross SR, Schofield JJ, Farr CJ, Bucan M, *Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2002. **99**(19): p.12386-90.
53. Tatyana V. Golovkina, John Dzuris, Bernadette van den Hoogen, Aron B. Jaffe, Paul C. Wright, Shelagh M. Cofer, and Susan R. Ross, *A Novel Membrane Protein Is a Mouse Mammary Tumor Virus Receptor*, *Journal of Virology*, 1998. **72**(4): p. 3066–3071.
54. Dirks C, Duh FM, Rai SK, Lerman MI, Miller AD, *Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus*, *J Virol.*, 2002. **76**(5):2141-9.
55. A. Dusty Miller, *Hyaluronidase-2 and Its Role as a Cell-Entry Receptor for Sheep Retroviruses That Cause Contagious Respiratory Tract Cancers*, *Hyaluronan in Cancer Biology*, 2009: p. 407-418
56. Robert Stern, *Hyaluronan in cancer Biology*, Elsevier, 2009. **1st Edition**: p. 409-412.
57. Paul A. Luciw, Nancy J. Leung, *The Retroviridae*, Springer sciences and business media. 1992. **1**: p. 180-181.
58. John E. J. Rasko, Jean-Luc Battini, Rebecca J. Gottschalk, Ilya Mazo, and A. Dusty Miller, *The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral aminoacid transporter*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999. **96**(5): p. 2129–2134.
59. Invitrogen, *TURBO DNA-free Kit User Guide*, Pub. No.**1907M** Rev. H
60. Feng Gong, Deirdre Fahy, Michael J. Smerdon, *Combination of chemical crosslinking and pulldown assay to study transient protein-protein interactions*, 2006. Protocol exchange Nature. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.297>
61. Hanke, K., *Funktionelle Charakterisierung der HERV-K Proteine Env und Rec*, 2010. Dissertation.

62. Hong Luo and Harm Nijveen, *Understanding an identifying amino acid repeats*. Brief Bioinform, 2014. **15**(4): p. 582-591.
63. Kristin Stieler et.al., *Host range and cellular tropism of the human exogenous gammaretrovirus XMRV*, Virology, 2010. **399**(1): p. 23-30.
64. Ying Zeng, T.N.C. Ramya, Anouk Dirksen, Philipp E. Dawson, James C. Paulson, *High efficiency labeling of glycoproteins on living cells*, Nature methods, 2009. **6**(3): p. 207-209.
65. Jovan Nikolic, Laura Belot, Hélène Raux, Pierre Legrand, Yves Gaudin, Aur elie A. Albertini, *Structural basis for the recognition of LDL receptor family members by VSV glycoprotein*, Nature Communications, 2018. **9**(1029)
66. Finkelshtein D., Werman A., Novick D., Baral S., Rubinstein M., *LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitisvirus*, Proc Natl Acad Sci USA, 2013. **110**(18): p. 7306-11.
67. Fouzia Amirache, Camille Lévy, Caroline Costa, Philippe-Emmanuel Mangeot, Bruce E. Torbett, Cathy X. Wang, Didier N egre, Francois-Loic Cosset, Els Verhoeyen, *Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor*, Blood 2014. **123**: p.1422-1424.
68. Mahmood A. Mahdavi, Yen-Han Lin, *Prediction of Protein-Protein Interactions Using Protein Signature Profiling*, Proteomics & Bioinformatics. 2007; **5**(3-4): p. 177-186
69. Nianshuang Wang, Xuanling Shi, Liwei Jiang, Senyan Zhang, Dongli Wang, Pei Tong, Dongxing Guo, Lili Fu, Ye Cui, Xi Liu, Kelly C. Arledge, Ying Hua Chen, Linqi Zhang, Xinquan Wang, *Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4*, Cell Research, 2013. **23**: p. 986-993.

70. Côté M., Zheng YM, Albritton LM, Liu SL, *Single residues in the surface subunits of oncogenic sheep retrovirus envelopes distinguish receptor-mediated triggering for fusion at low pH and infection*, Virol. 2011; **421**(2): p. 173-83
71. Li F., *Receptor Recognition Mechanisms of Coronaviruses: a Decade of Structural Studies*, J. Virol. 2015. **89**(4): p. 1954-64.
72. Diering GH, Numata M., *Endosomal pH in neuronal signaling and synaptic transmission: role of Na⁺/H⁺ exchanger NHE5*. Frontiers in Physiology. 2014; **4**:412.
73. Hu YB, Dammer EB, Ren RJ, Wang G, *The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration*, Transl. Neurodegener. 2015. **30**(4): p. 18
74. Yuanming Zhang, John C. Rassa, Maria Elena deObaldia, Lorraine M. Albritton, Susan R. Ross, *Identification of the Receptor Binding Domain of the Mouse Mammary Tumor Virus Envelope Protein*, Journal of Virology. 2003. J. Virol. **77**(19): p. 10468-78.
75. Jonathan D. Steckbeck, Anne-Sophie Kuhlmann, Ronald C. Montelaro, *Structural and Functional Comparisons of Retroviral Envelope Protein C-Terminal Domains: Still Much to Learn*, Viruses. 2014. **6**(1): p. 284-300.
76. Côté M., Zheng YM, Albritton LM, Liu SL, *Fusogenicity of Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is dependent on low pH and is enhanced by cytoplasmic tail truncations*, J Virol. 2008; **82**(5): p. 2543-54
77. Löving R, Wu SR, Sjöberg M, Lindqvist B, Garoff H, *Maturation cleavage of the murine leukemia virus Env precursor separates the transmembrane subunits to prime it for receptor triggering*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2012; **109**(20): p. 7735-40.
78. Rein A, Mirro J, Haynes JG, Ernst SM, Nagashima K, *Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage*

- activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein*, J Virol. 1994; **68**(3): p. 1773-81
79. Killian JA, von Heijne G, *How proteins adapt to a membrane-water Interface*, Trends Biochem Sci., 2000. **25**(9): p. 429-34.
80. Lee A.G, *Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective*, Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, 2003. **1612**(1): p. 1-40
81. Frederic N. R. Petersen, Morten Ø. Jensen, and Claus H. Nielsen, *Interfacial Tryptophan Residues: A Role for the Cation- π Effect?*, Biophysical Journal, 2005. **89**: p. 3985-3996.
82. Schiffer, M., C.-H. Chang, and F. J. Stevens, *The functions of tryptophan residues in membrane proteins*, Protein Eng, 1992. **5**: p. 213-214.
83. Schnell DJ, Hebert DN, *Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes*, Cell. 2003. **112**(4): p. 491-505.
84. White, S. H., Wimley, W.C., *Membrane protein folding and stability: physical principles*. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1999. **28**: p. 319-365.
85. Engelman D. M, Steitz T.A, Goldman A., *Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1986. **15**: p. 321-353
86. Leroux C., Girard N., Cottin V, Greenland T., Mornex J.-F., Archer F., *Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): From virus to lung cancer in sheep*. 2007. Vet. Res. **38**: p. 211-228.
87. Liu S.-L., Miller A.D., *Oncogenic transformation by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein*. Oncogene. 2007. **26**: p. 789-801
88. Erhard Bieberich, *Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins*, Adv Neurobiol. 2014; **9**: p. 47-70

89. Anne Goffard, Nathalie Callens, Birke Bartosch, Czeslaw Wychowski, Francois-Loic Cosset, Claire Montpellier, Jean Dubuisson, *Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins*, J. Virol. 2005. **79**(13): p.8400-8409.
90. Bin Wang, Yujie Wang, Dylan A. Frabutt, Xihe Zhang, Xiaoyu Yao, Dan Hu, Zhuo Zhang, Chaonan Liu, Shimin Zheng, Shi-Hua Xiang, Yong-Hui Zheng, *Mechanistic understanding of N-glycosylation in Ebola virus glycoprotein maturation and function*, journal of biological chemistry, 2017. **292**: p. 5860-5870.
91. Op de Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J, *Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 11): 2589-95
92. Ashim K Mirta, *Ocular Transporters and Receptors: Their Role in Drug Delivery*, Elsevier, 2013.
93. Paprotka, T., K. A. Delviks-Frankenberry, O. Cingoz, A. Martinez, H. J. Kung, C. G. Tepper, W. S. Hu, M. J. Fivash, Jr., J. M. Coffin, and V. K. Pathak. 2011. *Recombinant origin of the retrovirus XMRV*. Science 333: p. 97-101.
94. Levy JA: *Xenotropic viruses: murine leukemia viruses associated with NIH Swiss, NZB, and other mouse strains*. Science. 1973. **182**: p. 1151-1153
95. Lebrón JA, West AP Jr, Bjorkman PJ, *The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor*, J Mol Biol. 1999. **294**(1): p. 239-245.
96. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebrón JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ, Schatzman RC, *The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. **95**(4): p. 1472-7.

97. Anthony P. West Jr, Anthony M. Giannetti, Andrew B. Herr, Melanie J. Bennett, Jasvinder S. Nangania, James R. Pierce, Leslie P. Weiner, Peter M. Snow, Pamela J. Bjorkman, *Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites*, Journal of molecular biology, 2001. **313**(2): p. 385-397
98. Pancera M, Zhou T, Druz A, Georgiev IS, Soto C, Gorman J, Huang J, Acharya P, Chuang GY, Ofek G, Stewart-Jones GB, Stuckey J, Bailer RT, Joyce MG, Louder MK, Tumba N, Yang Y, Zhang B, Cohen MS, Haynes BF, Mascola JR, Morris L, Munro JB, Blanchard SC, Mothes W, Connors M, Kwong PD, *Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env*, Nature 2014. **514**(7523):455-61
99. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM, *Antibody neutralization and escape by HIV-1*, Nature 2003. **422**(6929): p. 307-12.
100. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG, *The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein*, Nature. 1998. **393**(6686): p. 705-11
101. Guttman M, Cupo A, Julien JP, Sanders RW, Wilson IA, Moore JP, Lee KK, *Antibody potency relates to the ability to recognize the closed, pre-fusion form of HIV Env*, Nat Commun. 2015. **6**: 6144
102. Munro JB, Gorman J, Ma X, Zhou Z, Arthos J, Burton DR, Koff WC, Courter JR, Smith AB 3rd, Kwong PD, Blanchard SC, Mothes W, *Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions*, Science. 2014. **346**(6210): p. 759-63
103. James B. Munro, Walther Mothes, *Structure and Dynamics of the Native HIV-1 Env Trimer*, J Virol. 2015. **89**(11): p. 5752-5755.