

Untersuchungen zur Überexpression des GLUT-1-Rezeptors und dessen Effekte auf die Infektionsrate von HTLV-1

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades
Bachelor of Science (B.Sc.)

Vorgelegt von:

Anna-Klara Amler

Matrikelnummer 329479

Berlin, Dezember 2012

Angefertigt im Fachgebiet 18 Zentrum für HIV und Retrovirologie
Am Robert Koch-Institut, Berlin

Eingereicht im Fachgebiet Medizinische Biotechnologie
Institut für Biotechnologie
Technische Universität Berlin

Betreuung: PD Dr. Norbert Bannert und Dr. Oliver Hohn, Robert Koch-Institut, Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Roland Lauster, Technische Universität Berlin
2. PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin

Datum: 06.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	- 5 -
2	Abstract	- 6 -
3	Einleitung	- 7 -
3.1	Retroviren	- 7 -
3.1.1	Allgemeines	- 7 -
3.1.2	Aufbau	- 8 -
3.1.3	Replikationszyklus eines Retrovirus	- 10 -
3.2	HTLV.....	- 12 -
3.2.1	Allgemeines	- 12 -
3.2.2	Übertragung und Tropismus	- 13 -
4	Zielsetzung	- 17 -
5	Materialien und Methoden	- 18 -
5.1	Materialien	- 18 -
5.1.1	Laborgeräte	- 18 -
5.1.2	Chemikalien und Reagenzien	- 19 -
5.1.3	Enzyme und zugehörige Puffer.....	- 20 -
5.1.4	Marker und Standards.....	- 21 -
5.1.5	Puffer und Medien.....	- 22 -
5.1.6	Antikörper.....	- 23 -
5.1.7	Zelllinien.....	- 24 -
5.1.8	Materialien für Zellkultur	- 25 -
5.1.9	Bakterienstämme.....	- 25 -
5.1.10	Plasmide.....	- 25 -
5.1.11	Kits	- 26 -
5.1.12	Primer und Sonden.....	- 26 -

Inhaltsverzeichnis

5.2	Methoden	- 28 -
5.2.1	DNA-Analytik.....	- 28 -
5.2.1.1	PCR	- 28 -
5.2.1.2	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	- 29 -
5.2.1.3	Sequenzierungs-PCR.....	- 29 -
5.2.1.4	Kolonie-PCR.....	- 30 -
5.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	- 30 -
5.2.1.6	Duplex-Realtime-PCR.....	- 30 -
5.2.1.7	Eukaryotische Expression von modifizierten Proteinen	- 32 -
5.2.1.8	Transformation.....	- 33 -
5.2.1.9	Plasmid-DNA-Isolation.....	- 33 -
5.2.1.10	Restriktionsverdau.....	- 34 -
5.2.1.11	Gelextraktion	- 34 -
5.2.2	Zellkultur	- 35 -
5.2.2.1	Passagieren, Aussäen.....	- 35 -
5.2.2.2	Transfektion.....	- 35 -
5.2.2.3	Infektion.....	- 36 -
5.2.2.4	Immun-Peroxidase-Assay (IPA).....	- 36 -
5.2.2.5	DNA-Isolation aus Zellen.....	- 37 -
5.2.3	Protein-Analytik.....	- 37 -
5.2.3.1	Aufreinigung von Antikörpern	- 37 -
5.2.3.2	Pierce BCA Protein-Assay	- 38 -
5.2.3.3	Ultrazentrifugation	- 38 -
5.2.3.4	Zelllyse	- 39 -
5.2.3.5	SDS-PAGE	- 39 -
5.2.3.6	Coomassie-Färbung.....	- 40 -
5.2.3.7	Western Blot	- 40 -
5.2.3.8	Strippen.....	- 41 -
5.2.3.9	Cavidi-Assay.....	- 42 -

Inhaltsverzeichnis

6	Ergebnisse	- 43 -
6.1	Klonierung von Positivkontrollen	- 43 -
6.2	Aufreinigung eines monoklonalen α -Tax-Antikörpers	- 45 -
6.3	Herstellung eines infektiösen HTLV-1-Überstands	- 47 -
6.4	Herstellung von GLUT-1 überexprimierenden ARPE-19- und HOS-Zellen	- 49 -
6.4.1	Plasmide	- 49 -
6.4.2	Transfektion in Zelllinien	- 50 -
6.5	Infektionsversuch	- 53 -
7	Diskussion	- 57 -
7.1	Klonierung von Positivkontrollen und Aufreinigung eines monoklonalen α -Tax-Antikörpers	- 57 -
7.2	Überexpression des GLUT-1-Transporters	- 57 -
7.3	Herstellung eines infektiösen HTLV-1-Überstands	- 59 -
7.4	Infektion von ARPE-19- und HOS-Zellen	- 61 -
8	Ausblick	- 65 -
9	Literaturverzeichnis	- 66 -
10	Anhang	- 71 -
10.1	Abkürzungsverzeichnis	- 71 -
10.2	Danksagung	- 73 -
10.3	Erklärung	- 74 -

1 Zusammenfassung

Mit dem humanen T-lymphotropen Virus (HTLV) sind weltweit 15-20 Millionen Menschen infiziert, wobei es in einigen, eng begrenzten Gebieten eine Prävalenz von bis zu 35% besitzt. Die Infektion mit dem Virus führt in 3-5% der Infizierten zur HTLV-assoziierten Myelopathie/ tropischen spastischen Paraparese (HAM/TSP) und/oder zur adulten T-Zell-Leukämie (ATL). *In vivo* erfolgt die Transmission hauptsächlich durch Zell-assoziiertes Virus, z.B. bei Stillen des Kindes mit Muttermilch, sexuellem Kontakt oder durch kontaminierte Blutprodukte. Obwohl die Infizierbarkeit vieler Zelllinien *in vitro* mittels Co-Kultivierung mit HTLV-1 produzierenden Zellen bereits gezeigt wurde, ist eine Infektion durch freies Virus nicht einfach zu erreichen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Überexpression des putativen HTLV-1-Rezeptors GLUT-1 in zwei verschiedenen Zelllinien zu einer Erhöhung der Infektionsrate durch freies Virus führt. Dazu wurden zunächst die HTLV-1-Sequenzen für das p19 Matrix- und das p24 Capsid-Protein in ein eukaryontisches Expressionskonstrukt unter Einfügen des V5-Tags kloniert, um im Western Blot nachweisbare Positivkontrollen, sowohl mittels eines HTLV-1-spezifischen Serums als auch eines kommerziellen monoklonalen α -V5-Antikörpers, zu erhalten. Weiterhin wurde ausgehend von einer Hybridoma-Zelllinie ein monoklonaler α -Tax-Antikörper aufgereinigt und erfolgreich zur Detektion der HTLV-1-Replikation in Zellen eingesetzt.

In einem Infektionsexperiment sollten Zelllinien, die GLUT-1 überexprimieren, zellfrei infiziert werden. Für die beiden dafür verwendeten Zelllinien HOS (humanes Osteosarkom) und ARPE-19 (humanes pigmentiertes Retina-Epithel) wurde bereits die Infizierbarkeit mit HTLV-1 berichtet. Die Überexpression von GLUT-1 in HOS- und ARPE-19-Zellen wurde mittels Transfektion eines entsprechenden Plasmids erreicht und konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sowie des Western Blots nachgewiesen werden.

Für den Infektionsversuch wurden Viren in chronisch infizierten MT-2-Zellen und in transient mit einem Molekularklon transfizierten HEK-293T-Zellen produziert und aufkonzentriert, sodass eine infektiöse, hochtritige Suspension genutzt werden konnte. Mittels Realtime-PCR wurde die Infektion beider Zelllinien nachgewiesen. Hier konnte erstmals auch die zellfreie Infektion von ARPE-19-Zellen gezeigt werden; zuvor war nur für die Zelllinie HOS eine zellfreie Infektion beschrieben worden. Durch Messung der Reversen-Transkriptase-Aktivität im Überstand der infizierten Zellen, ein Marker für die Freisetzung von neuen viralen Partikeln, konnte gezeigt werden, dass die Infektion innerhalb des Inkubationszeitraums bei beiden Zelllinien nicht produktiv war. Die Überexpression von GLUT-1 hat nach den Ergebnissen dieser Arbeit keinen erkennbaren Einfluss auf die Infektionsrate von HTLV-1 in HOS- und ARPE-19-Zellen.

2 Abstract

The human T-lymphotropic virus (HTLV) infects 15-20 million people worldwide. In some hotspots this prevalence reaches up to 35%. The infection with the virus leads in 3-5% cases of infected individuals to the HTLV-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and/or to the adult T-cell leukemia (ATL). *In vivo* the virus is mainly transmitted via cell-associated contacts, *i.e.* breastfeeding, sexual contacts or via contaminated blood products. Although it has been shown that many established cell lines can be infected with HTLV-1 via cocultivation with virus producing cells, an infection with free virions is not easy to achieve.

In this thesis the goal was to examine, whether an overexpression of the putative HTLV-1 receptor GLUT-1 increases the infection rate by free virions. In that aim, the HTLV-1 sequences of the p19 matrix and the p24 capsid protein were cloned into a eukaryotic expression construct while adding a V5 tag, so that positive controls were gained, which can be used for a Western blot both with an HTLV-1 specific serum and a commercial monoclonal α -V5 antibody. Furthermore a monoclonal α -Tax antibody was purified from a hybridoma cell line and used for detection of the replication of HTLV-1 in cells.

Purpose of the infection experiment was to examine whether GLUT-1 overexpressing cells are able to be cell-free infected. For this experiment the cell lines HOS (human osteosarcoma) and ARPE-19 (human retinal pigment epithelium) were used, which have been reported as infectable with HTLV-1. The overexpression of GLUT-1 was attained by transfection of a corresponding plasmid and detected by fluorescence microscopy and Western blot.

For the infection experiment virions were produced in chronically infected MT-2 cells and in transient with a molecular clone transfected HEK-293T cells and concentrated, so that an infectious high titring suspension could be used. Using real time PCR infection of both cell lines was proved, while only cell-free infection of HOS cells has been reported so far. Here the cell-free infection of ARPE-19 cells could be demonstrated for the first time. By determining the reverse transcriptase activity in the supernatants of the infected cells, which is a marker of the release of new viral particles, we were able to show that the infection of both cell lines was non-productive within the incubation time. Based on the results of this thesis, the overexpression of GLUT-1 has no observable effect on the infection rate of HTLV-1 in HOS and ARPE-19 cells.

3 Einleitung

3.1 Retroviren

3.1.1 Allgemeines

Die ersten Untersuchungen, die Retroviren beschreiben, wurden 1908 von Ellermann und Bang an Hühnern gemacht [9]. Diese beobachteten, dass sich eine Leukämie durch Ultrafiltrate zellfrei übertragen lässt. Eine ähnliche Beobachtung machte Rous 1911 für die Ultrafiltrate von Geflügelsarkomen [50]. Bittner zeigte dies 1936 erstmals für Säugetiere anhand der malignen Milchdrüsenenerkrankung von Mäusen, die er mit dem MMTV (Maus-Mammatumor-Virus) assoziierte [5]. Als erstes humanes Retrovirus wurde das humane T-lymphotrope Virus (HTLV) im Jahr 1980 von Poiesz im Labor von Robert C. Gallo entdeckt [46].

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) unterteilt sich heutzutage in die Unterfamilien *Orthoretrovirinae* und *Spumavirinae*. Zu letzterer gehört ausschließlich die Gattung der Spumaviren. Die *Orthoretrovirinae* umfassen die α -, β -, γ -, δ -, und ε -Retroviren sowie die Lentiviren (s. Abb. 1). Kriterien für die Unterteilung sind hierbei Besonderheiten der Infektion, Pathologie und Morphologie sowie genetische Unterschiede. Durch Retroviren können beispielsweise Tumore und Störungen des Immunsystems hervorgerufen werden [26, 39].

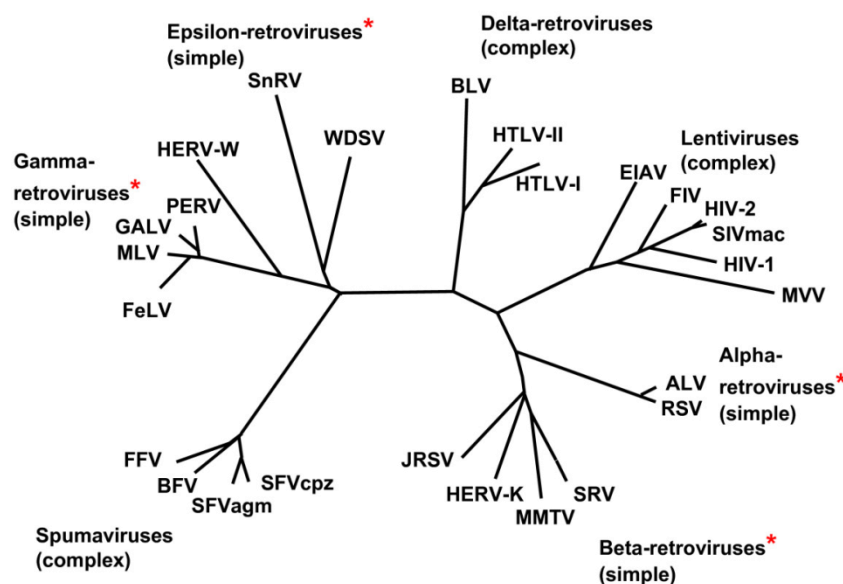


Abbildung 1: Stammbaum der Retroviren. Diese werden heutzutage unterteilt in Spuma-, Lenti-, α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren. Verändert von R. Weiss [60].

Einleitung

Man unterscheidet zwischen endogenen und exogenen Retroviren. Exogene Retroviren können sich horizontal übertragen, da ihr Genom sämtliche Proteine codiert, die für eine infektiöse Übertragung benötigt werden. Endogene Retroviren sind hingegen in das Genom aller Zellen ihres Wirts integriert und werden vertikal an dessen Nachkommen weitergegeben. Einige von ihnen können mit Hilfe eines anderen Retrovirus, das als Helfervirus bezeichnet wird, aktiviert werden. Häufig sind diese jedoch so degeneriert, dass nur noch Bruchstücke des Genoms wie die LTR-Regionen vorhanden sind [26, 39].

Ein besonderes Merkmal der Retroviren ist die Reverse Transkriptase, welche ihnen ermöglicht, ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben und in das Genom des Wirts zu integrieren. Diese ist jedoch nicht einzigartig für Retroviren, sondern auch beispielsweise in Hepadnaviren vorhanden [55]. Dennoch kann sie als Grundlage für Detektionsassays genutzt werden.

3.1.2 Aufbau

Der Aufbau eines Retroviruspartikels ist in Abbildung 2 beispielhaft für HTLV dargestellt.

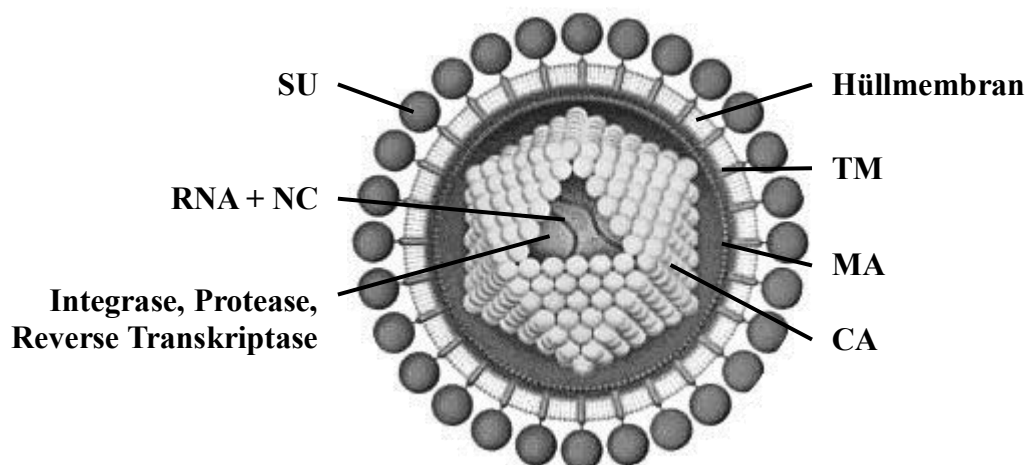


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines HTLV-Virions. Die Hüllmembran ist eine Lipid-Doppelmembran, in die das TM-Protein integriert ist. An dieses assoziiert liegt das SU-Protein vor. SU- und TM-Proteine werden als Env-Proteine zusammengefasst. An der Innenseite der Hüllmembran befinden sich die MA-Proteine. Das Innere des Virus wird als Core oder Viruscapsid bezeichnet, das sich aus den CA-Proteinen zusammensetzt. Darin enthalten ist das einzelsträngige RNA-Genom des Virus, das in zwei Kopien vorliegt. Die RNA-Moleküle sind mit den NC-Proteinen assoziiert. MA-, CA- und NC-Proteine bilden zusammen die Gag-Proteine. Zusätzlich befinden sich im Core die Integrase, Reverse Transkriptase und Protease. Verändert von <http://www.flickr.com/photos/ajc1/419923459/>.

Einleitung

dig bekannt sind. P8 ist beispielsweise an der Zell-Zell-Übertragung von HTLV beteiligt. Durch Expression von p12 werden sowohl die Proliferation von infizierten T-Zellen verstärkt als auch deren Interleukin-2-Unabhängigkeit bewirkt. Zusammen ermöglichen p8 und p12 also die Etablierung und Erhaltung der Infektion [59]. Es wird vermutet, dass p13 infizierte Zellen sensitiv gegenüber apoptotischen Signalen macht sowie mit Tax interagiert [53]. P30 wirkt möglicherweise u.a. als Suppressor der Virusexpression *in vivo* [3]. HBZ steht in Wechselwirkung mit verschiedenen zellulären Faktoren und beeinflusst die Transkription der proviralen DNA. Auf diese Weise nimmt es auch Einfluss auf die Leukämogenese [36].

Die Bezeichnung der HTLV-Proteine leitet sich von deren Molekulargewicht ab. In Tabelle 1 sind diese dargestellt.

Tabelle 1: Bezeichnung der Proteine von HTLV [3, 36, 39, 53, 59]

Kategorie	Env		Gag			Pol			Regulatorische Proteine	
Protein	SU	TM	MA	CA	NC	RT	PR	IN	Tax	Rex
Bezeichnung	gp46	gp21	p19	p24	p15	p95	p14	p60	p40	p27

Kategorie	Weitere Proteine				
Bezeichnung	p8	p12	p13	p30	HBZ

3.1.3 Replikationszyklus eines Retrovirus

Zur Replikation des Virus erfolgt die Infektion der Wirtszelle (s. Abb. 4). Dieser Vorgang ist für einige Viren wie HIV (humanes Immundefizienz-Virus) und MLV (Maus-Leukämie-Virus) genauer erforscht, bei anderen Viren wie HTLV sind jedoch nicht alle Details über die Abläufe sowie die beteiligten zellulären Proteine bekannt. Grundsätzlich heften sich die Viruspartikel über eine Wechselwirkung der SU-Proteine mit Oberflächenmolekülen der Wirtszelle an diese an. Daraufhin erfolgt die Fusion der beiden Membranen, sodass das Capsid in die Zielzelle abgegeben wird. Durch die im Capsid enthaltene Reverse Transkriptase wird dann das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Da die RT nicht über eine Korrekturlesefähigkeit verfügt, kommt es im Fall von HTLV-1 mit einer Wahrscheinlichkeit von $7 \cdot 10^{-6}$ zu einer Mutation, was die Variabilität der entstehenden Proviren erhöht [35].

Einleitung

Die mit den Nucleocapsid-Proteinen assoziierte, entstandene DNA wird als Präintegrationskomplex bezeichnet. Dieser wird in den Zellkern transportiert. Dabei ist es nur Lentiviren möglich, ruhende Zellen zu infizieren, indem der Komplex durch die Kernporen gelangt. Für die anderen Retroviren ist es für eine Infektion essentiell, dass die Zielzelle sich teilt, sodass die Kernmembran aufgelöst ist. Mit Hilfe der Integrase folgt dann die Integration der viralen DNA in das Genom der Zelle, sodass sie als Provirus vorliegt und bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird.

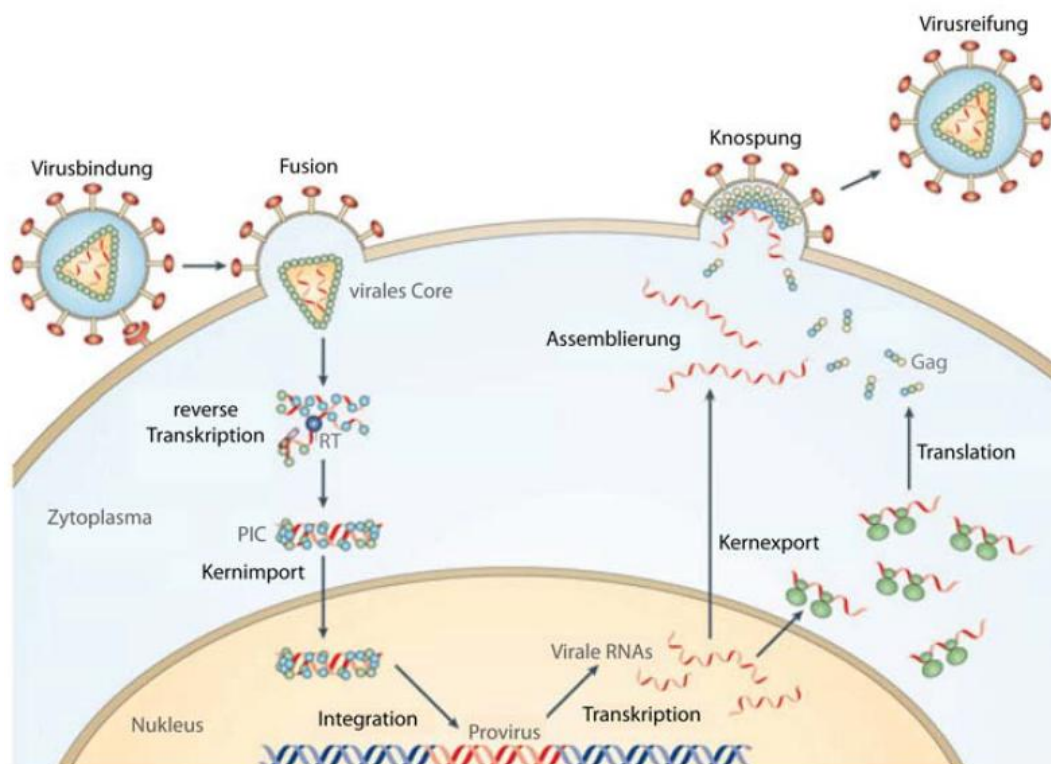


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Replikationszyklus eines Retrovirus. Nach Bindung des Viruspartikels an die Zelle mittels der SU-Proteine erfolgt die Fusion mit der Wirtszelle. Durch Verschmelzen der beiden Membranen werden die Capsid-Proteine in die Zelle freigesetzt. Es erfolgt die Reverse Transkription, bei der das virale Genom, das als RNA im Viruspartikel vorliegt, in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben wird. Der entstehende Präintegrationskomplex (PIC) setzt sich aus der entstandenen DNA und damit assoziierten Nucleocapsid-Proteinen zusammen. Es erfolgt der Transport in den Zellkern, woraufhin die Integration des viralen Genoms in das Genom der Zelle mit Hilfe der Integrase stattfindet. Das virale Genom liegt nun als Provirus vor, das bei der Teilung der infizierten Wirtszelle an die entstehenden Tochterzellen weitergegeben wird. Im Fall einer produktiven Infektion findet die Transkription und Translation der viralen Proteine statt. Diese lagern sich zusammen, sodass ein neuer Viruspartikel knospen kann. Die im Partikel enthaltenen Gag- und Pol-Vorläuferproteine werden während der Reifung mit Hilfe der Protease in die einzelnen Proteine gespalten. Aus Nisole *et al.* [42].

Einleitung

Bei einer produktiven Infektion können nun die Transkription der Gene im Zellkern und die anschließende Translation in die entsprechenden viralen Proteine an den Ribosomen im Cytoplasma der Wirtszelle stattfinden. Die Transkription der integrierten Provirus-DNA bei Expression der Virusproteine erfolgt mit Hilfe der RNA-Polymerase II, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit falsche Nukleotide anfügt. Dadurch wird die Variabilität der produzierten Viruspartikel neben den durch die RT entstandenen Mutationen beispielsweise bei HIV zusätzlich stark erhöht. Die Env-Proteine integrieren sich in die Membran der Wirtszelle und wechselwirken mit den anderen im Cytoplasma enthaltenen Virusproteinen sowie der viralen RNA, die mit den Nucleocapsid-Proteinen assoziiert vorliegt. Durch Ausstülpung der Membran erfolgt die Knospung des Viruspartikels. In der anschließenden Reifung des Partikels spaltet die Protease die Vorläuferproteine zu den einzelnen, reifen Gag- und Pol-Proteinen [26, 39].

3.2 HTLV

3.2.1 Allgemeines

Vor der Entdeckung der Retroviren beim Menschen waren bereits Retroviren bei Tieren bekannt, die zu Leukämien und Tumoren führten. Als erstes humanes Retrovirus wurde HTLV-1 1980 aus einem Patienten mit adulter T-Zell-Leukämie (ATL) isoliert [39], kurz darauf folgte die Isolation von HTLV-2 aus T-Zellen einer Haarzelleukämie [26, 39]. Beide Typen besitzen eine Homologie von etwa 60-70% auf Nukleotid-Ebene [20, 39]. Daneben sind einzelne Fälle von den Typen 3 und 4 berichtet worden, die ebenfalls eine hohe Homologie zu den anderen Typen aufweisen [31].

HTLV-1 gehört zu den Deltaretroviren und ist ein komplexes Retrovirus. Das gesamte Genom besteht aus etwa 8,7kb. Die Gene *gag*, *pol* und *pro* werden als Vollängentranskript transkribiert und durch eine Leserasterverschiebung an den Ribosomen in die entsprechenden Proteine translatiert [26, 39].

HTLV-1 ist ubiquitär verbreitet, besitzt aber eine besonders hohe Prävalenz in Japan, der Karibik, Südamerika und Afrika mit bis zu 37% in einigen eng begrenzten Regionen (s. Abb. 5) [13, 26, 39, 40, 48]. Weltweit sind etwa 15 bis 20 Millionen Menschen infiziert [31]. HTLV-1 führt nach einer sehr langen Latenzzeit von bis zu mehreren Jahrzehnten [51] zur adulten T-Zell-Leukämie (ATL) und/oder zur tropischen spastischen Paraparese, die auch als HTLV-assoziierte

Einleitung

Myelopathie bekannt ist (TSP/HAM) [26, 39]. Dies ist jedoch mit 3-5% nur in einem geringen Teil der Infizierten der Fall [53]. Mit HTLV-2 wurde bisher noch keine Erkrankung assoziiert. Eine zugelassene Impfung gegen HTLV-1 oder eine Therapie gegen die hervorgerufenen Krankheiten ist bisher nicht vorhanden. Die häufigsten Übertragungswege stellen das Stillen von Säuglingen mit Muttermilch durch infizierte Mütter, Bluttransfusionen mit kontaminierten Blutprodukten und Sexualkontakte dar [26, 39, 44].

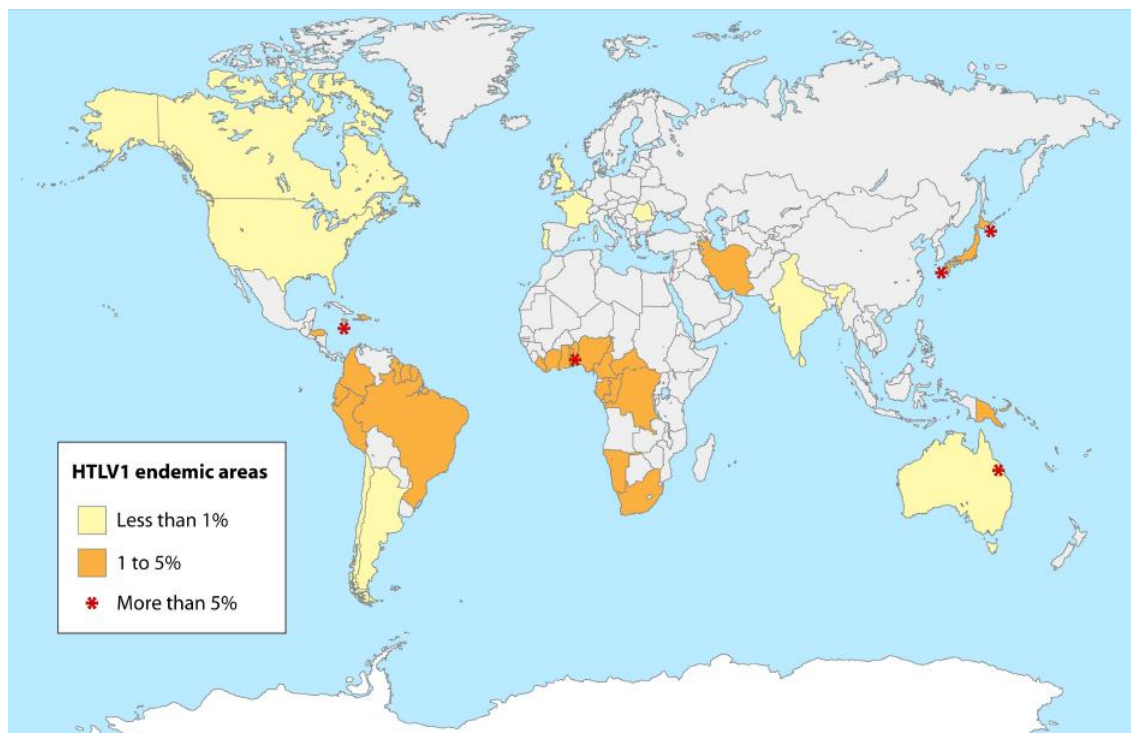


Abbildung 5: Weltweite Prävalenz von HTLV-1. Gebiete mit besonders hoher Prävalenz sind mit einem Stern gekennzeichnet. Aus Goncalves *et al.* [13], basierend auf Proietti *et al.* [48].

3.2.2 Übertragung und Tropismus

HTLV-1 ist als freies Virus kaum infektiös, eine Übertragung findet hauptsächlich durch Zell-Zell-Kontakt statt. Das Virus besitzt *in vivo* einen eingeschränkten Tropismus, es werden hauptsächlich T-, seltener auch B-Zellen infiziert [25, 39]. Das Primärziel sind CD4+-Zellen [49]. Daneben sind auch Infektionen von CD8+-Zellen [14], Monocyten [25], Makrophagen [41], dendritischen Zellen [24, 30] und endothelialen Zellen berichtet worden [52].

Im Gegensatz dazu ist es *in vitro* möglich, zahlreiche Zelllinien mit HTLV-1 zu infizieren. Dies legt nahe, dass ein weit verbreitetes Molekül als Rezeptor fungiert. Allerdings konnte bisher im Gegensatz zu HIV für HTLV-1 trotz jahrelanger Forschung kein Rezeptor identifiziert werden, der definitiv für die Übertragung verantwortlich ist. Trejo und Ratner hatten bereits 1999 beschrieben, dass der HTLV-1-Rezeptor ein stark verbreitetes Protein ist, das sich vermutlich auf

Einleitung

der Zelloberfläche befindet, da es sensitiv gegenüber Trypsin ist [58]. Außerdem wird dessen Expression während der Immunaktivierung von T-Zellen hochreguliert [33, 41]. Nach derzeitigem Stand der Forschung sind am Eintritt der Viruspartikel in die Zelle drei Moleküle beteiligt: GLUT-1 [8, 17, 18, 32], Neuropilin-1 (NRP-1) [11, 18] und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) [19, 20, 45]. Die genauen Funktionen der einzelnen Moleküle bei der Infektion sind jedoch nicht bekannt, es existieren bisher nur Theorie-basierte Modelle zum Ablauf der Infektion.

Ein Beispiel dafür ist das Modell von Jones *et al.* [23], bei dem die einzelnen Moleküle mit einander wechselwirken, um den Eintritt des HTLV-1-Partikels in die Zielzelle zu ermöglichen (s. Abb. 6).

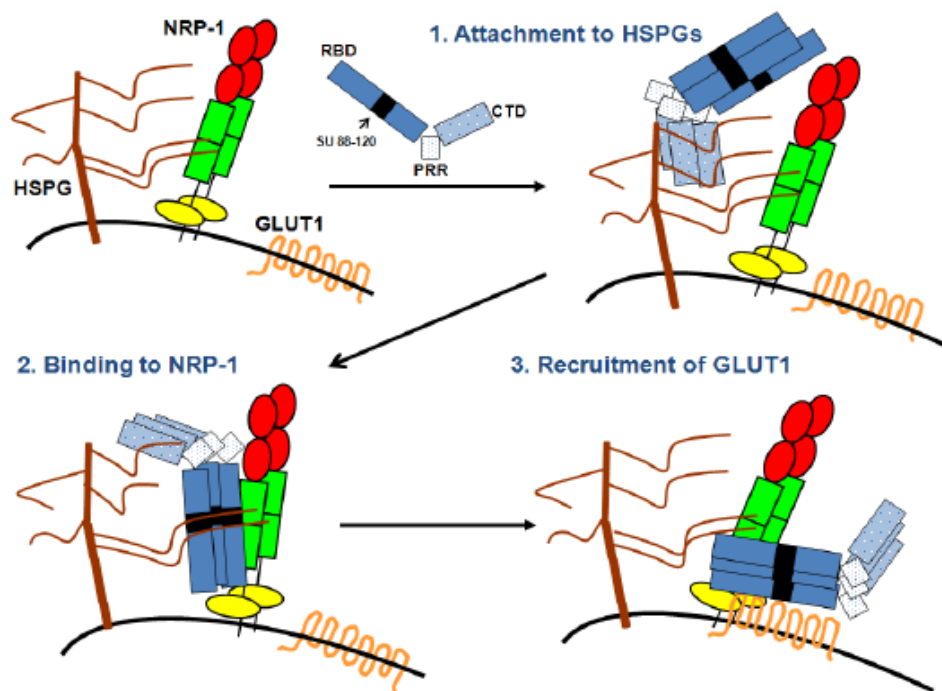


Abbildung 6: Modell zur Wechselwirkung der drei Rezeptormoleküle HSPG, NRP-1 und GLUT-1. Nach Anheftung des Oberflächen-Proteins (blau; RBD = *receptor binding domain*, PRR = *proline rich region*, CTD = *c-terminal domain*) des Viruspartikels an das HSPG der Zielzelle erfolgt die Anbindung an NRP-1. Die dadurch hervorgerufenen konformationellen Änderungen ermöglichen die Anbindung an GLUT-1, woraufhin die Fusion des Partikels mit der Zielzelle stattfinden kann. Aus Jones *et al.* [23].

Im ersten Schritt erfolgt die Anheftung des Partikels an HSPG über die C-terminale Domäne des SU-Proteins, wodurch die Viruspartikel auf der Oberfläche der Zelle konzentriert werden. Daraufhin erfolgt die Anbindung an NRP-1, das sowohl mit HSPG als auch mit dem SU-Protein wechselwirkt. Durch die Bindung des SU-Proteins an die beiden Rezeptoren erfolgt eine

Einleitung

Konformationsänderung des SU-Proteins, sodass die GLUT-1 bindende Domäne freigesetzt wird und somit die Anbindung an GLUT-1 erfolgen kann. Daraufhin kann die Fusion des Viruspartikels mit der Zielzelle stattfinden.

Zusätzlich zu der Vermutung einer ubiquitären Verbreitung des Rezeptormoleküls auf Zelllinien existiert die Tatsache, dass bereits viele Transporterproteine als Rezeptoren für andere Retroviren wie MLV identifiziert wurden [43]. Diese beiden Beobachtungen führten in Konklusion zur Untersuchung von Manel *et al.* [32]. Hierbei wurde festgestellt, dass eine Anbindung von HTLV-1-Env an den Rezeptor zu einer verminderten Ansäuerung des Mediums und verminderter Aufnahme von Glucose sowie einer geringeren Produktion von extrazellulärem Lactat führt, also Störungen des Zellmetabolismus hervorruft. Nach Untersuchung verschiedener am Lactat- und Glucosetransport beteiligter Moleküle konnte der ubiquitär verbreitete Glucosetransporter GLUT-1 als Rezeptor für HTLV-1 identifiziert werden. Diese Beobachtung wurde von anderen Forschergruppen bestätigt [8, 17, 18]. GLUT-1 gehört zur Familie der Glucosetransporter, von denen verschiedene Formen existieren [6]. Es ist ein multi-Membran-spannendes Protein, das zwölf Transmembran-Domänen sowie sechs extrazelluläre Schleifen (ECL) besitzt [15] (s. Abb. 7). Manel *et al.* beschrieben weiterhin, dass lediglich die ECL 1, 5 und 6 bei der Infektion mit HTLV-1 eine Funktion übernehmen [17, 34]. Die ECL 6 ist dabei ausreichend für eine Anbindung der Viren, für eine Infektion werden jedoch zusätzlich die anderen beiden ECLs benötigt.

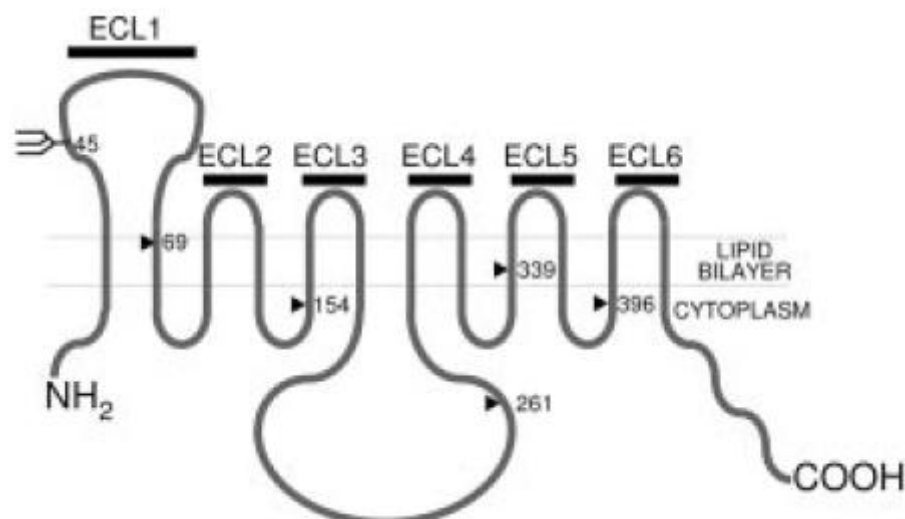


Abbildung 7: Schematische Darstellung von GLUT-1. Aus Manel *et al.* [34], basierend auf Hruz und Mueckler [15].

Einleitung

HSPG bestehen aus einem Kernprotein, an das kovalent saure Polysaccharide mit einer Vielzahl an Sulfat-Resten gebunden sind. Diese ermöglichen es durch ihre negative Ladung verschiedene Moleküle, beispielsweise Wachstumsfaktoren und Cytokine, an die Zelle anzubinden [1, 27, 29]. In der viralen Infektion spielen sie also vermutlich eher eine unspezifische Rolle, indem sie die Partikel an die Zelloberfläche binden und so spezifische Wechselwirkungen mit den jeweiligen Rezeptoren ermöglichen [12, 27]. Die Untersuchungen von Jones *et al.* [19] und Pinon *et al.* [45] ergaben, dass eine erhöhte Expression von HSPG auf der Zelloberfläche zu einer verstärkten Anbindung vom SU-Protein gp46 an die Oberfläche von Zellen führt, die den HTLV-1-Rezeptor exprimieren. Daher wird vermutet, dass durch HSPG die Anbindung von gp46 an NRP-1 gefördert und stabilisiert wird, was zu einer Erhöhung der Infektionseffizienz führt [12]. Jones *et al.* wiesen in einer weiteren Untersuchung erneut nach, dass HSPG als Rezeptor für HTLV-1 fungiert [20].

NRP-1 ist ein Membran-spannendes Glykoprotein, das bei Primärzellen hauptsächlich auf T-Zellen, endothelialen und dendritischen Zellen, jedoch auf nahezu allen bekannten Zelllinien exprimiert wird [12]. Ghez *et al.* ordneten dem Molekül erstmals eine Beteiligung an der Infektion durch HTLV-1 zu [11], was durch Jin *et al.* bestätigt wurde [18]. Da NRP-1 im Gegensatz zu GLUT-1 und HSPG zwar *in vitro*, jedoch nicht *in vivo* ubiquitär exprimiert wird, wird vermutet, dass es für den eingeschränkten *in vivo*-Tropismus verantwortlich ist [12].

Für eine zellfreie Infektion werden geeignete Zelllinien benötigt. Viele infizierbare Zelllinien wie Jurkat-Zellen sind jedoch Suspensionszellen [38]. Dies macht ihre Verwendung für Infektionsversuche weniger günstig, da die entsprechende Durchführung die Ergebnisse so beeinflussen kann, dass diese nicht optimal sind. Im Gegensatz dazu wurden die adhärenenten Zelllinien HOS [7] und ARPE-19 [28] ebenfalls als mit HTLV-1 infizierbar beschrieben. Bei HOS-Zellen ist eine produktive Infektion bei längerer Kultivierung möglich [7].

4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob durch die Überexpression des putativen HTLV-1-Rezeptors die zellfreie Infektion durch HTLV-1 in ausgewählten Zelllinien verstärkt wird.

Eine solche Auswirkung der Überexpression des Rezeptors wurde beispielsweise bereits für HIV-1 [4] sowie GALV (*gibbon ape leukemia virus*) und MLV [56] berichtet. Zudem wurde von Manel *et al.* [32] beschrieben, dass die Überexpression von GLUT-1 zu einer vermehrten Anbindung des HTLV-1-Env-Proteins führt. Da die Transmission von HTLV-1 meist durch Zell-assoziiertes Virus per Co-Kultivierung erfolgt, was eine spätere Detektion von neuen Integrations- und Replikationsereignissen erschwert, wäre die Etablierung eines zellfreien Infektionssystems für *in vitro*-Versuche wünschenswert.

Für die Auswertung der Infektionsversuche sollen zunächst Expressionskonstrukte für bestimmte HTLV-1-Proteine als Positivkontrollen hergestellt werden. Es sollen die gruppenspezifischen p19 MA- und p24 CA-Proteine aus dem HTLV-1-Genom in ein Expressionsplasmid mit CMV-Promoter kloniert werden. Mittels einer angefügten artifiziellen Sequenz, dem V5-Tag, soll die Expression nach Transfektion in HEK-293T-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann mit der Detektion durch ein HTLV-1 spezifisches Serum verglichen und die beiden Proteine im Lysat von infizierten Zellen somit identifiziert werden.

Um eine produktive Infektion mit HTLV-1 zu demonstrieren, können neu gebildete virale Proteine mit spezifischen Antisera oder monoklonalen Antikörpern durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Für den Nachweis des HTLV-1-Tax-Proteins, das früh im Replikationszyklus gebildet wird, soll aus dem Überstand einer vom NIH erhaltenen Hybridomazelllinie ein monoklonaler α -Tax-Antikörper aufgereinigt werden. Um eine Infektion mit freien HTLV-1-Viren durchzuführen, sollen möglichst hochtitrige infektiöse Überstände aus der Kultivierung von chronisch infizierten oder nach Transfektion mit einem HTLV-1-Vollängen-Molekularklon transient Viren produzierenden Zellen erzeugt werden.

Für die Infektionsversuche werden geeignete Zelllinien gewählt und in diesen durch Transfektion mit zur Verfügung gestellten GLUT-1-codierenden Plasmiden eine transiente Überexpression erreicht. Nach Infektion von nativen oder GLUT-1-überexprimierenden Zellen mit aufkonzentrierten HTLV-1-Viren soll der erzielte Grad der Infektion anhand der quantitativen Bestimmung der integrierten Proviren sowie anhand der Produktion von neuen Viruspartikeln verglichen werden.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Beckman Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Beckman OptimaL-100K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
CO2-Inkubator HeraCell 150	Thermo Scientific, Logan, USA
C24 Inkubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
DNA Engine Thermocycler	BioRad, Hercules, USA
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Gene Pulser XCell + Shock Pod	BioRad, Hercules, USA
GelDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
Hybridisierungsofen Minidizer HB-500	UVP, Upland, USA
Inkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inverses Lichtmikroskop ID03	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mini-Protean 3 Electrophoresis	BioRad, Hercules, California, USA
Multifuge 1S-R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Odyssey	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Mx3005P Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	BioRad, Hercules, California, USA

Materialien

Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, California, USA
UV-Transilluminator TFX-20.M	Vilber Lourmat, Paris, Frankreich

5.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
30% Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (w/v) 10% (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BigDye 3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
BSA 100x	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Coomassie Blue R-250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Cyro-SFM	Provitro GmbH, Berlin, Deutschland
dNTPs	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
GelRed	Biotium, Hayward, USA
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin, TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland bzw. Fermentas International Inc., Burlington, Canada

Materialien

Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Logan, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay-Kit	Thermo Scientific, Logan, USA
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Q-Solution (5x)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Logan, USA
Taqman Universal Mastermix 2x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypan-Blau	Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
100xPenicillin/Streptomycin	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

5.1.3 Enzyme und zugehörige Puffer

Tabelle 4: Verwendete Enzyme und die dazugehörigen Puffer

Enzym	Hersteller
Amplitaq Gold	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
BamHI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
BglII	New England Biolabs Inc., Beverly, USA

Materialien

EcoRI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
HindIII	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Hot Star Taq	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
NcoI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
NotI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
PstI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
10x-Puffer für PCR	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
10x-Puffer für PCR	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
10x Puffer für Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
PvuI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
T4-DNA-Ligase	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
10x-T4-DNA-Ligase-Puffer	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
0,05 % Trypsin (pH 7,2), 0,02 % EDTA in PBS	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
XbaI	New England Biolabs Inc., Beverly, USA

5.1.4 Marker und Standards

Tabelle 5: Marker und Standards

Marker/Standard	Hersteller
Albumin Standard	Thermo Scientific, Logan, USA
Generuler 100bp Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Generuler 1kb Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Generuler 1kb Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Logan, USA

5.1.5 Puffer und Medien

Tabelle 6: Puffer und Medien und deren Zusammensetzung bzw. Angabe des Herstellers

Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller
Probenpuffer	
6x-DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0,4 % Orange-G (w/v) (Sigma) in H ₂ O
4x-Laemmli-Probenpuffer	200mM Tris-CL, 8% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 40% (v/v) Glycerol, 400mM DTT
Puffer und Medien für die Zellkultur	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
7,5% Natrium-Bicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
100mM Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
RPMI1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Zelllysis-Puffer	1 % Triton-X 100; 20mM Tris (pH 7,7); 150mM NaCl
Medien	
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Bacto Hefe Extrakt; 1% NaCl, pH 7,5
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar-Agar
SOC-Medium	20g/l Bacto-Tryptone, 5g/l Bacto-Yeast-Extract, 4g/l Glucose, 2,5mM KCl, 10mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , pH 7,0
SDS-PAGE	
Sammelgelpuffer	BioRad, Hercules, California, USA
Trenngelpuffer	BioRad, Hercules, California, USA
Laufpuffer	BioRad, Hercules, California, USA

Materialien

Western Blot

Transferpuffer	BioRad, Hercules, California, USA
Weitere Puffer	
Isoton R II Diluent	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
1M-HEPES-Puffer	Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
2%-Milk-PBS	2% Milchpulver in PBS
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	137mM Natriumchlorid; 2,7mM Kaliumchlorid; 8,8mM Dinatriumhydrogenphosphat; 0,7mM Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7,2
1x-TAE	40mM Tris, 1mM EDTA, 20mM Acetat, pH 8,0

5.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Antikörper	Ursprungsspezies	Hersteller
α -GLUT-1 IgG	Kaninchen	Abcam, Cambridge, Großbritannien
α -HTLV-1 IgG	Ziege	Zur Verfügung gestellt von AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Antiserum to HTLV-1 von Drs. P. Szecsi, H. Halgreen, and J. Tang)
α -Mouse-HRP IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -Human-HRP IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -Env 0.5 Alpha Cell Supernate IgG	Maus-Hybridoma	Zur Verfügung gestellt von AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: 0.5 α Monoclonal Antibody von Dr. Samuel Broder und Dr. Hiroaki Mitsuya
α -V5 IgG	Maus	AbD Serotec, MorphoSys AG, Martinsried, Deutschland
α -Goat-HRP IgG	Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark

Materialien

α -Rabbit-HRP IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -V5-HRP IgG	Maus	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
α -GFP IgG	Ziege	Rockland Immunochemicals Inc. Antibodies & Assays, Gilbertsville, USA
α -Tubulin IgG	Kaninchen	Epitomics Inc., Burlingame, USA

5.1.7 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien mit Angabe des Ursprungsgewebes und des zur Kultivierung verwendeten Nährmediums

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Verwendetes Medium
HEK-293T	Humanes embryonales Nierenkarzinom	DMEM + 10% FKS + 2mM L-Glutamin + 1x Penicillin/Streptomycin
ARPE-19	Humanes pigmentiertes Retinaepithel ATCC: CRL-2302	DMEM + 10% FKS + 2mM L-Glutamin + 0,5mM Natrium-Pyruvat + 15mM HEPES + 1,2g/l Natrium-Bicarbonat + 1x Penicillin/Streptomycin
HOS	Humanes Osteosarkom ATCC: CRL-1543	DMEM + 10% FKS + 2mM L-Glutamin + 1mM Natrium-Pyruvat + 1,5g/l Natrium-Bicarbonat + 1x Penicillin/Streptomycin
MT-2	Humane T-Lymphocyten chronisch infiziert mit HTLV-1	RPMI1640 + 10% FKS + 2mM L-Glutamin + 1x Penicillin/Streptomycin
Hybridoma	Zur Verfügung gestellt von AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: (HTLV-1 Tax Hybridoma) von Dr. Beatrice Langton	RPMI1640 + 10% FKS + 2mM L-Glutamin + 1x Penicillin/Streptomycin + 50 μ M β -Mercaptoethanol

5.1.8 Materialien für Zellkultur

Tabelle 9: Materialien für Zellkultur

Arbeitsmittel	Hersteller
6-Well-Platten	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
24-Well-Platten	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
100mm-Platten	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Filter für Spritzen, 0,45µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kryoröhrchen, 2ml	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zählkammer Neubauer Improved	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spritzen, Injekt 20ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen UZ, Cellulose Nitrate Tubes	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Zellkulturflaschen, 75cm ²	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen, 151cm ²	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

5.1.9 Bakterienstämme

Tabelle 10: Bakterienstämme

Stamm	Bezugsquelle
<i>E.coli</i> Top10	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>E.coli</i> STBL3	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<i>E.coli</i> MDS42 [47]	Scarab Genomics, Madison, USA

5.1.10 Plasmide

Tabelle 11: Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller
pCR4-TOPO TA	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
pTH	Zur Verfügung gestellt von Tomas Hanke, University of Oxford, Oxford, UK

5.1.11 Kits

Tabelle 12: Kits

Kits	Bezugsquelle
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
HS-Mg RT Activity Kit	Cavidi, Uppsala, Schweden
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

5.1.12 Primer und Sonden

Tabelle 13: Primer und Sonden

Primer	Sequenz
SK43-For	CGGATACCCAGTCTACGTGT
SK44-Rev	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
SK110-For	CCCTACAATCCAACCAGCTCAGG
SK111-Rev	GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT
Tax For	GTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGgcccacttcccagggttggac
Tax Rev	ACGTACGGATCCTAGGTCATCCATgacttctgtttcgcggaaatg
MA p19 For	GTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGggccaaatctttcccgtagc
MA p19 Rev	ACGTACGGATCCTAGGTCATCCATaagaacttggggggccgta
CA p24 For	GTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGccagtcatgaccacaca
CA p24 Rev	ACGTACGGATCCTAGGTCATCCATtaaacctttggtttgtctttggg
TM gp21 For	GTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGgcggtaccggtggcggtct
TM gp21Rev	ACGTACGGATCCTAGGTCATCCATcagggatgactcagggttt
HTLV-1-For	gagactgtgtacaaggcgac
HTLV-1/4- Rev	ggggagBcgagggataagg
TLV TM-Sonde	FAM-CCATCgATggggTCCCAggT-BHQ1
Alb-For	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTT

Materialien

Alb-Rev	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
Alb-Sonde	HEX-TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGA-BHQ1

Alle verwendeten Primer wurden von Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland und alle Realtime-PCR-Sonden von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland synthetisiert.

5.2 Methoden

5.2.1 DNA-Analytik

5.2.1.1 PCR

Zur *in vitro*-Amplifikation von gewünschten DNA-Abschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Dabei werden mit Hilfe von für den Abschnitt spezifischen Primern und einer Polymerase Kopien des DNA-Strangs synthetisiert. Ein Beispielansatz findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Beispielansatz für eine PCR

Komponente	Eingesetztes Volumen [µl]
10x-Puffer	2,5
dNTPs (2,5mM)	2
For-Primer (10µM)	0,5
Rev-Primer (10µM)	0,5
Template-DNA (10 ng/ml)	1
Amplitaq Gold (5 U/µl)	0,125
<i>Aqua bidest</i>	<i>Ad 25</i>

Ein beispielhaftes Temperaturprofil für eine PCR ist in Tabelle 15 dargestellt. Die Annealing-Temperatur wurde an die jeweils verwendeten Primer angepasst.

Tabelle 15: Beispiel für das Temperaturprofil einer PCR

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Reaktionsschritt
95°C	10 Min.	1	Initiale Denaturierung
95°C	30 Sek.	36	Denaturierung
57°C	20 Sek.		Annealing
72°C	1 Min.		Elongation
72°C	5 Min	1	Elongation

Methoden

5.2.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Dabei wird die DNA an eine Silikagel-Säule gebunden und mehrmals gewaschen, um Salze, dNTPs, die Polymerase und die Primer zu entfernen. Die aufgereinigte DNA wurde mit 30µl *Aqua bidest* eluiert.

5.2.1.3 Sequenzierungs-PCR

Für die Sequenzierung von DNA wurde eine Sequenzierungs-DNA nach der Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Dabei sind in dem BigDye-Ansatz (ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems) neben den für die übliche PCR benötigten Reagenzien auch Fluoreszenz-markierte 2',3'-Didesoxynukleotrisphosphate (ddNTPs) enthalten, die für die Sequenzanalyse benötigt werden. Hinzugefügt wurden die Template-DNA und der jeweilige Primer sowie der Polymerase-Puffer (s. Beispielansatz Tabelle 16). Das Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR findet sich in Tabelle 17, wobei die Annealing-Temperatur je nach verwendetem Primer variiert wurde. Die Sequenzanalyse wurde im Sequenzierungslabor des Robert Koch-Instituts durchgeführt.

Tabelle 16: Beispielansatz für eine Sequenzierungs-PCR

Komponente	Eingesetztes Volumen [µl]
ABI-Puffer	1
BigDye 3.1	1
Sequenzierungs-Primer (10µM)	0,5
Template-DNA (150-300ng)	0,5-5
<i>Aqua bidest</i>	<i>Ad 10</i>

Tabelle 17: Beispielhaftes Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Reaktionsschritt
96°C	2 Min.	1	Initiale Denaturierung
96°C	10 Sek.	24	Denaturierung
57°C	10 Sek.		Annealing
60°C	4 Min.		Elongation

5.2.1.4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung, ob das richtige Plasmid in *E. coli* transformiert wurde, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Im Gegensatz zur normalen PCR werden hier als DNA-Template Bakterienzellen eingesetzt. Dafür wurde eine einzelne Kolonie von der Nährbodenplatte gepickt, in 10µl *Aqua bidest* suspendiert und davon 5µl in der PCR eingesetzt. In dem Denaturierungs-Schritt vor dem Ablauf der eigentlichen PCR werden die Zellen aufgeschlossen und so das DNA-Template freigesetzt. Das Temperaturprofil einer Kolonie-PCR ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Beispiel für das Temperaturprofil einer Kolonie-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Reaktionsschritt
95°C	10 Min.	1	Initiale Denaturierung
94°C	30 Sek.	35	Denaturierung
50°C	20 Sek.		Annealing
72°C	1 Min.		Elongation
72°C	5 Min.	1	Finale Elongation

5.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Proben, um die Längen der enthaltenen Fragmente zu bestimmen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei werden die DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Dafür wurden 0,8g bis 1,5g Agarose eingewogen, mit 1x-TAE-Puffer auf 100g aufgefüllt, in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung erhitzt, mit 3µl GelRed versetzt und gegossen. Die Proben wurden mit 6x-DNA-Ladepuffer versehen. Die Elektrophorese erfolgte bei 85V bis 95V. Als Marker wurde, je nach erwarteter Größe der Banden, „Generuler 1kb Ladder“, „Generuler 1kb Ladder Plus“ oder „Generuler 100bp Ladder Plus“ (Fermentas International Inc., Burlington, Canada) verwendet.

5.2.1.6 Duplex-Realtime-PCR

Die Realtime-PCR (qRT) ermöglicht die zeitgleiche Amplifikation und Detektion eines gewünschten DNA-Abschnitts. Wie bei einer üblichen PCR sind im Reaktionsansatz Primer enthalten, die eine spezifische Amplifikation des gewünschten Abschnitts ermöglichen. Zusätzlich ist eine sequenzspezifische Sonde enthalten, an die ein Fluoreszenz-Farbstoff und ein Quencher gekoppelt sind. Der Quencher unterdrückt dabei die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Wäh-

Methoden

rend jedes PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz des Farbstoffs gemessen, die durch Hybridisierung der Sonde an den für sie spezifischen DNA-Abschnitt und die anschließende Hydrolyse zustande kommt: Durch Abbau der Sonde vom 5'-Ende an durch die Polymerase während der Amplifikation des Gens entfernen sich Reporterfarbstoff und Quencher räumlich voneinander, sodass die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt wird und gemessen werden kann. Die Stärke des generierten Fluoreszenzsignals korreliert damit mit der Menge der entstandenen DNA und somit auch mit der ursprünglich eingesetzten Kopienzahl. Der ermittelte c_t -Wert (*cycle threshold*) entspricht dem Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal der untersuchten Probe erstmals das Hintergrundsignal übertrifft.

Bei einer Duplex-PCR findet die Detektion von zwei Gensequenzen parallel in einem Ansatz statt. Durch Mitführen eines Albumin-spezifischen Ansatzes, der ebenfalls Primer und eine Sonde umfasst, kann, neben der Detektion beispielsweise einer Provirus-Integration, gleichzeitig kontrolliert werden, ob die PCR grundsätzlich erfolgreich war. Die Albumin-PCR dient also als interne Positivkontrolle.

Der Ansatz für eine qRT setzte sich nach Tabelle 19 zusammen. Hierbei wurde der jeweilige an die Sonde gekoppelte Fluoreszenz-Farbstoff für die Quantifizierung der entstehenden DNA verwendet. Die qRT wurde nach dem Temperaturprofil in Tabelle 20 gefahren.

Tabelle 19: Beispielansatz für eine qRT

Komponente	Eingesetztes Volumen [µl]
Taqman Universal Mastermix 2x	12,5
Primer1 For (10µM)	1
Primer1 Rev (10µM)	1
Sonde1 (10µM)	0,5
Primer2 For (10µM)	1
Primer2 Rev (10µM)	1
Sonde2 (10µM)	0,5
Template-DNA (25-400ng)	5
H ₂ O	<i>Ad 25</i>

Tabelle 20: Beispielhaftes Temperaturprofil für eine qRT

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Reaktionsschritt
95°C	10 Min.	1	Initiale Denaturierung
95°C	30 Sek.	50	Denaturierung
60°C	1 Min.		Annealing und Elongation

5.2.1.7 Eukaryotische Expression von modifizierten Proteinen

Um Proteine mit Hilfe eines kurzen, sequenzspezifischen Tags nach der eigentlichen Proteinsequenz nachweisen zu können, erfolgte das Anhängen eines V5-Tags, der die Aminosäuresequenz GKPIPPLLGLDST besitzt. Dazu wurden die gewünschten Gene mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in den pTH-Vektor ligiert, der durch den CMV-Promotor eine in den meisten Zellen starke Expression der Proteine erlaubt und bereits die V5-Sequenz besitzt. Zum Einfügen eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde eine Ligation-Reaktion nach dem Ansatz in Tabelle 21 durchgeführt. Die eingesetzte Masse des Fragments ergibt sich dabei durch die Formel $\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 5 \cdot \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \cdot \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$. Die Reaktion wurde durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur ermöglicht.

Tabelle 21: Ansatz für eine Ligation-Reaktion. Das eingesetzte Insert-Volumen ergibt sich aus dessen Konzentration und der oben angegebenen Formel.

Komponente	Eingesetztes Volumen [µl]
T4-Ligase	1
Ligase-Puffer	1
Vektor	1
Insert	*
H ₂ O	Ad 10

Zur Plasmidgewinnung erfolgte eine Transformation in elektrisch kompetente Top10-Zellen mit anschließender DNA-Aufreinigung mit dem Endo Free Plasmid Mini-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

5.2.1.8 Transformation

Als Transformation wird die Einbringung von DNA in prokaryontische Zellen bezeichnet. Dadurch wird die Vermehrung von Plasmid-DNA in den Zellen ermöglicht, die anschließend isoliert werden kann. Hier wurden zwei Arten der Transformation angewendet, bei denen auf unterschiedliche Weise die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert wird und so die Einbringung der DNA erfolgen kann.

Die Transformation von elektrisch kompetenten Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Von der zu transformierenden DNA wurden 1 bis 10ng DNA in die Zellsuspension pipettiert, durch Invertieren mit dieser vermischt und mit Hilfe des Gene Pulser XCell + Shock Pod (BioRad, Hercules, USA) durch einen Elektroschock bei 2500V, 25 μ F und 200 Ω in die Zellen eingebracht.

Für die Transformation mit chemisch kompetenten Zellen wurden bis zu 6,8ng der DNA eingesetzt. Nach dem Vermischen der DNA mit der Zellsuspension erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis mit anschließendem Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Die Zellen wurden daraufhin sofort auf Eis transferiert.

Nach der Transformation erfolgte in beiden Fällen eine sofortige Überführung der Zellen in SOC-Medium. Nach einer einstündigen Inkubation bei 200rpm und 30°C bzw. 37°C, abhängig von der transformierten DNA, wurden die Zellen auf Selektivmedium-Platten ausplattiert.

5.2.1.9 Plasmid-DNA-Isolation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die transformierten Zellen entweder in einer Übernachtskultur (Mini-Präparation) oder in einer Übertagkultur mit anschließender Übernachtskultur im großen Maßstab (Maxi-Präparation) in Selektivmedium kultiviert. Die Isolation der Plasmide aus den Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits bzw. Endo-free Plasmid Maxi Kits (beide Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Zellen mit einem Lysepuffer aufgeschlossen, die Plasmid-DNA an eine Silikagel-Säule gebunden, mehrmals gewaschen und mit einem geeignetem Volumen *Aqua bidest* eluiert.

Methoden

5.2.1.10 Restriktionsverdau

Tabelle 22: Für den Restriktionsverdau verwendete Enzyme und Puffer

Enzym	Puffer
BamHI	3/2/BamHI
BglII	3
HindIII	2
NcoI	3
NotI	3
PstI	3
PvuI	3
XbaI	4
EcoRI	Eco-RI

Zur Überprüfung von DNA wurde ein Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen durchgeführt. Der Restriktions-Ansatz (s. Tabelle 23) wurde für 2h bei 37°C inkubiert und die entstandenen Fragmente mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Tabelle 23: Beispielansatz für einen Restriktionsverdau

Komponente	Eingesetztes Volumen [µl]
Enzym	0,5
10x Puffer	2
100x BSA	0,2
Template-DNA	0,5-1µg
H ₂ O	Ad 20

5.2.1.11 Gelextraktion

Zur Extraktion bestimmter DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel wurden die entsprechenden Gelstücke mit einem sterilen Skalpell auf dem UV-Transilluminator geschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction-Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers behandelt. Dabei wird das Agarose-Gel mit Hilfe eines Puffers aufgelöst, die DNA an eine Silikagel-Säule gebunden und mehrmals gewaschen. Die DNA wurde mit 30µl *Aqua bidest* eluiert.

5.2.2 Zellkultur

5.2.2.1 Passagieren, Aussäen

Die verwendeten Zelllinien wurden in T75- bzw. T150-Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 10 bzw. 12ml PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA vorsichtig von der Kulturflasche gelöst. Je nach Zelldichte wurden ein Teil der Zellen in Kultur weitergeführt und der Rest verworfen.

Für das Aussäen von Zellen wurden diese 7 Minuten bei 300g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einem passenden Volumen Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe des Coulter-Counters (Beckman Coulter, Fullerton, USA) oder nach Färbung mit Trypan-Blau mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die Zellen wurden entsprechend Tabelle 24 ausgesät.

Tabelle 24: Ausgesäte Zellen; angegeben sind die Zeiten vor dem weiteren Gebrauch

Zellart	Kulturgefäß	Zeit	Ausgesäte Zellzahl
293T	6-Well	24h	$4 \cdot 10^5$
	6-Well	72h	$5 \cdot 10^4$
	100mm-Schale	24h	$2,4 \cdot 10^6$
ARPE	6-Well	72h	$3,8 \cdot 10^4$
	24-Well	24h	$6,7 \cdot 10^3$
HOS	6-Well	24h	$1 \cdot 10^5$
	24-Well	24h	$1 \cdot 10^4$

5.2.2.2 Transfektion

Das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Dadurch wird die Expression der transfizierten DNA durch die Zelle ermöglicht. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit dem PolyFect Transfection Reagent-Kit bzw. dem Effectene Transfection Reagent-Kit (beide Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers in 6-Well- bzw. 24-Well-Platten.

Effectene ist ein Transfektions-Reagenz auf Basis der Lipofektion, also der Einbringung von DNA mittels Liposomen. Die DNA wird dabei mit Hilfe des Enhancers kondensiert und so die

Methoden

Transfektionseffizienz erhöht. Anschließend wird sie durch Zugabe des Effectene-Reagenzes in kationische Lipid-Vesikel eingeschlossen, die mit der Membran der Zielzelle verschmelzen und so die enthaltene DNA in die Zelle abgeben können. Im Gegensatz dazu bildet Polyfect mit der DNA positiv geladene Komplexe, die über Endocytose in die Zelle gelangen können.

5.2.2.3 Infektion

Die Infektion von Zellen wurde 48h nach Transfektion durchgeführt. Dazu wurde das Medium von den Zellen entfernt und der Infektionsansatz (s. Tabelle 25) dazugegeben.

Tabelle 25: Infektionsansatz für ein Well

Komponente	Volumen [μ l]
Medium	194,8
Virussuspension	5
Polybrene	0,2 (Endkonzentration 2 μ g/ml)

Polybrene ist ein kationisches Polymer, das zur Steigerung der Infektionsrate genutzt wird. Aufgrund seiner positiven Ladung schirmt es die negativen Ladungen von den Oberflächenmolekülen des Viruspartikels gegenüber denen der Zielzelle ab und erleichtert so das Anheften der Viren auf die Oberfläche der Zelle. Nach 2h Inkubation bei 37°C wurde das Gesamtvolumen mit Medium und Polybrene auf 1ml so aufgefüllt, dass die Polybrene-Konzentration weiterhin 2 μ g/ml betrug. Nach 72h Inkubation bei 37°C wurden die Überstände der Zellen abgenommen, 5 Minuten bei 480g zentrifugiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit 1ml PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in 200 μ l PBS aufgenommen und 5 Minuten bei 480g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -20°C gelagert.

5.2.2.4 Immun-Peroxidase-Assay (IPA)

Der Immun-Peroxidase-Assay wurde zur Detektion von gebildeten viralen Proteinen benutzt. Dazu wurden die mit dem Volllängen-Moleklarklon transfizierten Zellen mit eiskaltem Methanol bei -20°C über Nacht fixiert. Das Methanol wurde entfernt, die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit Blockierungspuffer (2% Milchpulver in PBS) blockiert. Der Blockierungspuffer wurde verworfen und 400 μ l des nach Tabelle 26 in Blockierungspuffer verdünnten primären Antikörpers pro Well pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und 1ml

Methoden

des entsprechenden, nach Tabelle 26 in Blockierungspuffer verdünnten sekundären, Peroxidasegekoppelten Antikörpers pro Well pipettiert. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37°C und dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Zugabe von 1,5ml Substrat (19ml Na-Acetat 20mM, pH 5,0; 0,4mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol gelöst in 1ml DMF; 10µl H₂O₂) pro Well. Bei der Umsetzung des Substrats durch die Peroxidase entsteht ein unlöslicher roter Farbstoff, der in den Zellen verbleibt und unter dem Mikroskop beobachtet werden kann. Dieser zeigt die erfolgreiche Transfektion und somit die Expression des transfizierten Plasmids durch die Zellen an.

Tabelle 26: Verdünnung der beim IPA verwendeten Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
α-HTLV-1 IgG	1:400/1:200	α-Goat-HRP IgG	1:2.000/1:1.000
α-V5 IgG	1:400/1:200	α-Mouse-HRP IgG	1:1.000
α-Env 0.5 Alpha Cell Supernate IgG	1:400	α-Mouse-HRP IgG	1:1.000

5.2.2.5 DNA-Isolation aus Zellen

Um die DNA von Zellen untersuchen zu können, wurde diese mit Hilfe des QIAamp Blood Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurden die Zellen lysiert, die DNA an eine Silika-Membran gebunden, mehrmals gewaschen, um Zelltrümmer und andere Bestandteile zu entfernen, und mit 50µl AE-Puffer eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

5.2.3 Protein-Analytik

5.2.3.1 Aufreinigung von Antikörpern

Tabelle 27: Zusammensetzungen der für die Antikörper-Aufreinigung verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Bindepuffer	20mM Natriumphosphat pH 7,0
Elutionspuffer	0,1M Glycinpuffer pH 2,7
Neutralisationspuffer	1M Tris pH 9

Methoden

Die Überstände von Antikörper produzierenden Hybridomazellen wurden gesammelt und in einem mehrstufigen Dialyseverfahren aufgereinigt. Dazu wurde ein Dialyseschlauch (ZelluTrans Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit den Überständen befüllt und im Bindepuffer insgesamt 23h bei 4°C inkubiert, wobei der Puffer mehrmals gewechselt wurde. Die dialysierten Überstände wurden sterilfiltriert. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch eine Affinitätschromatographie über Protein G-Sepharose. Dazu wurde die Säule (HiTrap Protein G HP 5ml, GE Healthcare Life Sciences, Fairfield, USA) mit PBS bzw. Bindepuffer äquilibriert und die Überstände langsam über die Säule laufen gelassen, um eine Anbindung der Antikörper an die Säule zu ermöglichen. Diese wurde daraufhin mit PBS bzw. Bindepuffer gewaschen. Mit Hilfe des Elutionspuffers erfolgte die Elution der Antikörper in Fraktionen von 1ml in Reaktionsgefäße, in die zuvor jeweils 100µl Neutralisationspuffer vorgelegt worden waren. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte bei 4°C.

5.2.3.2 Pierce BCA Protein-Assay

Mit Hilfe des Pierce BCA Protein-Assays lässt sich der Gesamtgehalt an Protein in einer Probe bestimmen. Der Assay basiert auf der Biuret-Reaktion. Durch die in der Probe enthaltenen Proteine findet die Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen in basischem Medium statt. Die dabei entstehenden Cu^{+} -Ionen bilden mit der im Reaktionsansatz enthaltenen Bicinchoninsäure einen Komplex, der eine violette Färbung bedingt. Diese kann kolorimetrisch durch Anregung bei 562nm detektiert werden.

Der Pierce BCA Protein-Assay wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay-Kits (Thermo Scientific, Logan, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Gebrauchslösung durch Mischen von 49 Teilen Reagenz A mit einem Teil Reagenz B hergestellt und 200µl pro Well in eine 96-Well-Platte (BD Falcon, flexible, flat bottom) pipettiert. Pro Well wurden 10µl Probe dazugegeben und der Ansatz bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Microplate Reader Sunrise (Tecan, Männedorf, Schweiz).

5.2.3.3 Ultrazentrifugation

Zur Aufkonzentrierung der Viruspartikel in den Überständen wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt. Diese erfolgte mit der OptimaL100K-Zentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA) mit SW41Ti-Rotor für 1,5h bei 142.000g und 4°C. Zur Vorbereitung wurden die Überstände zur Entfernung von Zelltrümmern für 10 Min. bei 1930g und Raumtemperatur zentrifugiert und damit eine 25%ige Sucrose-Lösung überschichtet. Nach der Ultrazentrifugation wurden

Methoden

die Überstände entfernt und die Viruspellets in 30µl PBS resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Alternativ erfolgte eine Ultrazentrifugation mit dem SW32Ti-Rotor für 4h bei 126.000g und 4°C über einen 20%igen Sucrose-Gradienten. Die Pellets wurden in 150µl 0,05M HEPES/DMEM resuspendiert.

5.2.3.4 Zellyse

Zur Gewinnung der gebildeten viralen Proteine wurden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysis-Puffer behandelt, um die Zellen aufzuschließen. Dieser wurde zuvor mit einer Proteaseinhibitor-Tablette versetzt, um den Abbau der Proteine zu verhindern. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Kulturgefäßes entfernt und im Lysis-Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 2300g wurden die Überstände vorsichtig in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

5.2.3.5 SDS-PAGE

Tabelle 28: Zusammensetzungen der für die SDS-Page verwendeten Puffer

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer	0,5M Tris-HCL, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5M Tris-HCl, pH 8,8
Laufpuffer	25mM Tris; 192mM Glycin, 1g/l Natriumlaurylsulfat; pH 8,3
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue-G250
Entfärber-Lösung	10% Essigsäure, 40% Ethanol
4x-Laemmli-Probenpuffer	200mM Tris-CL, 8% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 40% (v/v) Glycerol, 400mM DTT

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der Auftrennung von Proteinen. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen 4x-Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht, sodass sie denaturiert vorliegen. Die Trennung erfolgt somit ausschließlich aufgrund der Größe der Proteine, da

Methoden

größere Proteine langsamer durch das Gel laufen, da sie stärker durch das Netz des Gels zurückgehalten werden. Der zusätzliche Denaturierungsschritt mit Hilfe des Aufkochens wurde bei Proben, die weiterhin auf GLUT-Proteine untersucht wurden, ausgelassen.

Das Polyacrylamid-Gel setzte sich aus einem 5%-Sammelgel und einem 12%-Trenngel zusammen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100V für 10 Minuten und bei 180V für 48 Minuten. Als Marker wurde „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific, Logan, USA) verwendet. Die Proteine wurden anschließend im Western Blot oder mit Hilfe der Coomassie-Färbung detektiert.

5.2.3.6 Coomassie-Färbung

Durch die Coomassie-Färbung können Proteine unspezifisch angefärbt werden, indem der in der Färbelösung enthaltene Farbstoff Coomassie Blue R-250 mit den basischen Resten der Aminosäuren wechselwirkt und sich an diese anlagert. Zur Anfärbung von zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurde das Gel für 30 Minuten in einer Färbelösung inkubiert, 30 Minuten in Entfärberlösung und anschließend 15 Minuten in Färbelösung geschwenkt. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte in *Aqua bidest*.

5.2.3.7 Western Blot

Tabelle 29: Zusammensetzungen der für den Western Blot verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 20% (v/v) Ethanol, 8,3g/l SDS
Blockierungspuffer	PBS + 5% (w/v) Milchpulver + 0,1% (v/v) Tween 20
Waschpuffer	PBS + 0,1% (v/v) Tween 20

Beim Western Blot werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Gel durch das Anlegen einer Spannung auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dafür wurde das Gel für 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung für 3 Minuten in Ethanol und anschließend für 10 Minuten in Transferpuffer geschwenkt, zwei Filterpapiere (BioRad, Hercules, USA) wurden mit Transferpuffer getränkt. Das Blotting erfolgte bei 15V für 40 Minuten. Die Membran wurde anschließend für 1h bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über

Methoden

Nacht. Die Membran wurde fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen und für 1h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe der Substratlösung (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, Logan, USA). Durch die Umsetzung von Luminol durch die an den sekundären Antikörper gekoppelten Horseradish-Peroxidase (HRP) wird Licht freigesetzt, das durch Schwärzung eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper ergeben sich nach Tabelle 30. Die Verdünnung erfolgte in Blockierungspuffer.

Tabelle 30: Verdünnungsstufen der beim Western Blot eingesetzten Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
α -GLUT-1 IgG	1:400	α -Rabbit-HRP IgG	1:10.000
α -Tubulin IgG	1:30.000	α -Rabbit-HRP IgG	1:20.000
α -GFP IgG	1:5.000	α -Goat-HRP IgG	1:5.000
α -V5-HRP IgG	1:5.000	-	-
α -Tax IgG	1:1000	α -Mouse-HRP IgG	1:10.000
α -HTLV-1 IgG	1:200	α -Goat-HRP IgG	1:5.000

5.2.3.8 Strippen

Tabelle 31: Verwendete Puffer für das Strippen von Western Blots

Puffer	Zusammensetzung
Stripping-Puffer	2% SDS 62,5mM TrisHCl 100mM β -Mercaptoethanol
Waschpuffer	PBS + 0,1% Tween 20

Um Antikörper von einem bereits detektierten und entwickelten Blot zu entfernen, wurde dieser gestrippt. Dazu wurde der Blot bei 60°C für 1h in 100ml Stripping-Puffer inkubiert und anschließend dreimal in Waschpuffer gewaschen. Die erneute Detektion mit einem anderen Antikörper erfolgte nach dem Protokoll beim Western Blot.

5.2.3.9 Cavid-Assay

Der Cavid-Assay ist ein Assay, mit dem die Aktivität der Reversen Transkriptase enzymatisch bestimmt und so auf die Virusexpression rückgeschlossen werden kann. Dafür wurde das „HS-Mg RT Activity Kit“ (Cavidi, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die in der Probe enthaltene Reverse Transkriptase schreibt ein an die Oberfläche der Reaktionsplatte gebundenes RNA-Template in DNA um, sodass ein RNA-DNA-Doppelstrang gebildet wird. Mittels eines Antikörpers, der gegen ein spezielles, bei der DNA-Synthese eingebautes Nukleotid (BrdUTP) gerichtet ist, kann dann die Detektion durch Zugabe des Substrats erfolgen. Dieses wird durch die an den Antikörper gekoppelte Phosphatase umgesetzt, sodass die Auswertung kolorimetrisch erfolgen kann. Die dabei gemessene Aktivität der Phosphatase verhält sich proportional zu der in der Probe enthaltenen RT-Aktivität.

6 Ergebnisse

6.1 Klonierung von Positivkontrollen

Für die folgenden Untersuchungen auf die Bildung von viralen Proteinen sollten Positivkontrollen kloniert werden. Dazu wurden die Gene der drei Proteine p19 MA, p24 CA und des regulatorischen Proteins Tax des HTLV-1-Moleklarklons K30 mittels PCR amplifiziert und durch Restriktion und Ligation in den eukaryontischen CMV-Promotor getriebenen Expressionsvektor pTH eingefügt. Bis auf *tax* konnten hierbei Konstrukte erhalten werden, die laut Sequenzierung der ursprünglichen Sequenz des K30-Moleklarklons entsprechen (Daten nicht gezeigt) (s. Abb. 8).

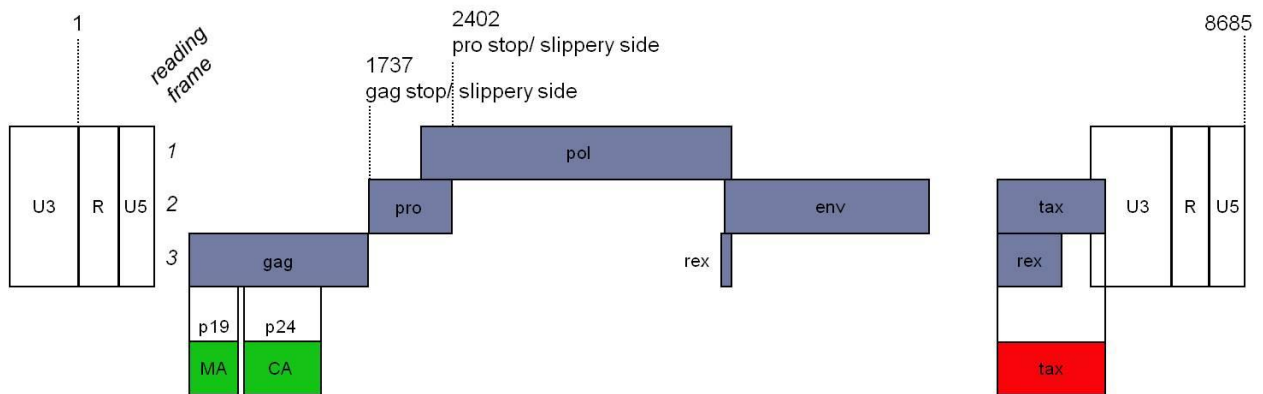


Abbildung 8: Provirales HTLV-1-Genom mit den klonierten Proteinen. Verändert von Kurth und Bannert [26].

Bei der Expression wird nach den eigentlichen Proteinen zusätzlich ein V5-Tag abgelesen, der sich am C-Terminus des translatierten Proteins befindet. Die Positivkontrollen können dadurch einerseits durch HTLV-1-spezifische Antikörper und andererseits mittels eines spezifisch gegen den V5-Tag gerichteten, kommerziellen Antikörper nachgewiesen werden. Dies wurde mit Hilfe eines Immun-Peroxidase-Assays (IPA) überprüft, bei dem nach Detektion mit einem spezifischen Antikörper die Anbindung eines passenden sekundären Antikörpers erfolgt, an den eine Peroxidase gekoppelt ist. Diese kann ein Substrat enzymatisch umsetzen, sodass ein unlöslicher Farbstoff entsteht, der die einzelne Zelle bei Expression des jeweils detektierten Proteins rot färbt. In mit pTH-p19-V5 und pTH-p24-V5 transfizierten HEK-293T-Zellen konnten mittels eines α -V5-Antikörpers einzelne Zellen angefärbt und so die Expression der Proteine nachgewiesen werden (s. Abb. 9 links, Mitte und unten). Die Negativkontrolle in Form von naiven HEK-293T-Zellen wies eine schwache unspezifische Färbung auf, die makroskopisch nicht erkennbar war (s. Abb. 9 links oben). Die Detektion mit einem polyklonalen α -HTLV-1-Serum

Ergebnisse

fürte auch bei den als Negativkontrolle mitgeführten, untransfizierten HEK-293T-Zellen zu einer starken unspezifischen Färbung (s. Abb. 9 rechts oben), die auch makroskopisch deutlich sichtbar war. Die transfizierten Zellen konnten somit in der Färbung mit dem α -HTLV-1-Serum nicht eindeutig als positiv gewertet werden (s. Abb. 9 rechts, Mitte und unten).

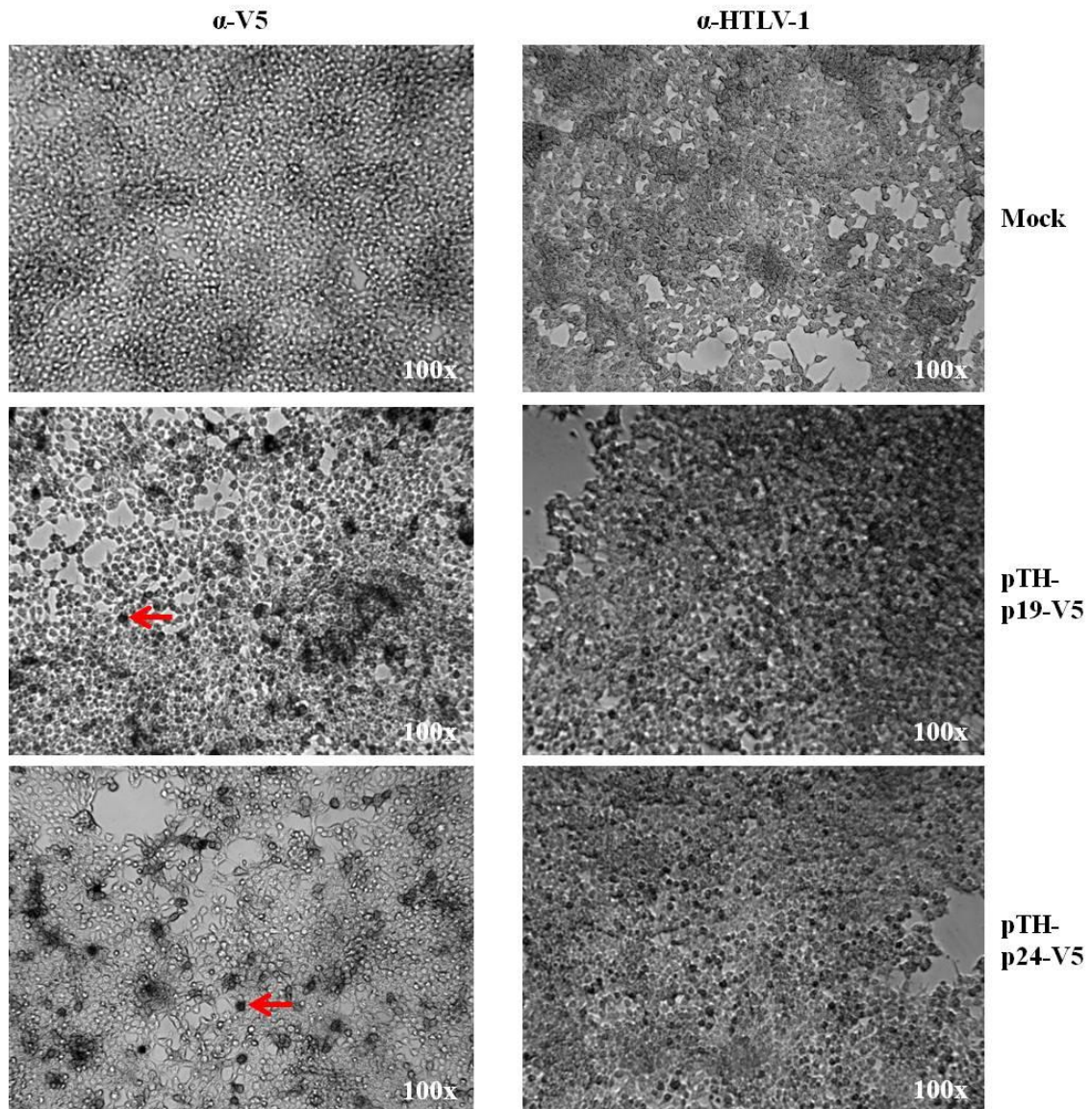


Abbildung 9: Ergebnisse des IPA mit HEK-293T-Zellen, die mit pTH-p19-V5 und pTH-p24-V5 transfiziert wurden. Die Ansätze links wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen den V5-Tag gerichtet ist, detektiert, die Ansätze rechts mit einem polyklonalen α -HTLV-1-Ziegenserum. Unten befindet sich jeweils die mit pTH-p24-V5 transfizierten Zellen, in der Mitte die mit pTH-p19-V5 transfizierten Zellen und oben die Mockkontrolle, bei der die Zellen nicht transfiziert wurden. Bei der Detektion des viralen Proteins mit dem α -V5-Antikörper waren bei den transfizierten Zellen einzelne gefärbte Zellen zu erkennen, was die Expression des Proteins in den jeweiligen Zellen nachweist (links, unten und Mitte, mit Pfeil markiert). Die Negativkontrolle zeigte lediglich eine schwache unspezifische Färbung, die makroskopisch nicht erkennbar war (oben links). Bei der Detektion mit dem polyklonalen Serum war bei der Negativkontrolle eine starke unspezifische Färbung vorhanden, die auch makroskopisch sichtbar war (oben rechts). Der Ansatz mit den transfizierten Zellen war nicht eindeutig positiv (rechts, unten und Mitte).

6.2 Aufreinigung eines monoklonalen α -Tax-Antikörpers

HTLV-1-Tax-Hybridoma-Zellen wurden kultiviert und über einen Zeitraum von einer Woche wurden etwa 460ml Überstände von der Kultur abgenommen. Aus den Überständen erfolgte mittels Protein G-Sepharose die Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers, der gegen das HTLV-1-Protein Tax gerichtet ist. Die Überstände wurden dazu in zwei Teilen geteilt. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen wurde mit Hilfe der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt (s. Abb. 10 und 11). Dabei wurden einzelne Fraktionen der beiden Teile gepoolt (Abb. 10, Elution 9/10 und 15/16; Abb. Elution 13/14 und 15/16/17). Dargestellt sind hier lediglich die relevanten Fraktionen der Antikörperaufreinigung.

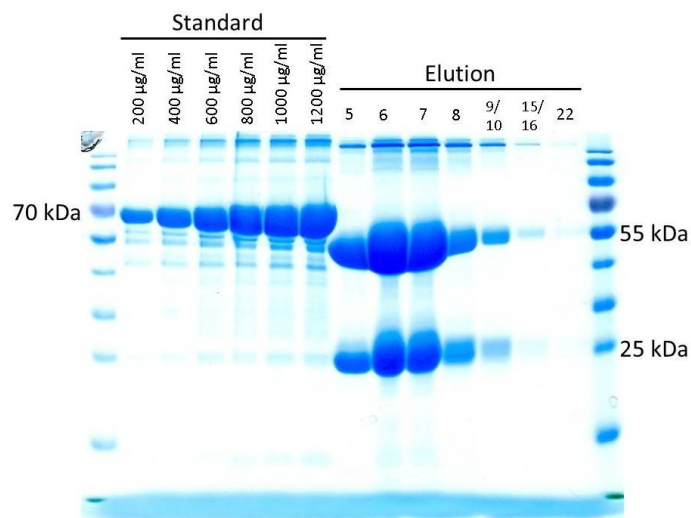


Abbildung 10: SDS-Gel der Antikörperaufreinigung mit Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind in den Spuren 2 bis 7 eine BSA-Verdünnungsreihe als Standard (66kDa) sowie in den Spuren 8 bis 14 Elutionsfraktionen der Antikörperaufreinigung, Teil 1. Erkennbar sind die schweren Ketten des Antikörpers bei 50kDa sowie die leichten Ketten bei 25kDa.

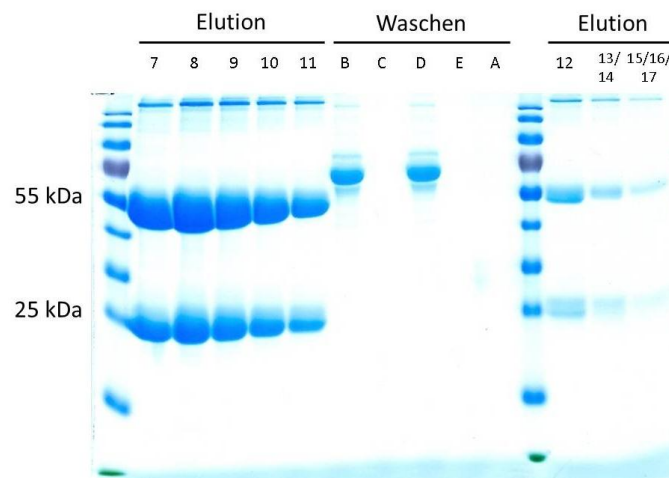


Abbildung 11: SDS-Gel der Antikörperaufreinigung mit Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind in den Spuren 2 bis 6 und 13 bis 15 Elutionsfraktionen der Antikörperaufreinigung, Teil 2, sowie in den Spuren 7 bis 11 Waschfraktionen beider Teile. Erkennbar sind in den Elutionsfraktionen die schweren Ketten des Antikörpers bei 50kDa sowie die leichten Ketten bei 25kDa.

Ergebnisse

Die Bestimmung der optischen Dichte der einzelnen Banden mit Hilfe des Odyssey-Systems ergab, dass eine Quantifizierung mittels des mitgeführten Albumin-Standards nicht möglich ist, da die optischen Dichten der Proben nicht mehr innerhalb der Standardreihe liegen. Anhand der Gelbilder konnte jedoch festgestellt werden, dass neben dem aufgereinigten Antikörper keine weiteren Proteine in den einzelnen Fraktionen vorliegen. Deshalb konnte eine Quantifizierung der Antikörpermenge mit Hilfe des Pierce BCA Protein-Assays erfolgen, mit dem die Gesamtproteinmenge einer Probe bestimmt wird (s. Abb. 12 und 13). Dabei konnten für die Elutionsfraktionen Proteingehalte von bis zu 1573 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt werden.

Pierce BCA Protein Assay der Antikörperaufreinigung, Teil 1

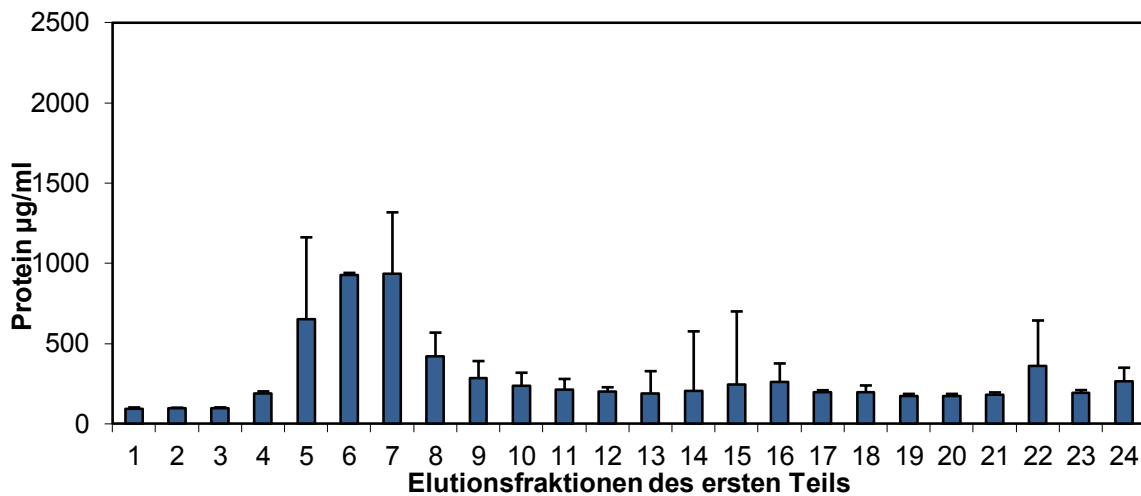


Abbildung 12: Ergebnisse des Pierce BCA Protein Assays der Elutionsfraktionen des ersten Teils der Antikörperaufreinigung. Dargestellt ist die Gesamtproteinmenge in $\mu\text{g/ml}$ der einzelnen Fraktionen.

Pierce BCA Protein Assay der Antikörperaufreinigung, Teil 2

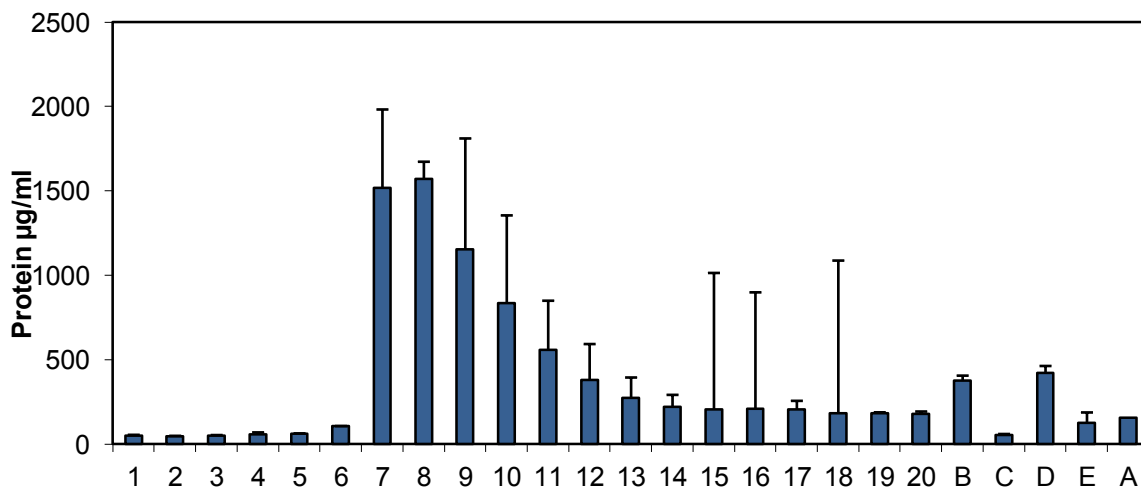


Abbildung 13: Ergebnisse des Pierce BCA Protein Assays der Elutionsfraktionen des ersten Teils sowie der Waschfraktionen beider Teile der Antikörperaufreinigung. Dargestellt ist die Gesamtproteinmenge in $\mu\text{g/ml}$ der einzelnen Fraktionen.

6.3 Herstellung eines infektiösen HTLV-1-Überstands

Durch Transfektion eines HTLV-1-Moleklarklons in HEK-293T-Zellen sollten diese virale Partikel im Überstand produzieren, mit denen die Infektionsversuche durchgeführt werden sollten. Dafür bot sich die Nutzung des vom NIH Aids Reagent Program erhaltenen Moleklarklons K30 an. Dieser wurde in die *E. coli*-Stämme Top10, STBL3 sowie MDS42 transformiert. Die Herstellung einer hochtitrigen infektiösen Virussuspension mittels Transfektion des K30 und Aufkonzentrierung mittels Ultrazentrifugation sollte analog zur Herstellung durch Nutzung des HTLV-1-Moleklarklons ACH sowie von MT-2-Zellen erfolgen.

Zwei der Maxi-Präparationen aus STBL3-Kulturen wurden zur Überprüfung in HEK-293T-Zellen transfiziert und diese 72h (HTLV-1-Moleklarklone) bzw. 48h (klonierte Proteine) inkubiert, um die Expression der eingebrachten Gene zu ermöglichen. Die nach der Inkubation hergestellten Zelllysate wurden auf die Bildung von viralen Proteinen untersucht, was mit Hilfe des Western Blots erfolgte. Bei der Detektion mit dem aufgereinigten α -Tax-Antikörper (s. Abb. 14) konnten nur für die beiden Positivkontrollen (Zelllysate von MT-2-Zellen sowie mit ACH transfizierten HEK-293T-Zellen) das Tax-Protein detektiert werden (40kDa). Unspezifische starke Banden waren auch in allen Proben bei etwa 130kDa zu sehen, bei den MT-2 Zellen ist zusätzlich eine Bande bei etwa 60kDa sichtbar. In einem weiteren Blot, der mit einem polyklonalem α -HTLV-1-Serum untersucht wurde (s. Abb. 15b), konnten ebenfalls nur für die Positivkontrollen spezifische Banden nachgewiesen werden. Wie im Datenblatt des α -HTLV-1-Serums angegeben, wurden die detektierten Proteine bei folgenden Größen erwartet: p19 MA, gp46 Env, p36 Tax, p24 Gag, gp21 TM. Hierbei wurde auch die V5-getagten Proteine p19 MA und p24 CA mitgeführt, die nach Strippen des Blots zusätzlich mit einem α -V5-Antikörper detektiert werden konnten (s. Abb. 14a, Spuren 6 bzw. 7). Die mit den Maxi-Präparationen transfizierten Proben wiesen in beiden Fällen lediglich unspezifische Banden auf. Bei den Zelllysaten der MT-2-Zellen sind bei Detektion mit dem α -HTLV-1-Serum (Abb. 14b, Spur 5) mehr spezifische Banden erkennbar als bei der anderen Positivkontrolle, dem ACH/HEK-293T-Zelllysate (Abb. 14b, Spur 4). Die im Genom der MT-2 integrierten Proviren sind teilweise deletiert [2], die gebildeten viralen Proteine können also andere Molekulargewichte als erwartet besitzen.

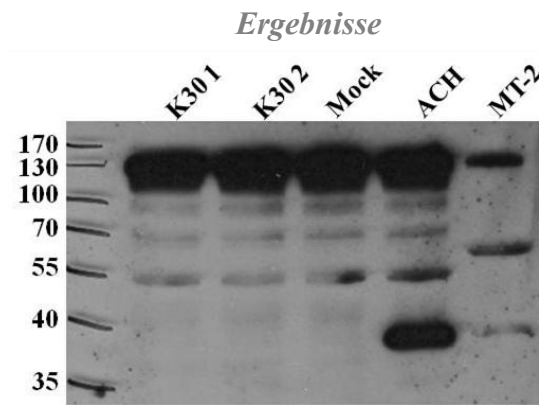


Abbildung 14: Western Blot, Detektion mit α -Tax. Aufgetragen wurden Zellysate von HEK-293T-Zellen, die zuvor mit dem K30-Molekularklon transfiziert worden waren, sowie untransfizierte HEK-293T-Zellen als Negativkontrolle. Als Positivkontrollen dienten die Zellysate von mit dem Molekularklon ACH transfizierten HEK-293T-Zellen sowie von MT-2-Zellen. Die Tax-Bande bei etwa 40kDa konnte nur in den beiden Positivkontrollen detektiert werden.

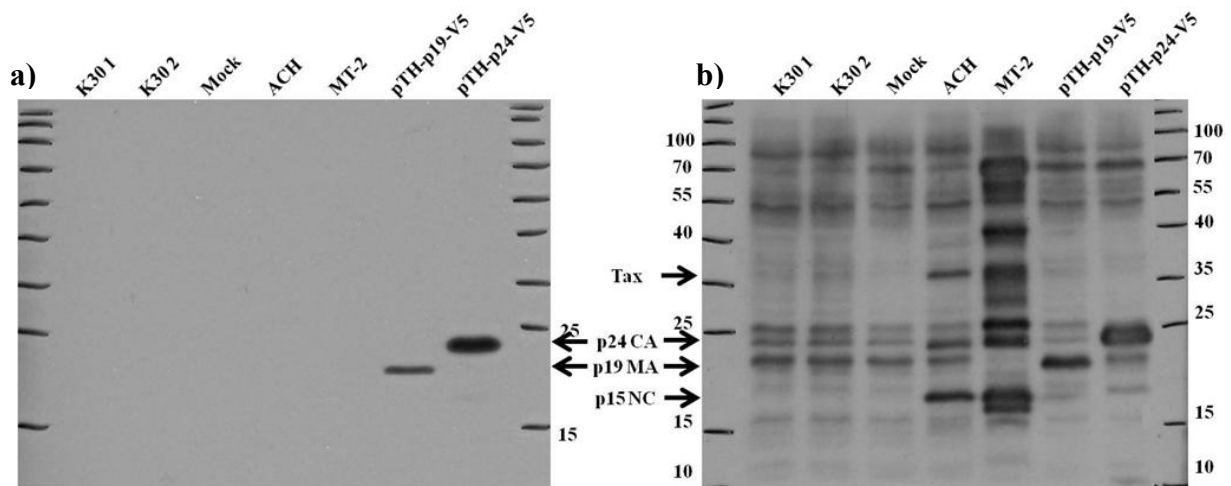


Abbildung 15: Western Blot, Detektion mit α -V5 (a) bzw. polykloalem α -HTLV-1-Ziegenserum (b). Aufgetragen wurden Zellysate von HEK-293T-Zellen, die zuvor mit dem K30-Molekularklon transfiziert worden waren, sowie untransfizierte HEK-293T-Zellen als Negativkontrolle. Als Positivkontrollen dienten die Zellysate von mit dem Molekularklon ACH bzw. mit den klonierten viralen Proteinen p19/p24 transfizierten HEK-293T-Zellen sowie von MT-2-Zellen. Spezifische Banden für virale Proteine konnten im Blot b) nur in den Positivkontrollen detektiert werden (Tax bei 36kDa, p19 MA, p24CA, NC bei ACH/293T und MT-2 bzw. p19 MA und p24 CA jeweils bei den mit den klonierten Proteinen transfizierten HEK-293T-Zellen). Nach Strippen des Blots und Inkubation mit einem gegen den V5-Tag der klonierten Proteine gerichteten, monoklonalen Antikörper konnten in Blot a) erneut p19 MA und p24 CA in den mit den klonierten Proteinen transfizierten HEK-293T-Zellen detektiert werden.

Mit den Überständen der transfizierten Zellen wurden Reverse-Transkriptase-Aktivitäts-Test in Form des Cavid-Assays durchgeführt. Hierbei konnte in beiden Versuchen kaum Aktivitäten der Reversen Transkriptase gemessen werden. Auch nach Aufkonzentrierung der Überstände mittels Ultrazentrifugation waren kaum Aktivitäten messbar (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Als Alternative wurden die Überstände von HEK-293T-Zellen, die mit dem ACH-Molekularklon transfiziert worden waren, genutzt. Eine weitere Möglichkeit bieten die Überstände von MT-2-Zellen, die als chronisch mit HTLV-1 infizierte Zelllinie Viren im Überstand produzieren. In beiden Fällen konnte mit Hilfe des Cavid-Assays eine RT-Aktivität gemessen werden, wobei anhand der ermittelten Aktivitäten erkennbar ist, dass im Überstand der transfizierten Zellen deutlich weniger Viruspartikel enthalten sind (s. Abb. 16).

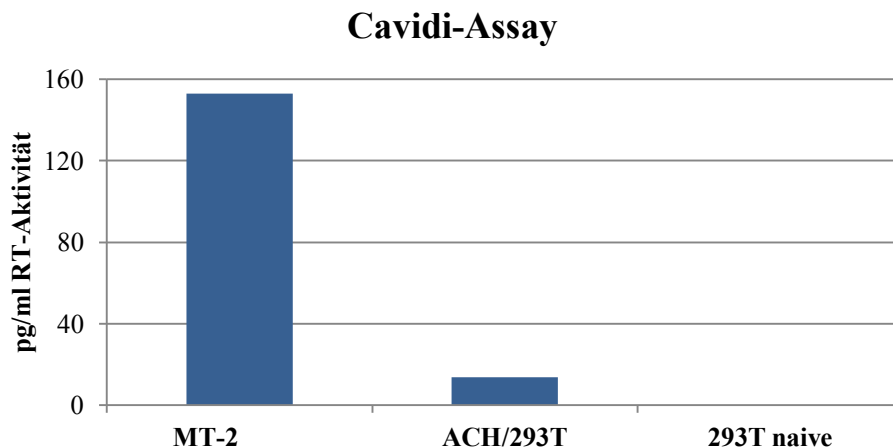


Abbildung 16: Ergebnisse des Cavid-Assays von Ultrazentrifugations-Proben. Untersucht wurden die aufkonzentrierten Virussuspensionen von MT-2 Zellen sowie von mit ACH transfizierten HEK-293T-Zellen. Die Verdünnung erfolgte 1:50 vor Untersuchung der RT-Aktivität. In beiden Proben konnte eine RT-Aktivität festgestellt werden. Im Überstand von unbehandelten HEK-293T-Zellen war keine RT-Aktivität messbar.

6.4 Herstellung von GLUT-1 überexprimierenden ARPE-19- und HOS-Zellen

6.4.1 Plasmide

Eine Überexpression des Glucosetransporters GLUT-1 sollte durch Transfektion eines entsprechenden Plasmids in die gewünschte Zelllinie erreicht werden. Von der Arbeitsgruppe von Jean-Luc Battini wurden die Plasmide GLUT-1 GFP, GLUT-1 DsRed2 und GLUT-3 GFP erhalten. Diese codieren für die beiden Glucosetransporter GLUT-1 bzw. GLUT-3, die mit einem Fluorochrom-Tag in Form der Moleküle GFP bzw. DsRed2 exprimiert werden. GLUT-3 sollte bei der Versuchsreihe als Kontrolle dienen, dass möglicherweise beobachtete Unterschiede zwischen GLUT-1 überexprimierenden und naiven Zellen nicht auf Veränderungen des Zellmetabolismus aufgrund der Überexpression eines Glucosetransporters zurückzuführen sind [32].

Ergebnisse

GLUT-3 besitzt dabei eine ähnliche Struktur wie GLUT-1 mit sechs extrazellulären Schleifen, ermöglicht jedoch nicht die Anbindung und den Eintritt von HTLV-1 in die Zelle [34].

Die Maxi-Präparationen der Plasmide wurden in einem Restriktions-Verdau kontrolliert (s. Abb. 17). Die beobachteten Banden entsprachen dabei den erwarteten Fragmentlängen des jeweiligen Plasmids.

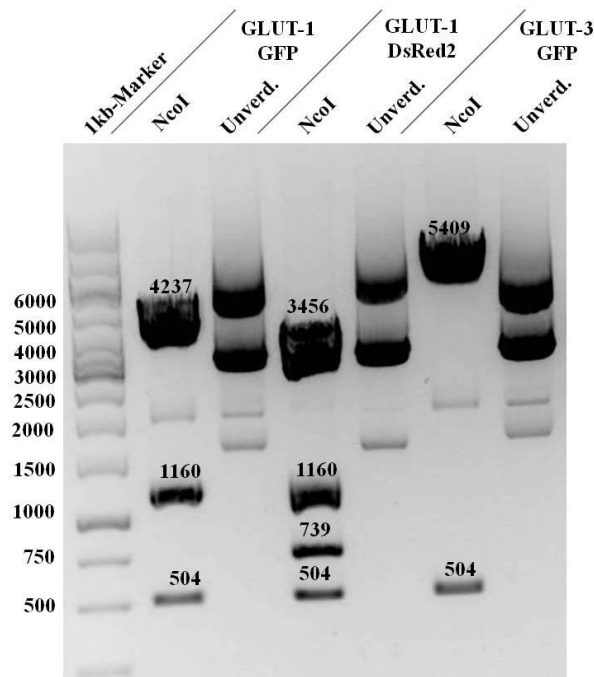


Abbildung 17: Restriktions-Verdau der drei Plasmide GLUT-1 GFP, GLUT-1 DsRed2 und GLUT-3 GFP mit NcoI. Zur Kontrolle wurde außerdem jeweils das unverdaute Plasmid aufgetragen. Die Banden wurden mit den erwarteten Fragmentlängen beschriftet, die durch den Restriktionsverdau bestätigt werden konnten.

6.4.2 Transfektion in Zelllinien

Zur Überprüfung, ob die Expression der Plasmide in Zellen erfolgt, wurden diese in HEK-293T-Zellen transfiziert (s. Abb. 18, beispielhaft für das Plasmid GLUT-1 GFP dargestellt). Die Detektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten nach einer Inkubationszeit von 48h für alle drei Plasmide beobachtet werden.

Ergebnisse

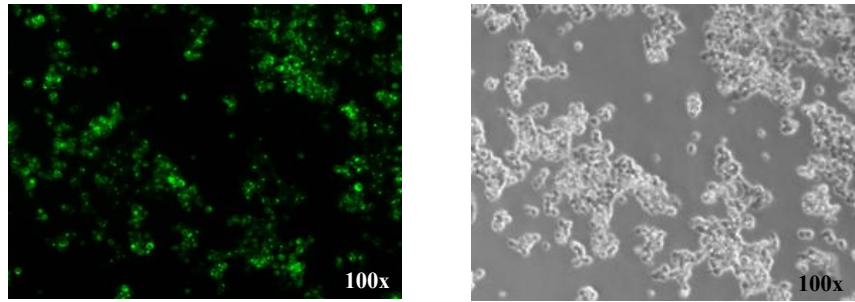


Abbildung 18: HEK-293T-Zellen, aufgenommen 48h nach der Transfektion mit GLUT-1 GFP. Erfolgreich transfizierte Zellen sind als grüne Zellen im linken Bild sichtbar. Wie im Durchlicht erkennbar ist (rechts), sind auch nicht-transfizierte Zellen im Ansatz enthalten. Diese fluoreszieren nicht, da kein GFP exprimiert wird.

Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei der Transfektion der Plasmide in ARPE-19- und HOS-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24h gemacht werden, hier jedoch mit einer deutlich geringeren Transfektionseffizienz (s. Abb. 19). Die Expression nach 48h Inkubation wurde außerdem mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen (s. Abb. 20). Dabei konnte mittels eines gegen den GFP-Tag gerichteten Antikörpers für die Plasmide GLUT-1 GFP und GLUT-3 GFP eine Doppelbande zwischen 55 und 80kDa detektiert werden. Diese entspricht den unterschiedlich glykosylierten Formen der Glucosetransporter [32], wobei zusätzlich zu dem eigentlichen Transporter 25kDa durch den GFP-Tag hinzukommen. Dies ist auch beim DsRed2-Tag der Fall. Mit einem α -GLUT-1-Antikörper konnten für beide GLUT-1-Plasmide das endogene GLUT-1 (55kDa) sowie das durch die Plasmide codierte GLUT-1 mit dem jeweiligen Tag (55kDa + 25kDa) nachgewiesen werden. Als Negativkontrollen wurden jeweils untransfizierte ARPE-19- bzw. HOS-Zellen verwendet, bei denen ebenfalls endogenes GLUT-1 detektiert werden konnte, jedoch keine weiteren Banden sichtbar waren. Die mitgeführte Tubulin-Kontrolle ermöglicht hierbei die Überprüfung, dass in den einzelnen Proben die gleiche Menge Protein eingesetzt wurde, da Tubulin konstant exprimiert wird und die Menge an Tubulin mit der Gesamtmenge an Proteinen korreliert. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Intensität der sichtbaren Banden lediglich durch den Einsatz von unterschiedlichen Proteinmengen zustande kommen.

Ergebnisse

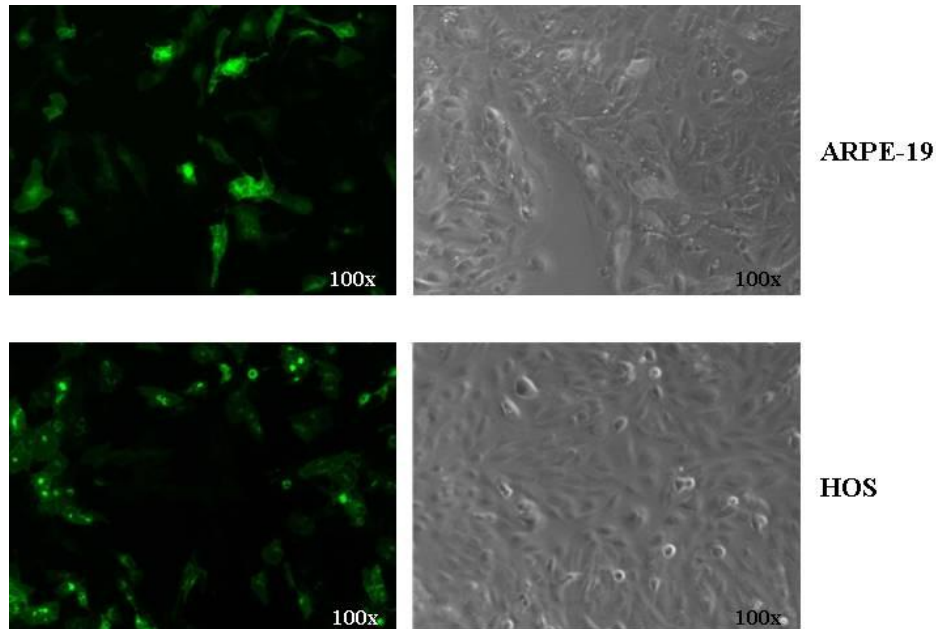


Abbildung 19: ARPE-19- (oben) bzw. HOS-Zellen (unten), aufgenommen 24h nach Transfektion mit GLUT-1 GFP. Erfolgreich transfizierte Zellen sind jeweils im linken Bild als grüne Zellen erkennbar. Wie im Durchlicht erkennbar ist (jeweils rechts), sind auch nicht-transfizierte Zellen im Ansatz enthalten. Diese fluoreszieren nicht, da kein GFP exprimiert wird. Erkennbar ist die deutlich geringere Transfektionseffizienz im Gegensatz zu HEK-293T-Zellen (s. Abb. 17).

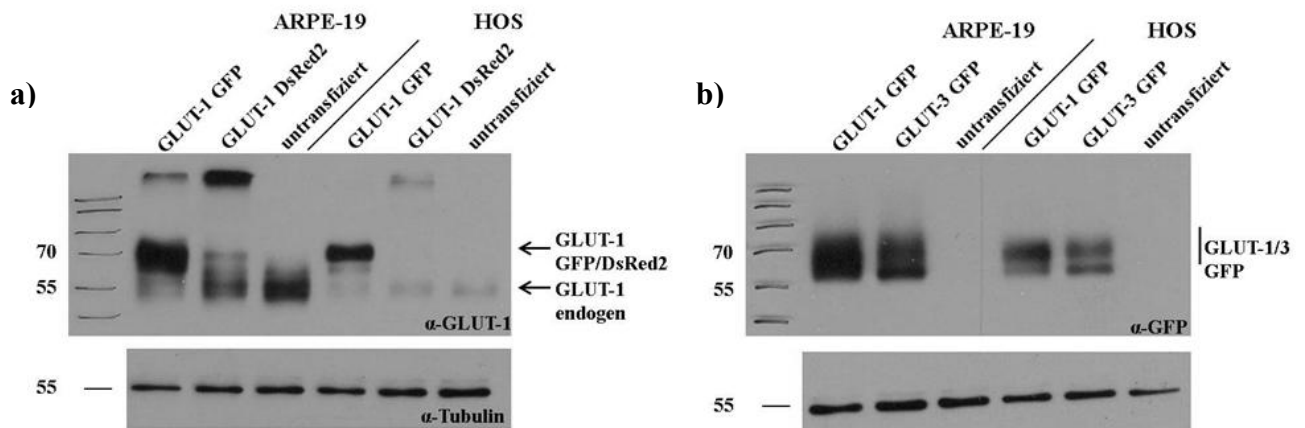


Abbildung 20: Western Blots mit Zelllysaten von ARPE-19- und HOS-Zellen, die 48h zuvor mit den Konstrukten GLUT-1 GFP, GLUT-1 DsRed2 bzw. GLUT-3 GFP transfiziert wurden. Als Negativkontrollen wurden jeweils unbehandelte Zellen verwendet. Die Detektion der exprimierten Proteine erfolgte im Blot a) mittels eines polyklonalen α -GLUT-1-Antikörpers, in b) mittels eines polyklonalen, gegen den GFP-Tag gerichteten Antikörpers. Zur Überprüfung, ob in allen Proben die gleiche Menge an Zellmaterial eingesetzt wurde, wurde ein α -Tubulin-Antikörper mitgeführt (jeweils unten dargestellt). Im Blot a) sind bei beiden Zelllinien sowohl für GLUT-1 GFP als auch für GLUT-3 GFP Doppelbanden zwischen 55 und 80kDa erkennbar, die durch unterschiedlich glykosylierte Formen der Transportermoleküle zustande kommen. Die Negativkontrollen weisen keine Banden auf. Im Blot b) kann in allen Proben das endogen exprimierte GLUT-1 bei 55kDa sowie in den transfizierten Zellen das in dem Vektor codierte GLUT-1 (55kDa) zuzüglich des jeweiligen Tags (25kDa) bei 80kDa detektiert werden. Dies ist jedoch nicht bei den mit GLUT-1 DsRed2 transfizierten HOS-Zellen (Spur 5) erkennbar. Dieses Konstrukt wird auch in den ARPE-19-Zellen weniger stark exprimiert als das Molekül mit dem GFP-Tag. Die Expression von endogenem GLUT-1 ist bei der Zelllinie HOS deutlich geringer als bei ARPE-19.

6.5 Infektionsversuch

Zur Überprüfung, ob die Überexpression des GLUT-1-Transporters zu einer gesteigerten Infektionsrate in HOS- und ARPE-19-Zellen führt, wurden diese mit den GLUT-1- bzw. GLUT-3-Plasmiden transfiziert und nach 48h Inkubation zur Expression dieser Proteine mit aufkonzentrierten, von ACH- und MT-2-entstammenden Viren inkubiert. Als Kontrolle wurden auch nicht-transfizierte ARPE-19- bzw. HOS-Zellen mit infiziert. Nach 72h erfolgte die Auswertung des Versuchs.

In einer quantitativen Realtime-PCR wurden die Zellen auf Integration des Provirus in das Zellgenom untersucht. Eine Infektion von HOS-Zellen mit den MT-2-entstammenden Viren konnte dabei nicht beobachtet werden, für die anderen drei Versuchsreihen konnte jedoch eine Provirus-Integration festgestellt werden (s. Abb. 21 und 22). Die ermittelten HTLV-1-Kopien wurden auf die aus der eingesetzten DNA-Menge berechneten Zellzahlen bezogen. Für die Infektionsreihe von ARPE-19-Zellen mit den MT-2-entstammenden Viren war die Infektion zwar erfolgreich, erfolgte jedoch mit einer relativ geringen Infektionsrate von durchschnittlich 1,45 Kopien HTLV/100 Zellen. Bei den beiden Versuchsreihen mit den ACH-entstammenden Viren konnten sehr viel höhere Infektionsraten von durchschnittlich 86,13 (ARPE-19-Zellen) bzw. 165,93 (HOS-Zellen) Kopien HTLV-1/100 Zellen gemessen werden. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit den unterschiedlichen Plasmiden transfizierten bzw. untransfizierten Zellen erkennbar. In der Versuchsreihe der ARPE-19-Zellen mit ACH-entstammenden Viren wiesen untransfizierte Zellen die höchste Infektionsrate mit 150,9 Kopien HTLV/100 Zellen auf. Bei den mit den drei Konstrukten transfizierten Zellen wurden vergleichbare Infektionsraten gemessen (GLUT-1 GFP: 60,8 Kopien HTLV-1/100 Zellen; GLUT-1 DsRed2 63,8 Kopien HTLV-1/100 Zellen; GLUT-3 GFP: 69 Kopien HTLV-1/100 Zellen). Bei der gleichen Versuchsreihe mit der Zelllinie HOS zeigten hingegen die mit GLUT-1 DsRed2 transfizierten Zellen mit 227,9 Kopien HTLV-1/100 Zellen die höchste Infektionsrate; die Infektionsraten der anderen drei Ansätze waren wiederum vergleichbar (GLUT-1 GFP: 146,6 Kopien HTLV-1/100 Zellen; GLUT-3 GFP: 149 Kopien HTLV-1/100 Zellen; untransfiziert: 140,2 Kopien HTLV-1/100 Zellen).

Die Infektionsraten von ARPE-19-Zellen mit MT-2-entstammenden Viren waren deutlich geringer. Hier wiesen die mit GLUT-3 GFP transfizierten Zellen die höchste Infektionsrate auf (3,9 Kopien HTLV-1/100 Zellen), untransfizierte Zellen besaßen die geringste mit 0,3 Kopien HTLV-1/100 Zellen. Die Infektionsraten mit den beiden GLUT-1-Konstrukten transfizierten Zellen betragen 1,0 (GLUT-1 GFP) bzw. 0,6 (GLUT-1 DsRed2) Kopien HTLV-1/100 Zellen.

Ergebnisse

ARPE-19

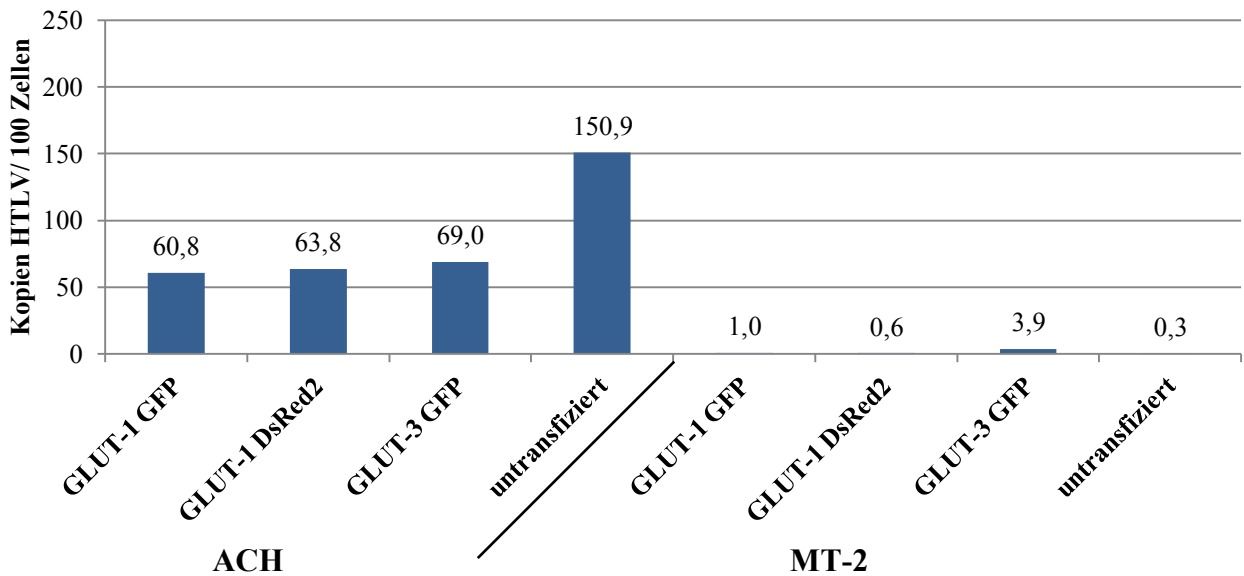


Abbildung 21: Ergebnisse der Untersuchung der Versuchsreihe des Infektionsversuchs mit ARPE-19-Zellen mittels quantitativer Realtime-PCR in Kopien des proviralen Genoms von HTLV-1 pro 100 Zellen. Der Infektionsversuch mit MT-2-entstammenden Viren (rechts) ergab nur eine geringe Infektionsrate der Zellen, was sich in der geringen Anzahl an HTLV-1-Kopien pro 100 Zellen widerspiegelt. Bei der Versuchsreihe mit ACH-entstammenden Viren (links) konnten deutlich höhere Infektionsraten erzielt werden, wobei die Anzahl an HTLV-1-Kopien pro 100 Zellen bei den naiven Zellen etwa doppelt so hoch war wie bei den mit den verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellen.

HOS

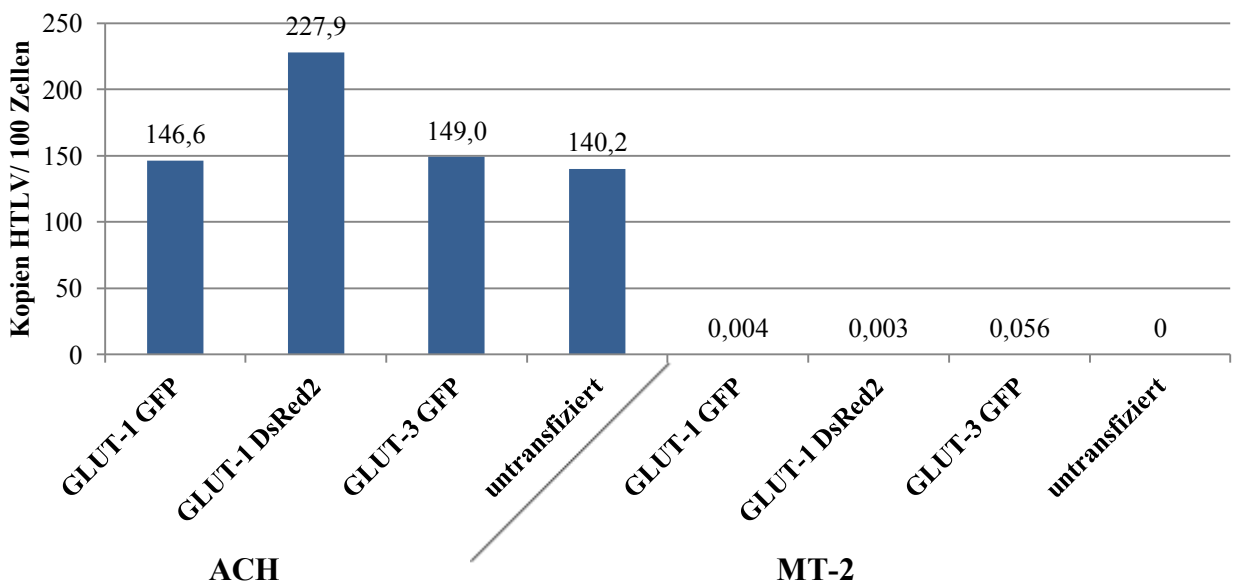


Abbildung 22: Ergebnisse der Untersuchung der Versuchsreihe des Infektionsversuchs mit HOS-Zellen mittels quantitativer Realtime-PCR in Kopien des proviralen Genoms von HTLV-1 pro 100 Zellen. Bei der Versuchsreihe mit MT-2-entstammenden Viren (rechts) konnte in allen Proben keine Infektion festgestellt werden. Die Infektion mit ACH-entstammenden Viren (links) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen, die GLUT-1 bzw. GLUT-3 überexprimierten, und naiven Zellen. Grundsätzlich konnte jedoch eine Infektion der Zellen detektiert werden.

Ergebnisse

Die Realtime-PCR wurde als Duplex-PCR durchgeführt, wodurch gleichzeitig die Amplifikation des Albumin-Gens möglich ist. Dies kann zur Kontrolle der Funktionalität der PCR genutzt werden. In allen Proben konnte eine Amplifikation mit einem c_t -Wert zwischen 24 und 36 festgestellt werden, was die Integrität der DNA sowie die Abwesenheit von PCR-inhibierenden Faktoren demonstriert (s. Abb. 23 beispielhaft für die Versuchsreihe HOS/ACH).

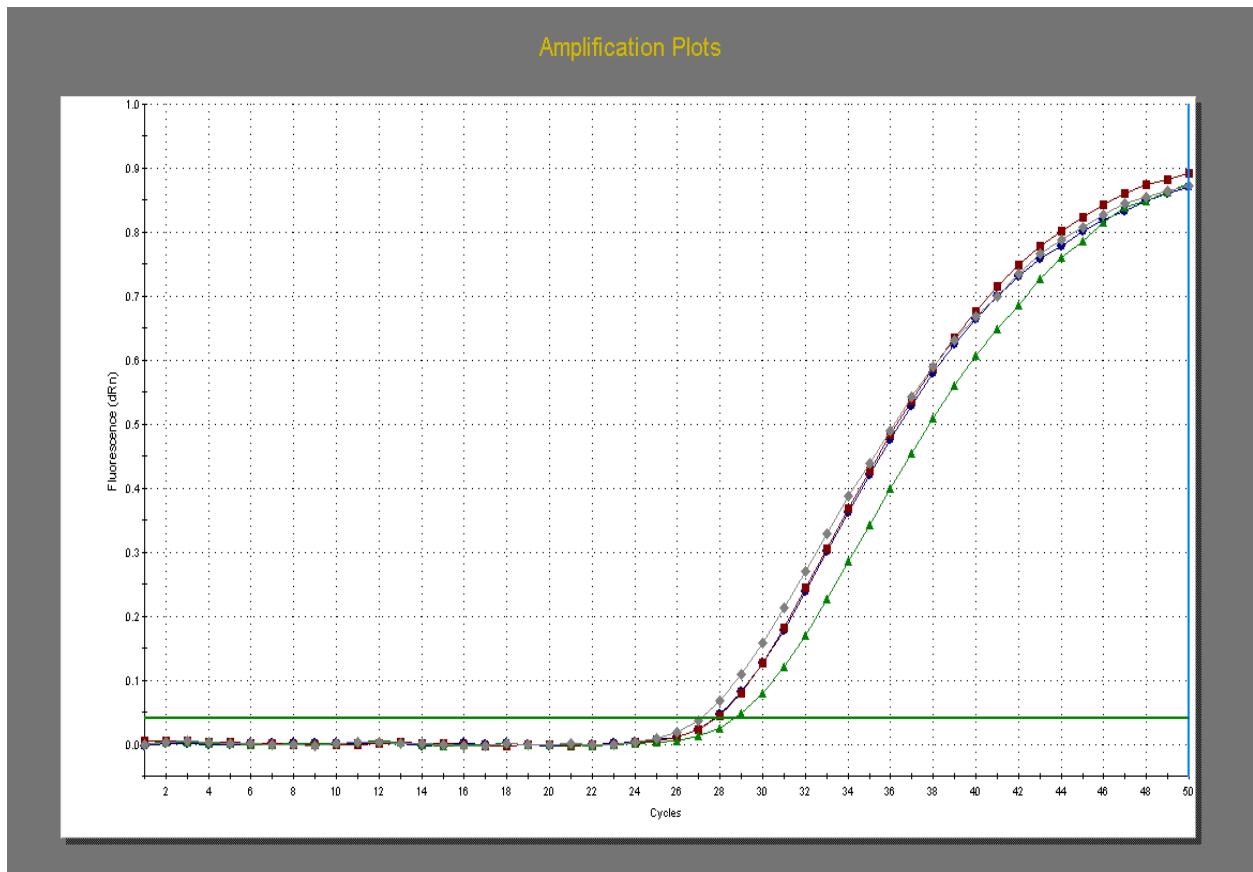


Abbildung 23: Amplifikations-Plots der Albumin-PCR. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse für die Versuchsreihe HOS/ACH dargestellt.

Im Cavid-Assay konnte in den Überständen der infizierten Zellen keine deutliche Reverse-Transkriptase-Aktivität gemessen werden (s. Abb. 24). Dies deutet darauf hin, dass trotz erfolgreicher Infektion der Zellen keine Produktion von viralen Partikeln innerhalb der Inkubationszeit von 72h stattgefunden hat.

Ergebnisse
Cavidi-Assay

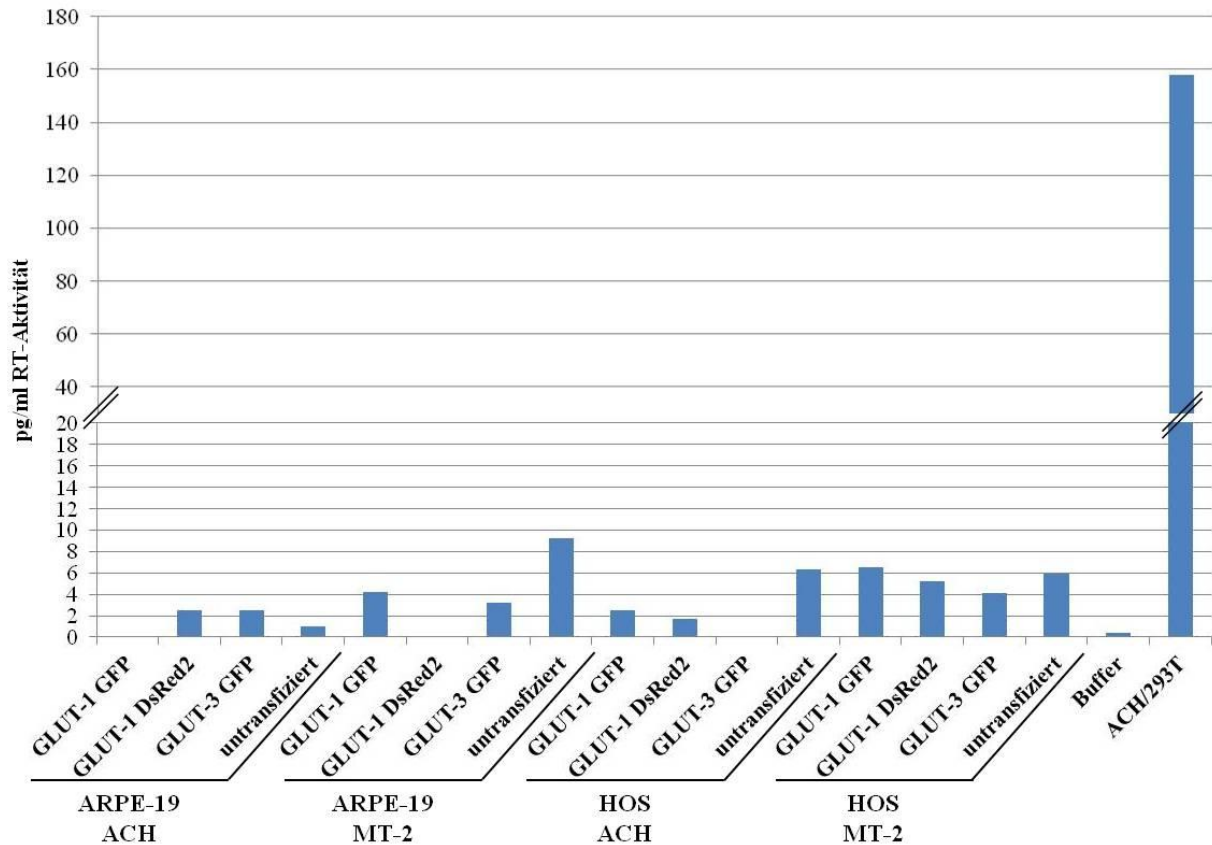


Abbildung 24: Ergebnisse des Cavidi-Assays der Überstände der infizierten Zellen. Dargestellt sind die Werte der Infektionsreihen von ARPE-19- und HOS-Zellen mit ACH- bzw. MT-2-entstammenden Viren, sowie ein im Assay verwendeter Puffer als Negativkontrolle (2.v.r.) und der Überstand von HEK-293T-Zellen, die mit dem HTLV-1-Molekularklon ACH transfiziert und 48h inkubiert wurden, als Positivkontrolle. Im Vergleich zu dieser Positivkontrolle mit einer Reverse-Transkriptase-Aktivität von 158pg/ml sind die ermittelten Werte der Infektionsreihen so gering, dass davon ausgegangen werden kann, dass die erfolgreiche Infektion der Zelllinien ARPE-19 und HOS innerhalb der Inkubationszeit von 72h nicht zu einer produktiven Infektion geführt hat. Es sind keine Unterschiede zwischen den Überständen der mit den GLUT-1- bzw. GLUT-3-Konstrukten transfizierten und den untransfizierten Zellen erkennbar.

7 Diskussion

7.1 Klonierung von Positivkontrollen und Aufreinigung eines monoklonalen α -Tax-Antikörpers

Zur späteren Verwendung im Rahmen der Untersuchung einer Infektion konnte ein monoklonaler α -Tax-Antikörper gewonnen werden, der frei von anderen Proteinen vorliegt und zur Detektion von viralen Proteinen eingesetzt werden kann. Die Klonierung der viralen Proteine p19 MA und p24 CA in den pTH-Vektor wurde erfolgreich durchgeführt, sodass diese als Positivkontrollen genutzt werden können. Tax ist ein regulatorisches Protein, das früh nach der Integration eines neuen Provirus gebildet wird, wohingegen die Gag-Proteine p19 und p24 im Replikationszyklus am stärksten exprimiert werden. Anhand des V5-Tags konnte gezeigt werden, dass die Proteine nach Transfektion der Plasmide in HEK-293T-Zellen exprimiert werden (IPA, s. Abb. 9).

Die Klonierung des Tax-Proteins konnte nicht abgeschlossen werden, somit konnte keine Charakterisierung des aufgereinigten α -Tax-Antikörpers im Western Blot gegen ein rekombinantes Tax durchgeführt werden. Im Western Blot nach Transfektion der HTLV-1-Moleklarklone ist erkennbar, dass schwache unspezifische Banden im Zelllysate von transfizierten Zellen auftreten (s. Abb. 14). Eine Expression von Tax alleine in einem Vektor könnte hier dazu genutzt werden, die Menge an α -Tax-Antikörpern herunter zu titrieren, bis eine optimale Verdünnung der verwendeten Fraktion gefunden ist, die einen Nachweis von Tax ohne unspezifische Bindung an zelluläre Proteine ermöglicht. Mittels eines nach pro- oder eukaryontischer Expression aufgereinigtes Tax-Proteins könnte der α -Tax-Antikörper auch über eine Affinitätssäule aufgereinigt werden, dies würde eventuell für eine weitere Reinheit der Antikörper sorgen. Ebenso wäre neben p19, p24 und Tax eine Klonierung von weiteren Proteinen sinnvoll, um über zusätzliche Positivkontrollen zu verfügen, die beispielsweise innerhalb eines Western Blots mit dem polyklonalen α -HTLV-1-Serum eingesetzt werden können.

7.2 Überexpression des GLUT-1-Transporters

Die Konstrukte GLUT-1 GFP, GLUT-1 DsRed2 und GLUT-3 GFP wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Jean-Luc Battini zur Verfügung gestellt. Nach Herstellung von Maxi-Präparationen konnte eine Expression der transfizierten Konstrukte in HEK-293T- sowie in

Diskussion

ARPE-19- und HOS-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. In den Zelllinien ARPE-19 und HOS wurde außerdem die Überexpression in einem Western Blot überprüft.

Es konnten Maxi-Präparationen aller Konstrukte hergestellt werden, die mittels Restriktionsverdau überprüft wurden (s. Abb. 17). Dabei sind neben den jeweils erwarteten Banden auch unspezifische Banden bei etwa 2200bp erkennbar. Diese kommen möglicherweise durch unspezifische Spaltprodukte oder durch noch unverdautes Plasmid zustande aufgrund der zu großen Menge an eingesetzter DNA, da auf der gleichen Höhe auch Banden bei den jeweils unverdaut aufgetragenen Plasmiden erkennbar sind.

Um die Bedeutung des Glucosetransporters untersuchen zu können, muss gegeben sein, dass durch die hier vorgenommene Transfektion die Expression verändert wird, da GLUT-1 auch endogen exprimiert wird. Von der Funktionalität der durch die Plasmide codierten kann ausgegangen werden, da die gleichen Plasmide auch von Manel *et al.* in ihrer Veröffentlichung [32] verwendet wurden und deren Funktionalität dort anhand des veränderten Zellmetabolismus nachgewiesen wurde. Der Nachweis der Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit nur qualitativ über die angehängten Detektionstags (Fluoreszenz, Western Blot) bzw. semi-quantitativ über den Vergleich zur Expression des endogenen GLUT-1 erbracht (Western Blot).

Protein-Tags können zur Detektion und Lokalisation von anderen Proteinen genutzt werden, indem sie bei der Translation zusammen mit der Sequenz des eigentlichen Proteins abgelesen und so an dieses fusioniert werden. Dabei sind diese Tags so klein, dass sie die Struktur des Proteins und somit seine Funktionalität nicht beeinflussen. Auch Coskun und Sutton zeigten in ihrer Arbeit, dass der von ihnen verwendete, mit eYFP getagte GLUT-1-Transporter seine Funktion erfüllt, also dass ein freier COOH-Terminus des Moleküls nicht für die Infektion benötigt wird [8]. Auch die jeweiligen Tags der hier verwendeten Glucosetransporter sollten also deren Funktionalität als Rezeptor für HTLV-1 nicht beeinträchtigen.

Im Western Blot konnten sowohl endogenes als auch Plasmid-codiertes GLUT-1 in mit den entsprechenden Plasmiden transfizierten ARPE-19- und HOS-Zellen nachgewiesen werden. Auffällig ist hierbei die geringere Expression von endogenem GLUT-1 in HOS- im Gegensatz zu ARPE-19-Zellen (Abb. 20a, Spur 4 bis 6 bzw. 1 bis 3). Bei letzteren nimmt diese Expression scheinbar umso mehr ab, je stärker die Expression der Plasmid-codierten Konstrukte ist. In den Taschen der Spuren 2 und 5 ist eine vermehrte Menge an nicht-denaturierter Probe erkennbar (Bande oberhalb von 170kDa). Möglicherweise verhindert der DsRed2-Tag eine vollständige Denaturierung, sollte diese jedoch eigentlich nicht beeinflussen. Weitere Untersuchungen beispielsweise nach der Klonierung dieses Tags an ein anderes Protein wie Albumin sollten weitere

Diskussion

Erkenntnisse dazu liefern. Eine Verbesserung der Denaturierung würde möglicherweise auch weiteren Aufschluss über die Expression des GLUT-1 DsRed2-Konstrukts liefern. Die Intensität der Banden lässt auf eine geringere Expression aller detektierten Proteine in HOS- im Vergleich zu ARPE-19-Zellen schließen. Auch bei der Untersuchung der Expression von GLUT-1 GFP und GLUT -3 GFP mittels Western Blot (s. Abb. 20b) war diese bei HOS-Zellen geringer als bei ARPE-19-Zellen, wie sich an der Intensität der Banden feststellen lässt. Mit Hilfe des mitgeführten α -Tubulin-Antikörpers lässt sich bei beiden Blots sicherstellen, dass dieser Effekt nicht auf den Einsatz einer geringeren Menge an Probenmaterial zurückzuführen ist. Die geringere Expression der Konstrukte in der Zelllinie HOS in Bezug auf ARPE-19 lässt sich möglicherweise auf eine geringere Transfektionseffizienz zurückführen. Um dies nachzuweisen, sollte eine Bestimmung der Transfektionseffizienz sowie eine Quantifizierung der Expression der GLUT-Plasmide durchgeführt werden. Eine Erhöhung der Transfektionseffizienz wäre durch die Optimierung der Bedingungen möglich. Da in dieser Arbeit jedoch die Fragestellung lediglich lautet, ob eine Überexpression die Infektionsrate von HTLV-1 bei den beiden Zelllinien beeinflusst, reicht in diesem Fall die Aussage, dass eine Überexpression der codierten GLUT-Proteine nach Transfektion stattfindet, aus. Für weitere Untersuchungen wäre jedoch zudem interessant, wie viele der überexprimierten Transporter sich letztendlich auf der Zelloberfläche befinden und somit als Rezeptor für das Virus fungieren können. Dies könnte mittels FACS-Analyse untersucht werden, bei der ein Antikörper gegen den jeweiligen Glucosetransporter verwendet wird, der ausschließlich eine extrazelluläre Domäne dessen erkennt.

Die im mit dem polyklonalen α -GFP-Antikörper detektierten Blot sichtbaren Doppelbanden wurden bereits in der Veröffentlichung von Manel *et al.* unterschiedlich glykosylierten GLUT-Formen zugeordnet [32]. Dies wurde auch in der Arbeit von Coskun und Sutton bestätigt [8]. Dass verschiedene glykosylierte Formen des Glucosetransporters existieren, wurde bereits von McMahon und Frost beschrieben [37].

7.3 Herstellung eines infektiösen HTLV-1-Überstands

Eine Transfektion von hergestellten K30-Moleklarklonen konnte nicht zur Produktion viraler Partikel genutzt werden. In allen getesteten Bakterienstämmen wurde das Ursprungsplasmid derart mutiert oder deletiert, dass keine virale Partikelbildung stattfand. Dies wurde einerseits mittels Western Blot für die Detektion viraler Proteine gezeigt, und andererseits mit Hilfe des Cavid-Assays für die Reverse-Transkriptase-Aktivität.

Diskussion

Bei der Detektion mittels Western Blot mit Hilfe des polyklonalen Ziegenserums (s. Abb. 15b) waren zahlreiche unspezifische Banden sichtbar, was an der Negativkontrolle (dritte Spur) erkennbar ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Immun-Peroxidase-Assays, bei dem in Form einer starken unspezifischen Färbung bereits eine Reaktion des Serums mit den HEK-293T-Zellen festgestellt wurde (s. Abb. 9 rechts oben). Diese unspezifischen Reaktionen könnten durch Optimierung der Versuchsdurchführung, also beispielsweise durch Variieren der Antikörperkonzentrationen oder Veränderung der Waschschriffe, reduziert oder verhindert werden.

Bei den Zelllysaten der MT-2-Zellen sind bei Detektion mit dem α -HTLV-1-Serum (Abb. 14, Spur 5) mehr spezifische Banden erkennbar als bei der anderen Positivkontrolle, dem ACH/HEK-293T-Zelllysate (Abb. 14b, Spur 4). Im Genom der MT-2-Zellen sind teilweise deletierte Proviren integriert [2], sodass virale Proteine mit anderen Molekulargewichten als den erwarteten gebildet werden. Diese werden trotzdem von den im Serum enthaltenen Antikörpern erkannt, sofern das Epitop des jeweiligen Antikörpers noch vorhanden ist. Dadurch lassen sich zusätzliche Banden erklären. Weitere Informationen, um welche Proteine es sich handeln könnte, würde hier das Mitführen von weiteren klonierten Proteinen als Positivkontrollen liefern.

Durch Strippen des Blots und Inkubation mit einem α -V5-Antikörper konnten die klonierten Proteine p19 MA und p24 CA erneut detektiert werden (s. Abb. 14a, Spur 6 bzw. 7). Die im mit dem polyklonalen Serum detektierten α -HTLV-1-Blot sichtbaren Banden auf Höhe von 19 bzw. 24kDa entsprechen also den viralen Proteinen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass Banden, die sich bei den verwendeten Positivkontrollen ACH/293T und MT-2 auf derselben Höhe befinden, ebenfalls durch die in den Proben enthaltenen viralen Proteine zustande kommen (s. Abb. 14b, Spur 4 bzw. 5). Die Zuordnung der übrigen spezifischen Banden ist nicht eindeutig möglich. In einem anderen Blot wurde bereits mit Hilfe eines monoklonalen α -Tax-Antikörpers gezeigt, dass in der Positivkontrolle ACH/293T das virale Protein Tax vorhanden ist (s. Abb. 14, Spur 4). Dies legt die Vermutung nahe, dass die in beiden Positivkontrollen vorhandene Bande bei 36kDa hier wie im Datenblatt des α -HTLV-1-Serums Tax entspricht, obwohl die typische Molekülmasse 40kDa beträgt [39], was auch im α -Tax-Blot gezeigt wurde. Auf der Höhe von 40kDa ist jedoch im α -HTLV-1-Blot lediglich in der Probe MT-2 eine Bande erkennbar. Eine Wiederholung dieses Blots mit anschließendem Strippen und erneuter Detektion mit dem monoklonalen α -Tax-Antikörper sollte dies klären. Dabei wäre die Mitführung einer Tax-Positivkontrolle analog zu den Positivkontrollen p19 MA und gp21 TM sinnvoll. Die in beiden Positivkontrollen vorhandene Bande bei 17kDa kann möglicherweise dem Nucleocapsid-Protein p15 zugeordnet werden, auch dies könnte mit Hilfe einer Positivkontrolle bestätigt werden.

Diskussion

Aufgrund der bei dem Molekularklon K30 stattgefundenen Rekombinationsereignisse wurden die Infektionsversuche nur mit ACH- und MT-2-entstammenden Viren durchgeführt. Für weitere Infektionsstudien wäre jedoch auch die Verwendung von K30-entstammenden Viren vorteilhaft, da dieser HTLV-1-Molekularklon im Gegensatz zu ACH genau charakterisiert ist [61, 62]. Die von der Zelllinie MT-2 produzierten Viren sind ebenfalls nicht genau charakterisiert, da es im Laufe der Kultivierung zu Deletionen und so zu Informationsverlust kommen kann [2]. Da bei K30 die Sequenz des gesamten Genoms bekannt ist, lassen sich die erwarteten Größen der codierten viralen Proteine genauer voraussagen.

7.4 Infektion von ARPE-19- und HOS-Zellen

Eine zellfreie Infektion von ARPE-19- und HOS-Zellen konnte mittels Realtime-PCR nachgewiesen werden. Dabei war die Infektion mit ACH-entstammenden Viren effektiver als die mit MT-2-entstammenden. Die Infektion war jedoch in beiden Fällen nicht produktiv.

Mittels eines Reverse-Transkriptase-Assays konnte keine Aktivität der RT im Überstand der einzelnen Proben gezeigt werden. Für HOS-Zellen wurde jedoch bereits von Clapham *et al.* 1983 eine produktive Infektion nach vier Monaten beschrieben [7]. Möglicherweise könnte also nach einer längeren Inkubationszeit die Bildung von Viruspartikeln beobachtet und detektiert werden. Dies sollte auch für die Zelllinie ARPE-19 untersucht werden.

Für die Detektion von viralen Proteinen mit Hilfe des Western Blots zusätzlich zur Quantifizierung der Proviruslast stand nicht genug Material zur Verfügung. Aufgrund der Ergebnisse der quantitativen Realtime-PCR konnte jedoch die Beobachtung, dass HOS-Zellen zellfrei infizierbar sind [7], bestätigt werden. Außerdem konnte eine zellfreie Infektion von ARPE-19-Zellen mit HTLV-1 gezeigt werden. Für diese Zelllinie war bisher nur eine Infektion mittels Co-Kultur berichtet worden [28].

Die Infektionsrate mit MT-2-entstammenden Viren war für ARPE-19-Zellen sehr viel geringer als mit ACH-entstammenden Viren. Bei HOS-Zellen konnte keine Infektion mit den MT-2-entstammenden Viren nachgewiesen werden. Dies lässt sich durch den geringeren Anteil an infektiösen Viren an der Gesamtmenge der produzierten Viren bei MT-2-Zellen erklären, der nur einen infektiösen Partikel pro 10^6 Viruspartikel beträgt [10]. Bei gleicher geringer Virusmenge würde eine gering unterschiedliche Infizierbarkeit in beiden Zelllinien diese Ergebnisse erklären. Wie im Western Blot zu sehen ist, ist die endogene Expression des putativen HTLV-1-Rezeptors

Diskussion

GLUT-1 in der Zelllinie HOS verglichen mit ARPE-19 geringer (s. Abb. 20), dies könnte bei geringen Mengen von infektiösen Viruspartikeln ein Grund für die negativen Ergebnisse im Ansatz MT-2/HOS sein. Auch aus diesem Grund wäre ein Infektionsversuch mit Viren vorteilhaft, die durch Transfektion des K30-Moleklarklons gewonnen werden, da diese mit höherer Wahrscheinlichkeit infektiös sind.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der Überexpression des potentiellen HTLV-1-Rezeptors GLUT-1 [32] auf die Infektionsrate der beiden infizierbaren Zelllinien [7, 28] mit freiem Virus zu untersuchen. Dabei wurde vermutet, dass eine Überexpression zur Erhöhung der Infektionsrate führt. Dies konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten anhand der durch die quantitative Realtime-PCR erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigt werden: Die Versuchsreihe der Zelllinie HOS mit ACH-entstammenden Viren ergab für die mit den Konstrukten GLUT-1 GFP bzw. GLUT-3 GFP transfizierten sowie für die untransfizierten Zellen eine Infektionsrate von etwa 145 Kopien HTLV-1/100 Zellen. Lediglich die mit GLUT-1 DsRed2 transfizierten Zellen wiesen eine höhere Infektionsrate von 228 Kopien/ 100 Zellen auf. Dies lässt sich jedoch nicht auf die Überexpression des Vektor-codierten Transporters zurückführen, da diese Beobachtung sonst auch für das Konstrukt GLUT-1 GFP gemacht werden müsste. Die Tags der Konstrukte schränken die Funktionalität der Transporter nicht ein [32], sodass kein Unterschied zwischen den Konstrukten mit DsRed2 oder GFP bestehen sollte. Möglicherweise befand sich in den Proben eine nicht vergleichbare Anzahl intakter Zellgenome, obwohl dies in der Albumin-Realtime-PCR nicht erkennbar war. Hier sollte zwingend eine PCR evaluiert werden, die eine korrekte Quantifizierung der Zellgenome ermöglicht und so die Berechnung auf Grundlage der eingesetzten DNA-Menge ersetzt. In weiteren Versuchen sollte weiterhin eine limitierende Anzahl an Viren eingesetzt werden, um multiple Infektionen zu vermeiden, da die bestimmten Infektionsraten sonst nicht aussagekräftig sind.

Bei der Infektion der Zelllinie ARPE-19 mit ACH-entstammenden Viren besaßen die untransfizierten Zellen mit 151 Kopien HTLV-1/100 Zellen die höchste Infektionsrate, die mit den drei verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellen wiesen lediglich eine Infektionsrate von etwa 65 Kopien/ 100 Zellen auf. Auch hier wirkte sich also eine Überexpression des GLUT-1-Moleküls nicht im vermuteten Maß auf die Infektionsrate aus. Da alle zuvor transfizierten Zellen sich schlechter infizieren ließen, kann die höhere Infektionsrate der untransfizierten Zellen sich möglicherweise auf den geringeren Stress der Zellen vor der Infektion zurückführen lassen. Dies könnte man durch Transfektion eines Leervektors (pcDNA) als weitere Negativkontrolle erneut untersuchen, da hierbei alle Zellen der gleichen Vorbehandlung ausgesetzt sind. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit verwendeten Negativkontrolle GLUT-3

Diskussion

wird in mit einem Leervektor transfizierten Zellen kein zusätzliches Protein exprimiert, sodass die Zellen zwar dem Stress der Transfektion, jedoch nicht dem der Überexpression eines bestimmten Gens ausgesetzt sind.

Die mit der Realtime-PCR bestimmten Infektionsraten sind grundsätzlich sehr hoch, es müssen multiple Infektionen von Zellen stattgefunden haben. Ein Vergleichswert wurde mit 0,8 bis 7,6 Kopien HTLV-1/100 Zellen angegeben [21]. Hierbei wurden jedoch Primärzellen mittels Co-Kultur infiziert, die beiden Systeme sind also nur bedingt vergleichbar. Die zellfreie Infektion mit HTLV-1 hat sich als schwierig herausgestellt, da die freien Viren als kaum infektiös beschrieben werden [39]. Die Evaluierung eines Systems, das *in vitro* eine zellfreie Infektion ermöglicht, wäre deswegen wünschenswert.

Wichtig bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist, dass keine Quantifizierung der Überexpression der Konstrukte bzw. der Expression der endogenen GLUT-Moleküle durchgeführt wurde. Dies ist jedoch erforderlich, um die gemessenen Infektionsraten in ein Maß zu der Expression der Transporter setzen zu können. Möglicherweise war auch die Expression der transfizierten Plasmide zu gering, um einen Einfluss der GLUT-1-Transfektion im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen auf die Infektionsrate sichtbar zu machen. Auch ist die Rolle von GLUT-1 bei der Infektion von Zellen mit HTLV-1 nicht bekannt, sodass eine Überexpression nicht unbedingt zu einer Erhöhung der Infektionsrate führen muss. Es wird beispielsweise vermutet, dass GLUT-1 lediglich als Fusionsrezeptor fungiert [12, 23] und eine Überexpression deswegen nicht zu einer erhöhten Infektionsrate führt.

Eine Analogie des Eintrittsmechanismus von HTLV-1 zu dem von HIV wurde bereits vermutet [12]: Bei HIV erfolgt die Anbindung des SU-Proteins an den CD4-Rezeptor der Zelle. Dies führt zu einer Konformationsänderung des SU-Proteins, die die Anbindung an den Co-Rezeptor CCR5 ermöglicht, die wiederum zur Fusion der Hüllmembran des viralen Partikels mit der Zelle führt. CD4 entspricht damit NRP-1 und CCR5 entspricht GLUT-1, wenn man vom Modell von Jones *et al.* ausgeht [23]. Ghez *et al.* vermuteten deswegen auch, dass möglicherweise eine geringe Anzahl an GLUT-Molekülen ausreicht, wenn die Dichte an NRP-1 hoch ist [12]. Dies würde wiederum analog zur Infektion mit HIV stattfinden, da dafür ebenfalls beschrieben wurde, dass eine Überexpression von CD4 für eine Erhöhung der Infektionsrate ausreicht, ohne gleichzeitig die Expression von CCR5 zu erhöhen [6]. Analog könnte also eine Überexpression von NRP-1 zur Erhöhung der Infektionsrate von HTLV-1 führen. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Takenouchi *et al.* [57] bzw. Jones *et al.* [22], die beobachteten, dass eine Überexpression von GLUT-1 nicht zu einer erhöhten Anbindung des SU-Proteins von HTLV-1 führt und GLUT-1 somit nicht an der initialen Anbindung des Viruspartikels an die Zelle beteiligt ist.

Diskussion

Für NRP-1 berichteten Ghez *et al.* hingegen, dass die Überexpression zu einer erhöhten Infektion mit HTLV-1-Env pseudotypisierten Viren führt [11].

Von Jones *et al.* wurde weiterhin beschrieben, dass die Überexpression von GLUT-1 in CD4+-Zellen zu einem sehr geringen Anstieg der Internalisierung von HTLV-1 führt [20]. Möglicherweise ist dies nicht bei anderen Zelltypen zu beobachten oder der Anstieg ist so gering, dass er innerhalb der Schwankungen der bei den Versuchen erhaltenen Werte liegt. Nach den Ergebnissen dieses Infektionsversuchs lässt sich feststellen, dass eine Überexpression des GLUT-1-Moleküls nicht zu einer Erhöhung der Infektionsrate bei den beiden Zelllinien ARPE-19 und HOS führt. Für alle Versuchsreihen sollten dabei jedoch die Reproduzierbarkeit und so die möglichen Aussagen dieser Ergebnisse überprüft werden.

Dabei sollte immer bedacht werden, dass *in vitro* gemachte Ergebnisse nicht unbedingt für die Situation *in vivo* gelten. Beispielsweise könnte sich die Heparansulfat-Struktur der kultivierten Zellen von der von Primärzellen unterscheiden, wodurch sich Unterschiede in der Funktion im eigentlichen Gewebe ergeben [54]. Möglicherweise lassen sich also Ergebnisse bezüglich des Tropismus bzw. des Einflusses der Überexpression eines bestimmten Moleküls nicht auf die Verhältnisse im Organismus übertragen, sodass daraus auch keine Rückschlüsse auf mögliche Therapieansätze gezogen werden können. Außerdem könnten auch andere Moleküle als die bisher vermuteten an der Infektion beteiligt sein, möglicherweise auch abhängig vom Zelltyp, da bereits Zelllinien beschrieben wurden, bei denen beispielsweise GLUT-1 nicht an der Infektion beteiligt sein soll [16].

8 Ausblick

Zur Verifizierung der Aussage, dass die Überexpression des HTLV-1-Rezeptors GLUT-1 nicht zu einer Erhöhung der Infektionsrate in HOS- und ARPE-19-Zellen führt, sollten die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Versuche wiederholt und so ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden. Dabei bieten sich gleichzeitig Variationen der Durchführung an: Eine längere Inkubationszeit der Zellen nach der Infektion könnte genutzt werden, um zu untersuchen, ob diese Infektion bei den beiden untersuchten Zelllinien ARPE-19 und HOS produktiv ist, wie es bereits für die Zelllinie HOS von Clapham *et al.* beschrieben wurde [7]. Dabei sollte auch eine Untersuchung des Infektionsversuchs auf Proteinebene erfolgen, beispielsweise durch Anfärbung der Zellen mittels des aufgereinigten monoklonalen α -Tax-Antikörpers mit anschließender Analyse im FACS-Gerät. Um über weitere Positivkontrollen zu verfügen, sollten weitere HTLV-1-Proteine wie Tax, p15 NC und gp46 SU ebenfalls in den pTH-Vektor kloniert werden. Diese könnten dann zur Identifizierung von Banden in Western Blots dienen.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde lediglich die Überexpression mittels Fluoreszenz sowie Western Blot gezeigt, jedoch nicht bestimmt, wie stark diese war. Um eine genauere Aussage darüber machen zu können, ob die Überexpression von GLUT-1 die Infektionsrate von HTLV-1 erhöht, müsste eine Quantifizierung dieser Überexpression vorgenommen werden. So könnte die Infektionsrate in ein Verhältnis zur Überexpression des jeweiligen Transporters gesetzt werden und damit genauer bestimmt werden, wie die Infektionsrate beeinflusst wird. Um den möglichen Einfluss der Überexpression besser sichtbar zu machen, sollte außerdem die Transfektionseffizienz in ARPE-19- und HOS-Zellen erhöht werden und eine limitierende Anzahl an Viren für den Infektionsversuch eingesetzt werden, um multiple Infektionen zu verhindern.

Zusätzlich zu dem Transportermolekül GLUT-1 könnten auch NRP-1 und/oder HSPG, von denen ebenfalls eine Beteiligung an der Infektion von Zellen mit HTLV-1 berichtet wurde, überexprimiert und so die vermutlich zwischen ihnen stattfindenden Wechselwirkungen untersucht werden. Dadurch wäre die Entwicklung eines zellfreien Infektionsmodells *in vitro* möglich, um die Ergebnisse von Jones *et al.* zu bestätigen oder zu erweitern [23]. Durch Überprüfung der Reproduzierbarkeit des hier gemachten Ergebnisse könnte ein System für zellfreie Infektionen evaluiert werden. Aus den Erkenntnissen, wie die Infektion abläuft, könnten dann möglicherweise Ansätze für Therapien und die Verhinderung von zellfreien Infektionen entwickelt werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Alberts B (2008) *Molecular biology of the cell*, 5th edn. Garland Science, New York
2. Altamirano NA, Rocco C, Aulicino P, Sen L, Mangano A (2010) Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation. *Journal of virological methods* 170:160-164
3. Bai XT, Baydoun HH, Nicot C (2010) HTLV-I p30: a versatile protein modulating virus replication and pathogenesis. *Molecular aspects of medicine* 31:344-349
4. Bannert N, Schenten D, Craig S, Sodroski J (2000) The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus and macrophagetropic human immunodeficiency viruses. *Journal of virology* 74:10984-10993
5. Bittner JJ (1936) Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science* 84:162
6. Chanel C, Staropoli I, Baleux F, Amara A, Valenzuela-Fernandez A, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R (2002) Low levels of co-receptor CCR5 are sufficient to permit HIV envelope-mediated fusion with resting CD4 T cells. *Aids* 16:2337-2340
7. Clapham P, Nagy K, Cheingsong-Popov R, Exley M, Weiss RA (1983) Productive infection and cell-free transmission of human T-cell leukemia virus in a nonlymphoid cell line. *Science* 222:1125-1127
8. Coskun AK, Sutton RE (2005) Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. *Journal of virology* 79:4150-4158
9. Ellerman VB, Oluf (1908) Experimental Leukemia in Chickens. *Vorläufige Mitteilung, Centralbl. f. Bakteriol.*
10. Fan N, Gavalchin J, Paul B, Wells KH, Lane MJ, Poiesz BJ (1992) Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *Journal of clinical microbiology* 30:905-910
11. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau JM, Blot V, Janvier S, Arnulf B, van Endert PM, Heveker N, Pique C, Hermine O (2006) Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *Journal of virology* 80:6844-6854
12. Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O (2010) Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology* 7:99
13. Goncalves DU, Proietti FA, Ribas JG, Araujo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, Carneiro-Proietti AB (2010) Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clinical microbiology reviews* 23:577-589

Literaturverzeichnis

14. Hanon E, Stinchcombe JC, Saito M, Asquith BE, Taylor GP, Tanaka Y, Weber JN, Griffiths GM, Bangham CR (2000) Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* 13:657-664
15. Hruz PW, Mueckler MM (2001) Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Molecular membrane biology* 18:183-193
16. Jin Q, Agrawal L, Vanhorn-Ali Z, Alkhatib G (2006) GLUT-1-independent infection of the glioblastoma/astroglioma U87 cells by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology* 353:99-110
17. Jin Q, Agrawal L, VanHorn-Ali Z, Alkhatib G (2006) Infection of CD4+ T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. *Virology* 349:184-196
18. Jin Q, Alkhatib B, Cornetta K, Alkhatib G (2010) Alternate receptor usage of neuropilin-1 and glucose transporter protein 1 by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology* 396:203-212
19. Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW (2005) Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *Journal of virology* 79:12692-12702
20. Jones KS, Fugo K, Petrow-Sadowski C, Huang Y, Bertolette DC, Lisinski I, Cushman SW, Jacobson S, Ruscetti FW (2006) Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *Journal of virology* 80:8291-8302
21. Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW (2008) Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature medicine* 14:429-436
22. Jones KS, Huang YK, Chevalier SA, Afonso PV, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Gessain A, Ruscetti FW, Mahieux R (2009) The receptor complex associated with human T-cell lymphotropic virus type 3 (HTLV-3) Env-mediated binding and entry is distinct from, but overlaps with, the receptor complexes of HTLV-1 and HTLV-2. *Journal of virology* 83:5244-5255
23. Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Benit L, Ruscetti FW, Hermine O, Pique C (2011) Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* 3:794-810
24. Knight SC, Macatonia SE, Cruickshank K, Rudge P, Patterson S (1993) Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. *Advances in experimental medicine and biology* 329:545-549
25. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N (1993) In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196:25-33
26. Kurth R, Bannert N (2010) *Retroviruses : molecular biology, genomics and pathogenesis*. Caister Academic, Norfolk, UK

Literaturverzeichnis

27. Lambert S, Bouttier M, Vassy R, Seigneuret M, Petrow-Sadowski C, Janvier S, Heveker N, Ruscetti FW, Perret G, Jones KS, Pique C (2009) HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113:5176-5185
28. Liu B, Li Z, Mahesh SP, Kurup SK, Giam CZ, Nussenblatt RB (2006) HTLV-1 infection of human retinal pigment epithelial cells and inhibition of viral infection by an antibody to ICAM-1. *Investigative ophthalmology & visual science* 47:1510-1515
29. Liu J, Thorp SC (2002) Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Medicinal research reviews* 22:1-25
30. Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC (1992) Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS research and human retroviruses* 8:1699-1706
31. Mahieux R, Gessain A (2009) The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. *Pathologie-biologie* 57:161-166
32. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL (2003) The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115:449-459
33. Manel N, Kinet S, Battini JL, Kim FJ, Taylor N, Sitbon M (2003) The HTLV receptor is an early T-cell activation marker whose expression requires de novo protein synthesis. *Blood* 101:1913-1918
34. Manel N, Battini JL, Sitbon M (2005) Human T cell leukemia virus envelope binding and virus entry are mediated by distinct domains of the glucose transporter GLUT1. *The Journal of biological chemistry* 280:29025-29029
35. Mansky LM (2000) In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *Journal of virology* 74:9525-9531
36. Matsuoka M (2010) HTLV-1 bZIP factor gene: Its roles in HTLV-1 pathogenesis. *Molecular aspects of medicine* 31:359-366
37. McMahon RJ, Frost SC (1995) Nutrient control of GLUT1 processing and turnover in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 270:12094-12099
38. Meekings KN, Leipzig J, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR (2008) HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS pathogens* 4:e1000027
39. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H (2010) *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland
40. Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N (1996) Findings from the Miyazaki Cohort Study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 13 Suppl 1:S2-7
41. Nath MD, Ruscetti FW, Petrow-Sadowski C, Jones KS (2003) Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. *Blood* 101:3085-3092

Literaturverzeichnis

42. Nisole S, Stoye JP, Saib A (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nature reviews Microbiology* 3:799-808
43. Overbaugh J, Miller AD, Eiden MV (2001) Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 65:371-389, table of contents
44. Overbaugh J (2004) HTLV-1 sweet-talks its way into cells. *Nature medicine* 10:20-21
45. Pinon JD, Klasse PJ, Jassal SR, Welson S, Weber J, Brighty DW, Sattentau QJ (2003) Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of virology* 77:9922-9930
46. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:7415-7419
47. Posfai G, Plunkett G, 3rd, Feher T, Frisch D, Keil GM, Umenhoffer K, Kolisnychenko V, Stahl B, Sharma SS, de Arruda M, Burland V, Harcum SW, Blattner FR (2006) Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science* 312:1044-1046
48. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL (2005) Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058-6068
49. Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalgleish AG (1990) In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology* 64:5682-5687
50. Rous P (1911) A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *The Journal of experimental medicine* 13:397-411
51. Saggioro D, Silic-Benussi M, Biasiotto R, D'Agostino DM, Ciminale V (2009) Control of cell death pathways by HTLV-1 proteins. *Frontiers in bioscience* : a journal and virtual library 14:3338-3351
52. Setoyama M, Kerdel FA, Elgart G, Kanzaki T, Byrnes JJ (1998) Detection of HTLV-1 by polymerase chain reaction in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma. *The American journal of pathology* 152:683-689
53. Silic-Benussi M, Biasiotto R, Andresen V, Franchini G, D'Agostino DM, Ciminale V (2010) HTLV-1 p13, a small protein with a busy agenda. *Molecular aspects of medicine* 31:350-358
54. Spillmann D (2001) Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 83:811-817
55. Summers J, Mason WS (1982) Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29:403-415
56. Tailor CS, Nouri A, Kabat D (2000) Cellular and species resistance to murine amphotropic, gibbon ape, and feline subgroup C leukemia viruses is strongly influenced by receptor expression levels and by receptor masking mechanisms. *Journal of virology* 74:9797-9801

Literaturverzeichnis

57. Takenouchi N, Jones KS, Lisinski I, Fugo K, Yao K, Cushman SW, Ruscetti FW, Jacobson S (2007) GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology* 81:1506-1510
58. Trejo SR, Ratner L (2000) The HTLV receptor is a widely expressed protein. *Virology* 268:41-48
59. Van Prooyen N, Andresen V, Gold H, Bialuk I, Pise-Masison C, Franchini G (2010) Hijacking the T-cell communication network by the human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 (HTLV-1) p12 and p8 proteins. *Molecular aspects of medicine* 31:333-343
60. Weiss RA (2006) The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3:67
61. Zhao TM, Robinson MA, Sawasdikosol S, Simpson RM, Kindt TJ (1993) Variation in HTLV-I sequences from rabbit cell lines with diverse in vivo effects. *Virology* 195:271-274
62. Zhao TM, Robinson MA, Bowers FS, Kindt TJ (1995) Characterization of an infectious molecular clone of human T-cell leukemia virus type I. *Journal of virology* 69:2024-2030

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
<i>Aqua bidest</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
ATL	adulte T-Zell Leukämie
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CA	Capsid-Protein
CMV	Cytomegalovirus
BSA	Bovines Serumalbumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>env</i>	Gen für die Hüll-Proteine
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
eYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell scan</i>
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigungskonstante
G	Guanin
<i>gag</i>	Gen für die gruppenspezifischen Antigene
GALV	<i>gibbon ape leukemia virus</i>
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
gp	Glykoprotein
GLUT	Glucose-Transporter
h	Stunde
HAM	HTLV-assozierte Myelopathie
HBZ	<i>HTLV-1 bZIP factor</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus

Anhang - Abkürzungsverzeichnis

IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase
IPA	Immun-Peroxidase-Assay
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	molar
MA	Matrix-Protein
Min.	Minute
MLV	Maus-Leukämie-Virus
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
mRNA	Messenger-RNA
NC	Nucleocapsid-Protein
NIH	National Institutes of Health
NRP-1	Neuropilin-1
p	Protein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>pol</i>	Gen für die viralen Enzyme
PR	Protease
RNA	Ribonukleinsäure
qRT	quantitative Realtime-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sek.	Sekunde
SU	Surface-Protein
T	Thymin
TM	Transmembran-Protein
TSP	tropische spastische Paraparese
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt

10.2 Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Norbert Bannert bedanken für die Möglichkeit, meine Bachelorarbeit am Robert Koch-Institut anzufertigen, und für die Unterstützung, die ich in der gesamten Zeit erhalten habe.

Herrn Prof. Dr. Roland Lauster danke ich für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich Oliver Hohn für die oft zeitaufwändige Betreuung, für die zahlreichen Gespräche, Einblicke in die Thematik, Anregungen, konstruktiven Kritiken, die Unterstützung, Motivation und für die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten zu können.

Mein Dank gilt auch Veronika Lausch und vor allem Jana Langer für alle Hilfestellungen und Unterstützungen, die ich in der gesamten Zeit bekommen habe, und für alle aufmunternden Worte, wenn mal etwas nicht funktioniert hat.

Danke auch an meine lieben Mit-Bacheloretten Nina Hauck, Laura Schneider und Nadine Lehmann für die schöne Zeit, jede Menge Spaß im Labor und dafür, dass wir alle Höhen und Tiefen zusammen erlebt haben.

Nicole Norley danke ich für ihre hilfreichen Ratschläge bei der Antikörperaufreinigung sowie für ihre Unterstützung bei der Ultrazentrifugation, Dr. Kazimierz Madela für die Hilfe bei den Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop.

Mein Dank gilt natürlich auch allen anderen Mitarbeitern vom Fachgebiet 18, besonders Sabina Reichert und Cornelia Gericke für ihre immer gute Laune.

Und mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer in allem unterstützt. Ohne euch wäre Vieles nicht möglich gewesen.

10.3 Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass ich die von mir eingereichte Bachelorarbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Berlin, den 06.12.2012

Anna-Klara Amler