

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

LEBENSWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

MASTERARBEIT

ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES

MASTER OF SCIENCE

*„Untersuchungen zum Einbau des Ebolavirus-Hüllprotein in
retrovirale Partikel des humanen endogenen Retrovirus K113“*

*„Investigations into the incorporation of Ebola virus envelope
protein in human endogenous retrovirus K113 particles“*

vorgelegt von

Vanessa Böhmer

angefertigt im Fachgebiet 18 HIV und andere Retroviren
am Robert Koch Institut

Berlin, im September 2015

Zusammenfassung

Ausgehend von der Sequenz des humanen endogenen Retrovirus K113 (HERV-K113), welches auf Chromosom 19p13.11 in einem humanen Genom gefunden wurde, konnte in der Arbeitsgruppe ein virales Genom rekonstituiert werden, das der ehemals exogenen Form entspricht. Nach Transfektion dieses viralen Genoms in Zellen werden retrovirale Partikel gebildet, die schwach infektiös und nicht replikationskompetent sind. Durch ein bereits etabliertes, auf vier Plasmiden basierendes System ist es möglich den Einbau von anderen viralen Hüllproteinen in HERV-K113-Partikeln zu untersuchen. Innerhalb dieser Arbeit wurde anhand von Westernblot- und ELISA-Messungen gezeigt, dass der Einbau des Ebolavirus-Hüllproteins (EboV-Gp) in die retroviralen Partikel des HERV-K113 möglich ist und im Vergleich zu dem Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein (VSV-G) sowie dem ursprünglichen Glykoprotein von HERV-K113 (oricoEnv) keine verringerte Produktion der VLPs (virus-like particles) messbar war. Weiterhin führte die für HIV-1 und natives HERV bereits beschriebene produktionssteigernde Wirkung des humanen Staufen-1 Proteins auch in diesem System zu einer erhöhten Virusproduktion (Faktor 1,6) in der Zellkultur, obwohl die Menge des Staufen-1 für die optimalste Steigerung variiert. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten keine Deformierungen oder erkennbaren Auswirkungen auf die Morphologie der EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113-Partikel entdeckt werden. Die Ergebnisse einer Real-Time PCR deuteten darauf hin, dass die mit EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113-Partikel RNA enthalten und somit eine RNA-Verpackung stattgefunden hat. Schließlich konnte die Infektiosität dieser Viren in Infektionsversuchen nachgewiesen werden. Die Effizienz der Infektion mit EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113-Partikeln lag dabei oberhalb der Infektionsrate der Partikel, die das HERV-K113-Hüllprotein selbst tragen. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der Pseudotypisierung von HERV-K113-Partikeln mit VSV-G auch die Pseudotypisierung mit dem Hüllprotein des Ebolavirus möglich ist, ohne dass die Integrität der Viruspartikel gestört wird. Weiterhin ergeben sich Hinweise, dass die untersuchten Hüllproteine in verschiedenen Prozessen der HERV-K113 Assemblierung Einfluss haben können. Diese Experimente dienen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen, denn durch die schwache Immunogenität im Menschen könnten Partikel von endogenen Retroviren, die mit viralen Hüllproteinen pseudotypisiert sind, potentielle Vektoren darstellen, um Immunantworten gegen die nativen Hüllproteine zu induzieren und damit als Impfstoffe dienen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.1.2 Klassifikation der Retroviren	1
1.1.3 Genomischer und struktureller Aufbau von Retroviren	2
1.2 Endogene Retroviren (ERV)	6
1.2.1 Humanes endogenes Retrovirus HERV-K113	7
1.4 Pseudotypisierung und Gentransfer mittels Retroviren	10
1.5 Ebolavirus	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Laborgeräte	17
2.1.2 Chemikalien	18
2.1.3 Puffer	20
2.1.4 Bakterienstämme	21
2.1.5 Zelllinien	22
2.1.6 Nährmedium	22
2.1.7 Enzyme	22
2.1.8 Kits	23
2.1.9 Marker und Standards	23
2.1.10 Antibiotika	24
2.1.11 Antikörper	24
2.1.12 Konstrukte/Vektoren	25
2.1.13 Oligonukleotide	26
2.1.14 Software	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 DNA-Analytik	27
2.2.1.1 Chemische Transformation von Bakterien	27
2.2.1.2 Die Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.1.3 Sequenzierungs-PCR	28
2.2.1.4 Kolonie-PCR	29
2.2.1.5 Real-Time PCR	30

2.2.1.6 Plasmidpräparation (Mini- und Maxipräparation)	32
2.2.1.7 Spezifische Spaltung von DNA mittels TypII Restriktionsendonuklease	32
2.2.1.8 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese	33
2.2.1.10 Aufreinigung von PCR-Produkten	34
2.2.1.11 Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.2.1.12 Anlegen einer Übernachtskultur	35
2.2.1.13 RNA-Isolation	35
2.2.2. Protein-Analytik	35
2.2.2.1 SDS-Gelelektrophorese	35
2.2.2.2 Westernblot	36
2.2.2.3 <i>Stripping</i>	37
2.2.2.4 Immunfluoreszenz-Analyse transfizierter Zellen	37
2.2.2.5 CA-Antigen Capture ELISA / p27 ELISA	38
2.2.3 Zellkultur	38
2.2.3.1 Zellkultivierung	38
2.2.3.2 Auftauen von stickstoffgelagerten Zellproben	39
2.2.3.3 Transfektion von HEK 293T-Zellen	39
2.2.3.3.1 Polyfect Transfektion	39
2.2.3.3.2 Calcium-Phosphat Transfektion	40
2.2.3.4 Präparation von Zelllysaten	40
2.2.3.5 Ultrazentrifugation von Kulturüberständen	40
2.2.3.6 Herstellung pseudotypisierter HERV-K113 Reporterviren	41
2.2.3.7 Infektionsversuche mit pseudotypisierten Reporterviren	41
2.2.3.8 Luziferase Assay	42
2.2.3.9 Transmissionselektronenmikroskopie	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Konstruktion eines V5 getaggen VSV-G	43
3.2 Expressionsnachweis der Hüllprotein-Konstrukte	44
3.3 Pseudotypisierung von HERV-K113-Partikeln	47
3.3.1 Einfluss des V5-Tag an VSV-G auf die Produktion retroviraler Partikel	48
3.3.2 Produktion von EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113- Partikeln	49
3.3.3 Einfluss des EboV-Gp bei der Produktion und Ausschleusung von HERV-K113- Partikeln	50
3.3.4 Einfluss von Staußen-1 auf die Virusproduktion	52
3.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113- Partikeln	54
3.5 Messung des RNA-Gehalts mittels quantitativer Real-Time PCR	56
3.6 Infektiosität der Glykoproteine	57

4 Diskussion	60
5 Ausblick	70
Literaturverzeichnis	71
Eidesstattliche Erklärung	76

Abkürzungsverzeichnis

®	Eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
<i>Aqua bidest</i>	Aqua bidestilata
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumsulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
CA	Capsidprotein
CMV	Cytomegalovirus
CMVoriEGFP/EboV-Gp	mit EboV-Gp pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren
CMVoriEGFP/oricoEnv	mit oricoEnv pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren
CMVoriEGFP/Env Δ C659-699	mit Env Δ C659-699pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren
CMVoriEGFP/VSV-G	mit VSV-G pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren
CMVoriEGFP/HIV-1 Env Δ KS	mit HIV-1 Env Δ KS pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren
CrFK-Zellen	<i>Crandell feline kidney cells</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
ddNTPs	2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	<i>Escherischa coli</i>
EGFP	<i>green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay</i>
Env	Envelope
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigungskonstante (=9,81m/s ²)
<i>gag</i>	gruppenspezifische Antigene
h	Stunde
HBS	HEPES <i>Buffer Saline</i>

HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus K
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase
<i>in vitro</i>	im Glas
<i>in vivo</i>	im Lebendigen
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
Luzi	<i>Firefly-Luciferase</i>
M	Masseinheit für die molare Masse
MA	Matrixprotein
min	Minuten
ml	Milliliter
MMTV	Maus-Mammatumovirus
NaOH	Natriumhydroxyd
NC	Nukleocapsid
NEB	New England Biolabs
NK	Negativkontrolle
nt	Nukleotid/e
OD	Optische Dichte
oricoEnv	codon-optimiertes, originales Hüllprotein von HERV-K113 zum Zeitpunkt der Integration ins menschliche Genom
PB	Primer-Bindungsstelle
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Positivkontrolle
<i>rec</i>	<i>regulator of expression encoded by corf</i>

RLU	Lumineszenz (engl. relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
sek	Sekunde
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
ss	einzelsträngig
SU	Oberflächenglykoprotein (engl. surface unit)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop/ie
TM	transmembrane Untereinheit (engl. transmembrane unit)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U3	unique 3'
U5	unique 5'
VLPs	Virus-ähnliche Partikel (engl. virus like particles)
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
ZBS	ZBS Zentrum für biologische Sicherheit

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	17
Tabelle 2: Chemikalienliste	19
Tabelle 3: Puffer	20
Tabelle 4: Bakterienstämme.....	21
Tabelle 5: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	22
Tabelle 6: Enzyme.....	22
Tabelle 7: Kits.....	23
Tabelle 8: Marker und Standards	24
Tabelle 9: Antibiotika	24
Tabelle 10: Antikörper	24
Tabelle 11: Konstrukte/Vektoren	25
Tabelle 12: Oligonukleotide.....	26
Tabelle 13: Software	26
Tabelle 14: Ansatz für eine Polymerase-Kettenreaktion	28
Tabelle 15: Temperaturprofil einer PCR	28
Tabelle 16: Ansatz für eine Sequenzierungs-PCR.....	29
Tabelle 17: Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR.....	29
Tabelle 18: Kolonie-PCR Reaktion	30
Tabelle 19: Temperaturprofil der Kolonie-PCR	30
Tabelle 20: Real-Time PCR Reaktion	31
Tabelle 21: Temperaturprofil der Real-Time PCR.....	32
Tabelle 22: Beispielhafter Ansatz für einen Restriktionsverdau.....	33
Tabelle 23: Ligationsansatz.....	34
Tabelle 24: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels	36
Tabelle 25: Plasmid-DNA Mix zur Herstellung pseudotypisierter HERV-Reporterviren	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Retroviren.	2
Abbildung 2: Aufbau eines Retroviruspartikels.	3
Abbildung 3: Genomorganisation der Retroviren.	5
Abbildung 4: Organisation des Provirus von HERV-K (HML-2) und die RNA Transkripte.	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung von oricoEnv.	10
Abbildung 6: Transkription und Prozessierung des <i>Zaire-Ebolavirus</i> Glykoproteins.	13
Abbildung 7: Größenüberprüfung des <i>vsv-g</i> PCR-Produktes.	43
Abbildung 8: Schematische Darstellung der pTH-VSV-G Klonierung.	44
Abbildung 9: Westernblot-Analysen zum Expressionsnachweis der Hüllprotein-Konstrukte.	45
Abbildung 10: Immunfluoreszenz-Analysen zum Expressionsnachweis der Hüllprotein-Konstrukte.	46
Abbildung 11: Aufbau der HERV-K113 Reporterkonstrukte.	48
Abbildung 12: Vergleich von pCL-VSV-G und pTH-VSV-G.	49
Abbildung 13: Westernblot-Analysen zum Nachweis der Inkorporation des EboV-Gp in HERV-K113-Partikel.	50
Abbildung 14: Quantifizierung der Partikelproduktion durch einen p27 ELISA.	51
Abbildung 15: Westernblot-Analysen der Partikelproduktion pseudotypisierter HERV-K113-Viren.	52
Abbildung 16: Co-Expression des humanen Stufen-1 bei der HERV-K113-Partikelproduktion.	53
Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahme von CMVoriHERV-K113.	54
Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme von CMVoriEGFP/EboV-Gp Viruspartikeln.	55
Abbildung 19: RNA-Gehalt pseudotypisierter HERV-K113 Viren.	57
Abbildung 20: Infektionsversuche mit den pseudotypisierten Reporterviren.	58

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren wurden am Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt. 1908 induzierten Vilhelm Ellermann und Oluf Bang mit zellfreiem Plasma aus leukämieerkrankten Hühner eine Leukämie bei gesunden Tieren [1]. Kurze Zeit danach entdeckte der Amerikaner Peyton Rous, dass er mit Ultrafiltraten aus Geflügelsarkomen bei gesunden Hühnern eine Tumorentwicklung induzierte [2]. Die Ultrafiltrierbarkeit der Erreger schloss eine Zugehörigkeit zu den Bakterien aus und später wurden diese Erreger als Retroviren klassifiziert. Der Name Retrovirus wurde erstmals 1974 nach der Entdeckung der Reversen Transkriptase geprägt. Die reverse Transkriptase wurde 1970 unabhängig voneinander von Howard Temin und David Baltimore beim Studium der onkogenen Retroviren als charakteristisches Enzym dieser Viren identifiziert [3,4]. Retroviren werden mit weit verbreiteten Infektionskrankheiten assoziiert und können ganz unterschiedliche Symptome hervorrufen. Sie können u.a. schwerwiegende Tumorerkrankungen, Immundefizienzen oder neurologische Defekte auslösen. Retrovirusinfektionen kommen überwiegend bei Wirbeltieren (Säugetiere, Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische) vor. Das erste humane Retrovirus wurde 1980 von Poiesz in der Arbeitsgruppe um Robert Gallo entdeckt und erhielt den Namen humanes T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV-1) [5]. HTLV und das humane Immundefizienzvirus (HIV) gehören heute zu den bekanntesten humanen Retroviren. HIV ist der Erreger des erworbenen Immunschwäche Syndroms, abgekürzt AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), während HTLV-I adulte T-Zell-Leukämie und Tropische Spastische Paraparese oder auch HTLV-assoziierte Myelopathie (HAM) verursachen kann. Durch die globale Verbreitung von HIV Mitte der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts rückten die Retroviren in den Fokus des öffentlichen Interesses [6]. Zentrale Ziele der Retrovirologie heute sind die Behandlung und die Prävention von AIDS und die Verwendung von Retroviren als Genvektoren.

1.1.2 Klassifikation der Retroviren

Vor 1974 nannte man die Retroviren Oncornaviren (onkogene RNA-Viren). Eine Einteilung erfolgte anhand von morphologischen Unterschieden, die mithilfe elektronmikroskopischer Aufnahmen ermittelt werden konnten, in die Klassen A, B, C und D [7,8].

Mittlerweile wurde die Familie der *Retroviridae* vom ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) in die zwei Unterfamilien, *Orthoretrovirinae* und *Spumavirinae*, gegliedert.

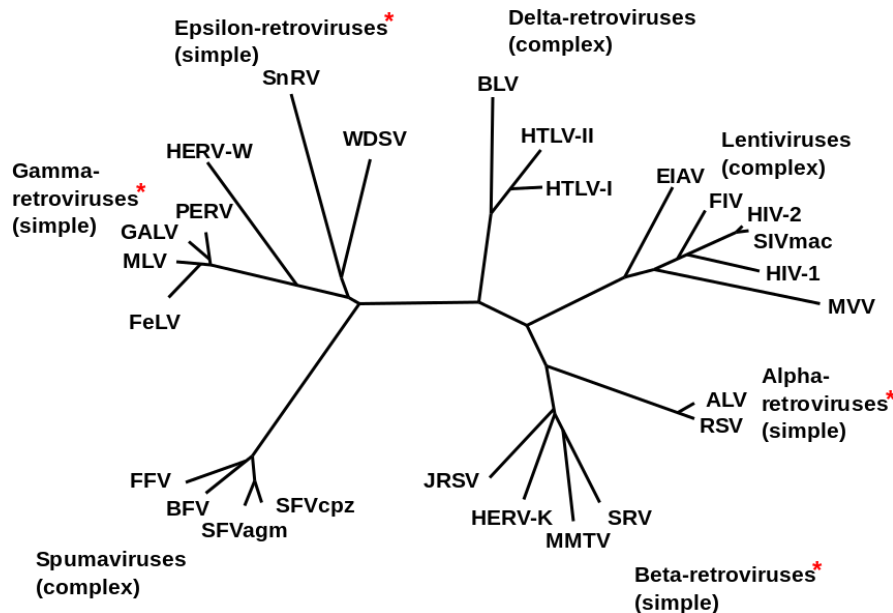


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der Retroviren. Der phylogenetische Baum der Retroviren umfasst die *Spumavirinae* und die *Orthoretrovirinae* mit den sechs Genera α -, β -, δ -, ϵ -, γ -Retroviren und die Lentiviren. Es ist zusätzlich zu entnehmen, ob es sich um einfache oder komplexe Retroviren handelt. Die mit einem roten Stern markierten Genera enthalten auch endogene Retroviren (Abbildung nach Weiss [9]).

Die *Spumavirinae* besitzen eine Sonderstellung in der Familie der *Retroviridae* und umfassen nur einen Genus, das Spumavirus. Die *Orthoretrovirinae* bestehen aus den sechs Genera Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilon-Retroviren und den Lentiviren (s. Abb. 1). Die taxonomische Einteilung der Familie *Retroviridae* basiert auf Unterschieden in der Morphologie und der Genomsequenz sowie auf Besonderheiten während der Replikation und der Pathogenese [10].

1.1.3 Genomischer und struktureller Aufbau von Retroviren

Bei der Familie *Retroviridae* handelt es sich um behüllte Viren. Die virale Lipiddoppelschicht stammt von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle. Der Aufbau eines retroviralen Partikels ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Der Durchmesser eines retroviralen Partikels beträgt circa 100 nm [10].

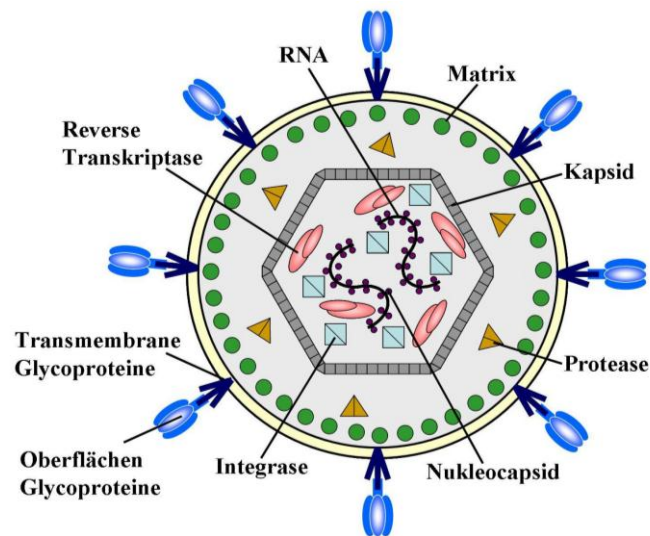


Abbildung 2: Aufbau eines Retroviruspartikels. Dargestellt ist ein schematischer Querschnitt durch ein retroviralen Partikel. Die Virushülle ist von einer zellulären Cytoplasmamembran abgeleitet, in die die viralen Glykoproteine eingelagert sind. Diese sind aus einer transmembranen (TM) und einer externen (SU) Komponente zusammengesetzt. Die inneren nicht glykosylierten Strukturproteine werden durch *gag* kodiert. Zu den Strukturproteinen gehören die Matrixproteine (MA), die Capsidproteine (CA) und die Nucleocapsidproteine (NC). Produkte von *pol* sind die reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Durch die Expression von *pro* wird die virale Protease gebildet. (modifiziert nach Coffin [11]).

Das Virusgenom besteht aus zwei identischen Molekülen einzelsträngiger RNA mit positiver Orientierung und hat durchschnittlich eine Größe von 7-12 kb. Die Organisation eines solchen Genoms ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Darstellung beinhaltet den Aufbau des RNA-Genoms von infektiösen Viruspartikeln und den Aufbau des Genoms nach Integration in das Wirtsgenom. Charakteristisch für die integrierte virale DNA (Provirus) sind die LTRs (long terminal repeat), die die mindestens vier vorhandenen Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env* der Retroviren flankieren. Die komplexen Retroviren (s. Abb. 1), wie die Lenti- und Spumaviren sowie die δ -Retroviren, besitzen zusätzliche Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine (z.B. Rev, Tat, Vpu usw.) kodieren. Die Translation dieser Proteine erfolgt von einfach und mehrfach gespleißten Transkripten. Die LTRs, bestehend aus den U3-, R- und U5-Bereichen (U = unique), sind regulatorische Sequenzen und befinden sich in gleicher Orientierung am 5'- und am 3'-Ende. Promotoren und cis-aktive Elemente sind in der U3-Region enthalten. Die Bindung von transaktiven zellulären Proteinen reguliert die virale Transkription und Genexpression. Nach dem R-Bereich folgt die U5-Region, die für die Integration des Provirus von Bedeutung ist. Hinter der U5-Region befindet sich die Primer-

Bindungsstelle (PB). Die PB ist 18 Basen lang und dient als Bindungsstelle für die spezifische, zelluläre tRNA, die als Primer für die reverse Transkription fungiert. Die Leader-Region, die zwischen der PB-Stelle und dem Beginn der gag-Gene liegt, enthält die Spleißdonor-Stelle (SD) und endet mit der ψ -Stelle, die als Verpackungssignal dient. Das gag (gruppenspezifische Antigene) kodiert für das Vorläuferprotein Gag. Dieses Polyprotein wird durch die virale Protease, die in dem *pro* (Protease) Gen kodiert ist, während der Reifung in Matrix-, Capsid- und Nucleocapsidproteine prozessiert. Die reverse Transkriptase, RNase H und die Integrase werden durch das *pol* Gen kodiert. Bei der retroviralen Replikation ist die hochkonservierte reverse Transkriptase das entscheidende Schlüsselenzym und daher ein Kennzeichen der Retroviren. Mit Hilfe dieses Enzyms sind die Retroviren in der Lage ihre (+)ssRNA in doppelsträngige (ds) DNA umzuschreiben. Die Integrase bewirkt anschließend die Integration in das Wirtsgenom. Da die reverse Transkriptase keinen Mechanismus zur Überprüfung der Lesegenauigkeit besitzt, wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} eine falsche Base bei der Synthese der dsDNA eingebaut. Dieser Vorgang trägt zur hohen Mutationsrate beim Provirus bei. Die Aktivität der RNA-Polymerase gewährleistet ihnen aber somit auch eine große genetische Variabilität und kann zur Bildung neuer viraler Spezies führen [12]. Die RNase H, eine zusätzliche Aktivität der reversen Transkriptase, baut den RNA-Anteil des DNA/RNA-Hybridstranges ab. Das env (Envelope, Glykoprotein) kodiert ebenfalls für ein Vorläufer-Polyprotein, das von einer einfach gespleißten mRNA translatiert wird und dann von einer Protease in zwei Proteine gespalten wird [13]. Das virale Oberflächenglykoprotein (SU, surface unit) ist bei der Rezeptorerkennung und -bindung beteiligt und das Transmembranprotein (TM, transmembrane) verankert den gesamten Hüllproteinkomplex in der Membran und vermittelt die Membranfusion und den Viruseintritt [14]. Am Ende der kodierenden Gene (3' des env-Gens) befindet sich der Polypurinbereich (PP). Das RNA-Genom eines infektiösen Viruspartikels besitzt eine 5'Cap-Struktur und eine Polyadenylierung am 3'-Ende, die auch eukaryotische mRNAs kennzeichnen. Die durch die RNA-Polymerase des Wirtes transkribierten RNA-Spezies dienen sowohl als mRNA für die Synthese viraler Proteine als auch als neues Genom für die Viruspartikel.

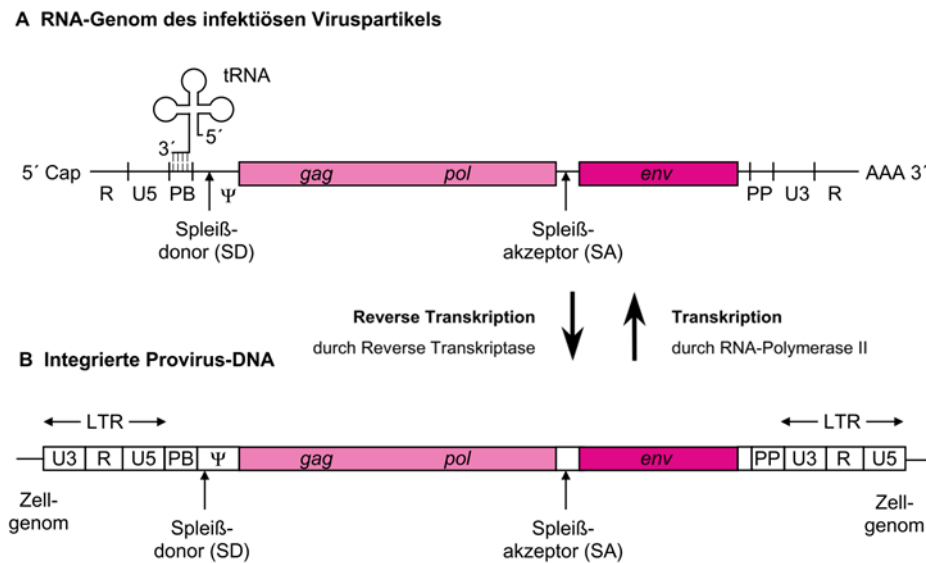


Abbildung 3: Genomorganisation der Retroviren. **A)** Aufbau des RNA-Genoms von infektiösen Viruspartikeln. Am 5'-Ende befindet sich eine Cap- Gruppe und das 3'-Ende ist polyadenyliert (AAA). Der Spleißdonor (SD)- und Spleißakzeptor (SA) dienen der Synthese jener mRNAs, von denen die Env-Proteine translatiert werden. R: wiederholte (redundante) Regionen; U3 und U5: einzigartige (unique) Regionen am 3'- bzw. 5'-Ende; PP: Polypurinstelle, PB: Primerbindungsstelle, Ψ : Verpackungssignal, *gag*: gruppenspezifisches Antigen, *pol*: Polymerase-Gen, *env*: Envelope-Gen. **B)**: Aufbau des Provirus nach Integration in das Wirtsgenom. Die LTRs (long terminal repeat) flankieren die Gene der Retroviren (modifiziert nach Modrow und Falke [10]).

Retroviren sind nur in der Lage Zellen zu infizieren, die den spezifischen Virusrezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Im Normalfall infizieren Retroviren somatische Zellen. Neu produzierte Viruspartikel werden freigesetzt und können weitere Körperzellen infizieren oder auch auf andere Individuen übertragen werden. Es ist aber auch möglich, dass Retroviren Keimbahnzellen, wie Oozyten oder Spermatozyten bzw. deren Vorläuferzellen, infizieren, denn auch diese besitzen Rezeptoren für Retroviren. Wenn es zur Befruchtung einer solchen Zelle kommt, wird jede einzelne Körperzelle des entstehenden Organismus an derselben chromosomalen Position das Provirus tragen. Diesen Prozess bezeichnet man als Endogenisierung [15,16]. Man unterscheidet daher auch zwischen exogenen und endogenen Retroviren. Exogene Viren können horizontal (von Person zu Person) übertragen werden, da in ihrem Genom alle Proteine kodiert sind, die für eine Infektion benötigt werden. Die Übertragung der endogenen Retroviren findet hingegen vertikal über die Keimbahnzellen statt.

1.2 Endogene Retroviren (ERV)

Endogene Retroviren (ERV) wurden zwischen den späten 60er und Anfang der 70er Jahre entdeckt [9]. Erst mit der Entdeckung der reversen Transkriptase wurde die Idee von ERVs, die aus einer Integration eines Provirus in die Keimbahn von Vertebraten resultieren und wie zelluläre Gene nach den Mendelschen Regeln vererbt werden, plausibler. ERVs können als vererbte genetische Elemente definiert werden, die sehr den Proviren ähneln, die nach einer Infektion exogener Retroviren gebildet wurden [17]. Endogene retrovirale Sequenzen sind Bestandteil der meisten eukaryotischen Genome und sind den exogenen Retroviren zahlenmäßig überlegen [18]. Durch die Kombination und die sorgfältige Analyse von virologischen und immunologischen Methoden mit der Mendelschen Genetik, wurden die ersten ERV entdeckt und später deren Existenz durch Detektionsmethoden für Nukleinsäuren bestätigt [9,19]. Durch Sequenzvergleiche hochkonservierter Regionen innerhalb des retroviralen Genoms, wie des pol Gens, können ERVs identifiziert werden [20]. Bisher konnten 31 verschiedene human endogene Retrovirus (HERV)-Familien identifiziert werden [21].

Reinfektion, Retrotransposition und Komplementation *in trans* sind Mechanismen der endogenen Retroviren, die über Millionen von Jahren dazu geführt haben, dass sich retrovirale Elemente über das gesamte Genom verteilt haben [16,22]. Die Produktion von exogenen, infektiösen Partikeln wird nur unter bestimmten Umständen aktiviert [10]. Nach der Integration des Provirus in das Genom, gibt es zwar keinen bekannten Mechanismus des Wirtes, um den integrierten Virus wieder komplett aus dem Genom zu entfernen, jedoch können Mutations-, Deletions- und Rekombinationsereignisse die offenen Leserahmen des Provirus im Laufe der Evolution so verändern, dass die Expression von funktionalen viralen Proteinen und die Bildung von infektiösen Viren nicht mehr möglich ist [19,23]. Durch homologe Rekombination zwischen zwei LTRs kann es zum kompletten Verlust der viralen Gene kommen, sodass nur noch eine einzelne LTR übrig bleibt [24]. Fast alle HERV-Genomsequenzen enthalten inaktivierende Mutationen. Es wird angenommen, dass keines der HERV zur Replikation fähig ist [25].

1.2.1 Humanes endogenes Retrovirus HERV-K113

Das 1990 offiziell gestartete Humangenomprojekt führte zur Entschlüsselung des kompletten menschlichen Genoms und zeigte, dass mehr genetisches Material des Genoms auf humane endogene Retroviren zurück zu führen ist als es humane Proteine kodiert [26,27]. HERV-Sequenzen machen etwa 8% des menschlichen Genoms aus. Vergleichsweise dient nur ~1 % des humanen Genoms zur Kodierung von Genen. Die retroviralen Elemente konnten durch phylogenetische Studien in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die HERV-K Gruppe kann in zehn Familien geteilt werden (HML-1-10), die alle zu den β -Retroviren gehören [28]. Die HERV-K Familie integrierte in das Primaten-Genom vor rund 30 Millionen Jahren und reintegrierte entweder durch Reinfektions- oder durch intrazelluläre Transpositionsprozesse innerhalb der letzten 200.000 Jahren [19]. HERV-K (HML-2) bildet wohl eine der jüngsten Familien von humanen endogenen Retroviren. Die Bezeichnung K erhielten diese wegen der Benutzung einer Lysin t-RNA, zur Initiation der reversen Transkription. Aufgrund der Beziehung zu dem murinen Betaretrovirus Maus-Mammatumovirus (MMTV) bekamen sie die zusätzliche Bezeichnung human MMTV like-2 (HML-2). Die meisten der 500.000 gefundenen HERV Elemente sind durch Nonsense-Mutationen oder große Deletionen defekt [19]. Bisher konnte kein replikationskompetentes HERV identifiziert werden. In einer humanen *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) Bibliothek wurde das humane endogene Retrovirus K113 entdeckt, das zu den zuletzt integrierten und am besten erhaltenen menschlichen Proviren gehört [29]. HERV-K113 besitzt für alle Gene offene Leserahmen und ist auf dem Chromosom 19p13.11 lokalisiert. Dieser Provirus ist am häufigsten (bis zu 30%) in der afrikanischen Bevölkerung verbreitet, welches die Hypothese unterstützt, dass die Integration im damaligen Afrika stattfand [29,30]. Der ungefähre Integrationszeitpunkt der HERV in das Genom kann mit Hilfe von Stammbaumanalysen und dem Vergleich der beiden retroviralen LTRs annähernd bestimmt werden. Retrovirale LTRs sind gewöhnlich zum Zeitpunkt der Integration des Provirus identisch [31]. Statistischen Schätzungen zu Folge, kommt es pro Jahr mit einer Wahrscheinlichkeit von $2,3 \times 10^{-9}$ bis 5×10^{-9} zu einem mutierendem Basenaustausch pro LTR [32]. Dies würde rechnerisch bedeuten, dass alle 200.000 bis 450.000 Jahre eine Veränderung in den LTRs auftritt [29]. Die flankierenden LTRs des HERV-K113 (HML-2) Provirus enthalten drei Sequenzunterschiede, weswegen die Integration des HERV-K113 Provirus vor ungefähr 600.000 Jahren stattgefunden haben könnte [33]. Konsensussequenzen von HERV-K(HML-2) Elementen sind fähig infektiöse Partikel zu produ-

zieren [25,33]. Diese Virionen sind zur Infektion und Integration in das Wirtsgenom fähig, jedoch konnte eine Replikation bisher nicht gezeigt werden. Durch die Korrektur von postinsertionalen Mutationen im jüngsten HERV-K113 erhielt man ebenfalls niedrige Level von infektiösen Partikeln, die nicht replikationskompetent sind [35]. Das HERV-K113 enthält den im Abschnitt der Retroviren erwähnten typischen Aufbau 5'-gag-pro-pol-env-3' (s. Abb. 4).

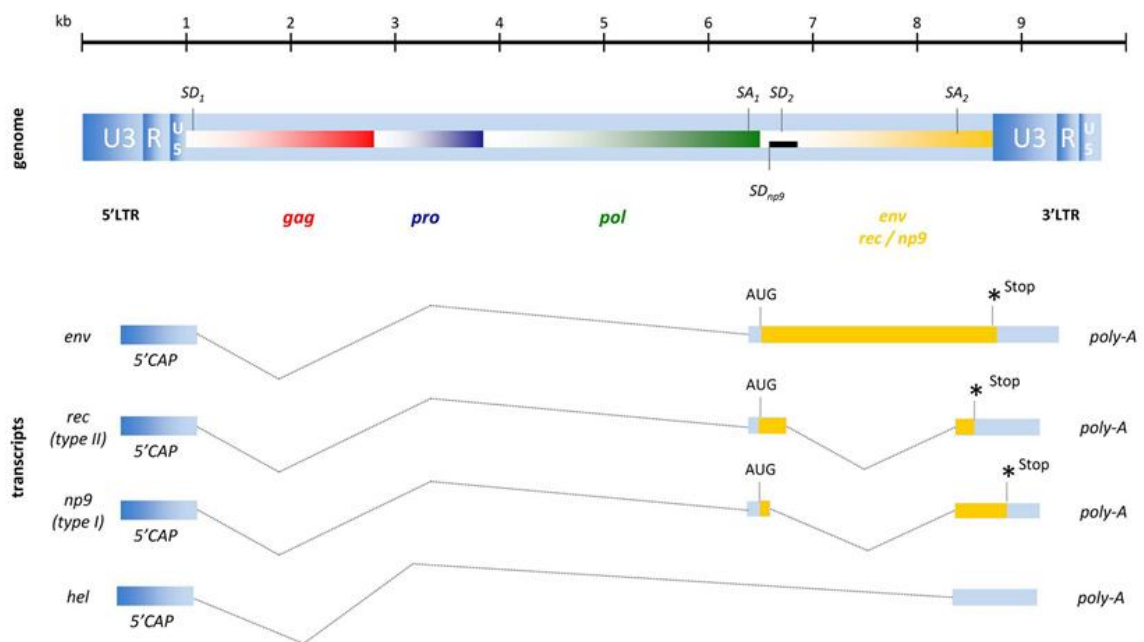


Abbildung 4: Organisation des Provirus von HERV-K (HML-2) und die RNA Transkripte. Das Genom besteht aus den Genen *gag*, *pro*, *pol* und *env*. Der schwarze Balken markiert eine 292 bp lange Deletion, die in Typ-1 HERV-K Proviren vorkommt und dafür verantwortlich ist, dass das Np9 anstatt des Rec (Typ-2 HERV-K Proviren) translatiert wird. Das *hel*-Transkript kodiert nicht für ein Protein und besitzt keine bekannte Funktion (nach Bannert, 2013 [16]).

Der Leserahmen des *env* enthält die genetische Information für das Hüllprotein. Zusätzlich zu den Strukturproteinen und Retrovirus-spezifischen Enzymen wurden zwei weitere Gene für die akzessorischen Proteine Rec und Np9 beschrieben. Im Genom existieren zwei Haupttypen von HERV-K (HML-2). Typ-1 Proviren unterscheiden sich durch eine 292 bp Deletion von Volllängen Typ-2 Proviren [16]. Diese Deletion verhindert die Expression des Rec, aber führt stattdessen zur Expression eines alternativen Proteins, namens Np9 [36]. Ein zweites Spleißereignis des *env* entfernt den großen Teil der codierenden Region und führt zur Translation von Rec [37]. Rec kodiert für ein 14 kDa großes Protein, das ein argininreiches Motiv für die Bindung von RNA und für

einige DNA bindende Proteine besitzt. Das Rec Protein ähnelt dem HIV Rev Protein in Hinsicht auf strukturellen Eigenschaften, intrazellulärer Lokalisation und Funktion [38]. Es besitzt ein NLS (*nuclear localization signal*) und ein NES (*nuclear export signal*) und es wurde gezeigt, dass Rec den Transport von ungespleißter oder teilweise gespleißter HERV-K mRNA vom Nucleus in das Cytoplasma vermittelt [16,38]. Rec hat ein tumorförderndes Potenzial. Es unterstützt Tumorstadium, wenn es in Nacktmäusen exprimiert wird [39]. Ein anderes potentiell 9 kDA großes Oncoprotein Np9 ist auch im Nucleus lokalisiert und hat im Gegensatz zu Rec keine bekannte physiologische Funktion in der HERV-K Replikation [36]. Weiterhin wurde ein 1,5 kb großes Transkript namens *hel* in humanen Teratocarcinoma-Zelllinien entdeckt. Diese mRNA kodiert nicht für ein Protein und die Funktion dieser mRNA ist noch unbekannt [37].

Das Hüllprotein von dem HERV-K113 Provirus zeigt nur eine schwache Expression in Säugetierzellen und ist nicht in der Lage in retrovirale Partikel eingebaut zu werden. Internes Spleißen, der niedrige GC-Gehalt von 42% und die Verwendung von seltenen Codons sind die wahrscheinlichsten Ursachen für die schlechte Expression des HERV-K113 Hüllproteins [40]. Durch eine Codonoptimierung, die Entfernung der internen Spleißstelle und einen antreibenden CMV-Promotor wurde ein Konstrukt namens *pcDNAcoEnv-V5* generiert, das zu einer Erhöhung (Faktor 50) der Expression führt. Um ein funktionelles Hüllprotein zum Zeitpunkt der Integration in das humane Genom zu rekonstituieren, wurden acht putative Protein-relevante postinsertionale Substitutionen identifiziert und revertiert. Vier davon befinden sich im Oberflächenglykoprotein (SU) und vier in der transmembranen Untereinheit (TM). Das resultierende *Env*-Konstrukt, namens *pcDNA3oricoEnv* (s. Abb. 5) stellt vermutlich das ursprüngliche HERV-K113 Hüllprotein (*oricoEnv*) dar. Die Inkorporation dieses ursprünglichen HERV-K113 Hüllproteins (*oricoEnv*) konnte sowohl in lentivirale Partikel als auch in HERV-K113-Partikel gezeigt werden [41]. Weiterhin war für einige Retroviren bekannt, dass eine C-terminale Trunkierung der cytoplasmatischen Domäne Einfluss auf den Einbau des Hüllproteins bzw. die Fusogenität haben kann [42-44]. Innerhalb dieser Arbeitsgruppe wurden drei Mutanten hergestellt (*oricoEnvΔ659-699*, *oricoEnvΔ680-699* und *oricoEnvΔ693-699*), bei denen die cytoplasmatische Domäne unterschiedlich stark trunziert wurde. Die am stärksten trunzierte Mutante *oricoEnvΔ659-699* wird am besten eingebaut und weist die höchste Infektiosität auf [40].

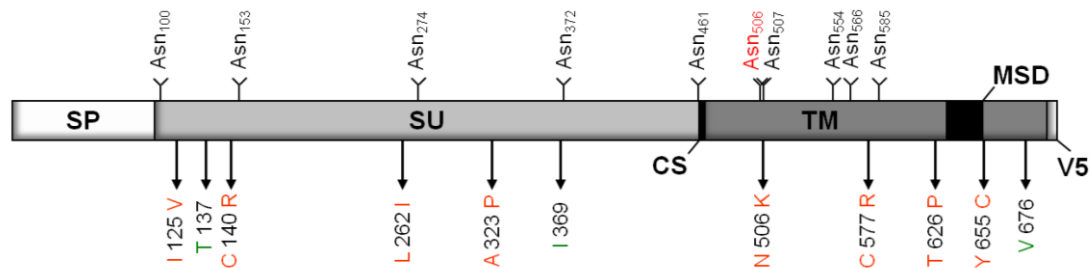


Abbildung 5: Schematische Darstellung von oricoEnv. Die acht postinsertionalen Mutationen (Rot dargestellt) wurden durch einen Sequenzvergleich von zehn hochkonservierten HERV-K(HML-2) Elementen identifiziert und eine Revertierung führte zur Generierung von oricoEnv. Vier der Aminosäuresubstitutionen sind im SU und vier im TM lokalisiert. Das oricoEnv enthält drei HERV-K113 spezifische Variationen (grün dargestellt). Weiterhin sind zehn potentielle Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) mit ihren Aminosäurepositionen aufgezeigt. Am C-terminalen Ende befindet sich das V5-Tag. Eine potentiellen Glykosylierungsstelle Asn506 wurde durch die Rekonstitution der originalen HERV-K113 Env-Sequenz eliminiert (nach Kramer, 2011 [41]).

1.4 Pseudotypisierung und Gentransfer mittels Retroviren

Viren können benutzt werden, um genetisches Material in Zellen einzubringen und somit eine Expression von z.B. Fluoreszenz-markierten Proteinen oder von Antigenen *in vivo* oder *in vitro* zu erzielen. Beispiele für Viren, die zum Gentransfer eingesetzt werden, sind Adeno-assoziierte Viren (AAV), Adenoviren aber auch Retroviren [45]. Für *in vitro* Untersuchungen werden häufig Retroviren eingesetzt, da hier die Expressionskassette in das Wirtsgenom integrieren kann und die Expression über längere Zeit möglich ist. Retrovirale Vektoren sind konstruierte Virusderivate, die typischerweise nicht replikationsfähig sind. Sie können genetisch so manipuliert werden (Entfernung von viralen Genen), dass nur noch eine *single-round* Replikation möglich ist. Nach Co-Transfektion von einem Vektor-DNA Konstrukt und Expressionsplamid(en) von viralen Genen in Herstellerzellen, können die geernteten virus-like particles (VLP) zur Infektion von Zielzellen verwendet werden. Die Nachkommen dieser VLPs sind nicht fähig erneut Zellen zu infizieren, was einen wichtigen Sicherheitsstandard darstellt [46]. Retrovirale Vektoren sind attraktiv, da diese eine Herstellung von stabil transformierten Zelllinien und die Expression der Gene von stark antreibenden Promotoren ermöglichen. Außerdem besitzen Retroviren ein breites Wirtsspektrum, welches eine Transduktion von vielen Zelllinien erlaubt [45].

Ein Mechanismus, der zur Erweiterung des zellulären Tropismus bei behüllten Viren führen kann, ist die Bildung von phänotypisch-gemischten Partikeln. Dieser Prozess geschieht üblicherweise während der viralen Assemblierung in Zellen, die von zwei oder mehreren Viren infiziert sind. [47]. Bei einer solchen Co-Infektion kann es zur Bildung von Hybrid-Virionen kommen, die die genetische Information des einen Virus enthalten, aber in denen ganz oder teilweise die Glykoproteine des co-infizierten Virus eingebaut sind [48]. Dieses Phänomen wird als phänotypisches Mischen bezeichnet und führt zu Bildung von sogenannten Pseudotypen. Die Virusnachkommen besitzen die phänotypischen Eigenschaften (z.B. Zelltropismus) des eingebauten Glykoproteins, ohne eine genetische Veränderung des Virus-Genoms hervorzurufen. Phänotypisches Mischen oder auch Pseudotypisierung hat sich als ein sehr nützliches Werkzeug erwiesen, um die biologischen Eigenschaften der Viren zu untersuchen [49]. Es ist ein wichtiges Forschungs- und Diagnostikwerkzeug für grundlegende und klinische virologische Studien. Es erleichtert die Untersuchung von einzelnen Genen, zellulären Rezeptoren, Antikörperantworten, Serosurveillance und antivirale Therapie [50]. Diese pseudotypisierten Viren finden erhöhten Verwendungszweck als Vakzin-Immunogen. Dabei wird das Antigen entweder auf der Oberfläche des Partikels präsentiert oder es findet, wie oben beschrieben, eine zelluläre Expression durch den Gentransfer statt [50]. Fortschritte in der Pseudotyp-Technologie revolutionieren die Forschung an wichtigen humanen und tierischen Pathogenen [51].

Aufgrund des sehr breiten Tropismus, hohen Titers und der Stabilität der erhaltenen Pseudotypen, war das Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein (VSV-G) eines der ersten Glykoproteine, die zur Pseudotypisierung von retroviralen Vektoren verwendet wurden [52]. VSV gehört zur Familie *Rhabdoviridae*. Die Verwendung des VSV-G zur Pseudotypisierung ist heute weit verbreitet und dient als nützlicher Standard zur Bewertung der Effizienz anderer Pseudotypen. Es können u.a. Vergleiche hinsichtlich der Titer, Viruspartikel-Stabilität, Toxizität und Wirtszellspezifität geschlossen werden [53].

1.5 Ebolavirus

Das Ebolavirus (EboV) ist eine Gattung aus der Familie der *Filoviridae* und hat eine uneinheitliche, pleomorphe Gestalt, die meist gestreckt und fadenförmig ist. Kennzeichnend sind membranumhüllte, filamentöse Partikel in der Form eines „Hirtenstabs“ oder in der Form eines "U" oder einer "6" [54]. Es besitzt ein in negativer Orientierung

einzelsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Genom, das etwa eine Größe von 18-19 kb hat und die zwischen den nichtcodierenden 3'- und 5'-Enden befindlichen sieben Gene in der Reihenfolge 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5' beinhaltet (s. Abb. 6) [10]. Mit Ausnahme des Gens für das Glykoprotein, sind alle Gene monocistronisch und kodieren für ein Strukturprotein [54]. Das Nucleoprotein (Np) umhüllt die virale RNA, die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L), den Polymerase-Cofaktor Vp35 (Virionprotein 35) und den Transkriptionsfaktor Vp30. Diese Nucleocapsidproteine sind für die Replikation und Transkription des viralen Genoms notwendig [55,56]. Weiterhin kodiert das Genom für die zwei Matrixproteine Vp40 (major) und Vp24 (minor).

Der primäre offene Leserahmen des Glykoproteins kodiert für ein 60-70 kDa großes Nichtstrukturprotein, das als sekretiertes Gp (sGp) bezeichnet wird [57]. Das Vorläufer pre-sGp wird durch post-transkriptionale proteolytische Spaltung der Furin-Protease in das sGP und das stark glykosylierte, kleine Nichtstrukturprotein Δ -Peptid gespalten [58]. Das sGP wird nicht in Viruspartikel eingebaut, sondern von infizierten Zellen sezerniert. Die Rolle des sGP in der Pathogenese bzw. dessen Funktion ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Es gibt aber Hinweise, dass es bei der Evasion vor der humoralen Immunantwort eine Rolle spielt, indem es die Aktivierung von Neutrophilen hemmt und Antikörper neutralisiert. Weithin soll das sGp als antiinflammatorischer Faktor agieren, der die endotheliale Barrierefunktion während der Infektion schützt [59,60]. Bei 20-25% der Transkriptionen kommt es durch RNA-Editing durch die Polymerase L zur fehlerhaften Insertion eines zusätzlichen Adenosins. Diese Insertion wird an einer sogenannte slippery site von sieben aufeinanderfolgenden Adenosinen begünstigt und führt zur einer Leserasterverschiebung (+1) [61]. Dieses Transkript führt zu einem 150 bis 170 kDa großes Vorläufer-Gp (pre-GP). Das pre-GP wird im trans-Golgi-Netzwerk durch die Furin-Protease in ein externes GP₁ (140 kD) und ein membranverankertes GP₂ (26 kD) gespalten, die durch eine Disulfidbrücke miteinander assoziiert bleiben [62]. Die Glykoproteine (Gp_{1,2}) sind in der Membran eingelagert, die von der Zellmembran des Wirtes abgeleitet ist. Das virale Glykoprotein ist das einzige Hüllprotein auf der Oberfläche der Viruspartikel und somit direkt dem Immunsystem zugänglich. Es handelt sich dabei um ein Typ-I-Membranprotein, das über einen hydrophoben Aminosäureabschnitt am Carboxyl-Ende in der Membran verankert ist [10]. Durch Entfernen des transmembranen Ankers wird zum Teil das GP₁ mit einem trunkierten GP₂ von infizierten Zellen und Viruspartikel abgegeben. Es konnte gezeigt werden, dass das Tumornekrosefaktor (TNF) - α konvertierende Enzym (TACE) an diesem Prozess beteiligt ist

[63]. Das Heterodimer $Gp_{1,2}$ assembliert zu 450 kDa großen Homotrimeren, die als Spikes etwa 7 nm aus der Virusoberfläche herausragen (s. Abb. 6).

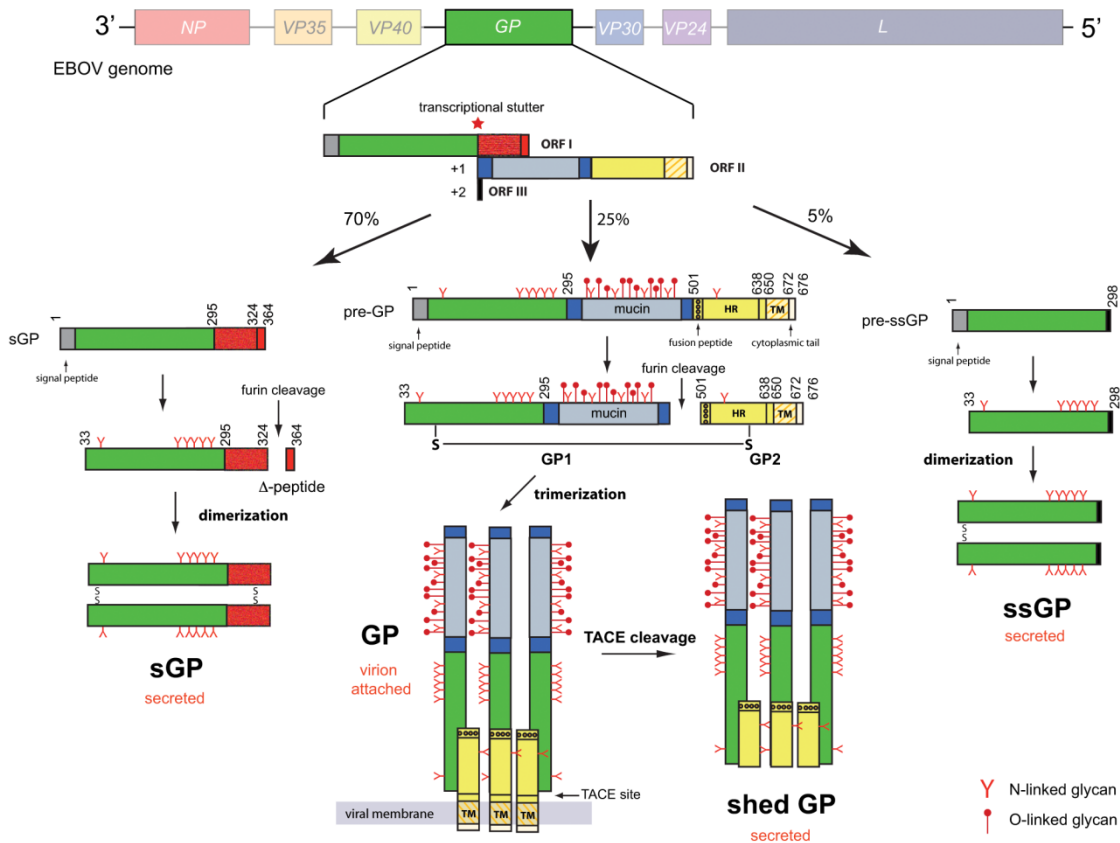


Abbildung 6: Transkription und Prozessierung des *Zaire-Ebolavirus* Glykoproteins. Der primäre offene Leserahmen des Ebolavirus GP kodiert für das sGP (dargestellt als grün/rotes Rechteck). Die proteolytische Spaltung des pre-sGP wird durch die Furin-Protease proteolytisch zu sGP und Δ -Peptid gespalten. Durch RNA-Editing entstehen die zwei zusätzlichen Glykoproteine GP (zu 25%) und ssGP (5%). Durch proteolytische Spaltung des Vorläufer-GP (pre-GP) durch die Furin-Protease resultieren die Untereinheiten GP₁ und GP₂, die durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Das trimerisierte GP_(1,2) bildet das virale Oberflächen-Peplomer. Die Aktivität des TNF- α -konvertierenden Enzyms führt zur Abspaltung der GP₂ Transmembran-Domäne, wodurch ein lösliches trimeres GP_(1,2) freigesetzt wird. ssGP ist ein kleines sekretiertes Glykoprotein, das die ersten 295 Aminosäuren mit sGP und GP teilt, aber einen anderen C-Terminus besitzt (gelb markiert). GP: Glykoprotein; sGP: Sekretiertes Glykoprotein; ssGP: klein, sezerniertes Glykoprotein; TACE: TNF- α -konvertierendes Enzym; TM: Transmembrananker (nach Lee 2013 [65]).

Für diese Trimerisierung ist eine vom GP₂ vor der Transmembranregion liegende Proteindomäne zuständig. Das $Gp_{1,2}$ vermittelt die Bindung, den Eintritt und die Fusion in die Zielzelle und erlaubt so die Replikation und Verbreitung des Ebolavirus. Das Glykoprotein besitzt eine starke Glykosylierung und ist sowohl N- und O-glykosidisch mo-

difiziert. Diese Modifizierung erhöht das experimentell ermittelte Molekulargewicht um etwa die Hälfte [10]. Das Gp₁-Protein besitzt eine mucin-ähnliche Domäne, die reich an Serin- und Threoninresten ist. Das transmembrane Glykoprotein (Gp_{1,2}) trägt zu den Symptomen des hämorrhagisches Fieber bei, indem es die Zellen des Retikulo-endotheliale System anzielt [54,64]. Zusätzlich zum sGP wurde ein zweites kleines sekretiertes Gp (ssGp) identifiziert, das durch Einfügen von zwei Nucleotiden oder Deletion eines Nukleotids in die mRNA durch RNA-Editing generiert wird. Es scheint, dass das ssGp und sGp ähnliche strukturelle Eigenschaften teilen aber nicht die gleiche anti-inflammatorische Funktion auf die endothelialen Zellen besitzt [66]. Jedes Genprodukt besitzt verschiedene biochemische und biologische Eigenschaften [64].

Das Ebolavirus wurde zuerst 1976 in Yambuku, *Zaire* (jetzt Demokratische Republik von Kongo) und Nzara, Südsudan entdeckt. Von dem Ort seiner Erstbeschreibung (1976), einem Nebenfluss des Flusses Kongo namens Ebola, erhielt der Virus seinem Namen [67]. Seitdem umfasst die Gattung die fünf Spezies *Zaire-Ebolavirus* (ZEBOV), *Sudan-Ebolavirus*, *Reston-Ebolavirus* (REBOV), *Tai-Forest-Ebolavirus* und *Bundibugyo-Ebolavirus*. Die Spezies *Zaire*, *Sudan* und *Bundibugyo* werden mit großen Ausbrüchen in Afrika mit hoher menschlicher Todesfallrate (25-90%) in Verbindung gebracht [68]. Seit der größten Ebolavirus-Epidemie im Jahr 2014, sind in Westafrika (Guinea, Liberia, Nigeria und Sierra Leone) tausende Menschen gestorben. Die Entwicklung der Epidemie ist bislang nicht eingedämmt. Das Ebolavirus verursachte mehr als 30 Ausbrüche, seitdem es 1976 identifiziert wurde [69]. Es verursacht im Menschen wie auch in anderen Primaten (Gorillas, Schimpansen) nach Infektion hämorrhagisches Fieber mit hoher Letalität (50-90%). Ebola ist eine Zoonose, jedoch sind das natürliche Reservoir und das Wirtsspektrum des Ebolavirus noch nicht genau bestimmt, obwohl man davon ausgeht, dass Flughunde das Reservoir für das Ebolavirus darstellen. Der Kontakt mit den Flughunden oder mit lebenden oder toten Tiere, die durch Flughunde infiziert wurden, kann den Menschen mit dem Ebolavirus infizieren [70]. Da das Ebolavirus zu den hochpathogenen Erregern gehört, dürfen Wissenschaftler nur in wenigen Laboren auf der Welt mit dem tödlichen Virus hantieren. Für die Arbeit mit dem Ebola Virus in Deutschland und in anderen Ländern sind Labore der höchsten Sicherheitsstufe (BSL-4) notwendig.

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Ebola besitzt eine hohe internationale Priorität. Bisher ist kein wirksamer Impfstoff mit Lizenz freigegeben, der vor der Infektion von Ebolaviren schützt. Es konnte aber bei mehreren experimentellen Impfstoff-Ansätzen eine vielversprechende Schutzwirkung bei nicht-menschlichen Primatenmodellen und Phase-1-Studien gezeigt werden (u.a. basierend auf replikationsinkompetente Adenoviren Serotyp 5). Ein rekombinant, replikationskompetent VSV-basierter Impfstoff, der auf seiner Oberfläche das Glykoprotein des *Zaire-Ebolavirus* (rVSV-ZEBOV) exprimiert, ist ein besonders vielversprechender Ebola Impfstoff-Kandidat [71,72]. In einer *cluster*-randomisierten Phase-3-Studien wurde kürzlich die Wirksamkeit des rVSV-ZEBOV Impfstoffes getestet und die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich dabei um ein sehr wirksamen und sicheren Impfstoff handeln könnte, der das Ausbrechen des Ebolafiebers verhindern könnte [73]. Das Glykoprotein ist eine entscheidende Komponente für Impfstoffe, als auch ein Ziel für neutralisierende Antikörper und Inhibitoren der Bindung und Fusion, da es sich als einziges auf der Oberfläche des Virus befindet und für Antikörper zugänglich ist [68].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Durch Rekonstitution eines potentiell replikationsfähigen Genoms des humanen endogenen Retrovirus (HERV)-K113 können virale HERV-Partikel erzeugt werden. In dieser Masterarbeit sollte nun untersucht werden, ob der Einbau viraler Glykoproteine anhand des Ebolavirus-Hüllproteins in retrovirale Partikel des humanen endogenen Retrovirus K113 möglich ist und ob die Pseudotypisierung die Produktion sowie die Integrität der viralen Partikel beeinflusst. Da die bereits vorliegenden Expressionskonstrukte für das Ebolavirus-Hüllprotein (EboV-Gp) und das parallel verwendete Hüllprotein von HERV-K113 (oricoEnv) mit einem V5-Detektionsepitop versehen waren, sollte zunächst auch das hier eingesetzte Vesicular Stomatitis Virus Hüllprotein (VSV-G) Konstrukt mit einem V5-Tag fusioniert werden. Die Expression sollte im Westernblot und durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Um den Einbau verschiedener Hüllproteine in die virale Membranhülle von HERV-Partikeln zu untersuchen, soll ein bereits etabliertes, auf vier Plasmiden basierendes System benutzt werden. Nach Transfektion der Plasmide in humane Zellen sollte die Produktion von viralen Partikeln gezeigt werden. Von aufkonzentrierten Virusüberständen sollten mittels Westernblot die jeweiligen Hüllproteine spezifisch nachgewiesen werden. Durch einen HERV-spezifischen ELISA wurde die Produktion von viralen Partikeln, die die unterschiedlichen Hüllproteine tragen, quantifiziert. Da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression des humanen Stufen-1 Proteins die Produktion von HERV-Partikeln steigert, sollte auch untersucht werden, ob dieses für EboV-Gp pseudotypisierte virale Partikel zutrifft. Weiterhin sollte mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden, ob die Pseudotypisierung Einfluss auf die Morphologie der HERV-Partikel hat. Ebenso sollte durch quantitative Real-Time PCR gezeigt werden, ob der Einbau des viralen RNA-Genoms durch die Pseudotypisierung mit EboV-Gp beeinflusst wird. Ob das EboV-Gp auf der viralen Hüllmembran eine korrekte Konformation besitzt, kann durch Infektionsversuche mit Viruspartikeln, die ein Reporter gen tragen, gezeigt werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse sollen zur Charakterisierung von viralen Partikeln des humanen endogenen Retrovirus-K113 beitragen sowie deren Pseudotypisierbarkeit mit weiteren viralen Hüllproteinen untersuchen. Die Möglichkeit HERV-Partikel zu pseudotypisieren könnte die Grundlage bilden HERV-Partikel als Träger von Antigenen bei der Immunisierung von Menschen einzusetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Eine Auflistung der benutzten Geräte und weiterer Materialien, ist in der Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Beckman Coulter-Counter Z2	Coulter Electronics Inc., Miami, USA
C24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
CO2-Inkubator C 200	Labotect, Göttingen, Deutschland
DNA Engine Thermocycler	BioRad, Hercules, USA
Dry Block Heater	Grant Instrument Ltd, Cambridgeshire, England
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Filmentwicklermaschine Agfa Curix 60	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Fume Hood	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
GelDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
Hettich Mikro 200R Zentrifuge	DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England
Horizontal Shaker 3006	GFL - Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Inkubationsschüttler Ecotron	Infors GmbH, Deutschland
Inkubator Innova 4330	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inverse Light Microscope ID03	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Konfokal Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Oak Ridge, USA
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Minidizer HB-500 Hybridization Oven	UVP, Upland, USA

Mini-PROTEAN® Tetra Cell Electrophoresis	BioRad, Hercules, USA
Multifuge 1S-R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Multifuge 3SR Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Nikon ECLIPSE TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
PowerPAC™ Basic	BioRad, Hercules, USA
PowerPAC™ HC	BioRad, Hercules, USA
Präzisionswaagen KERN	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Sprout® Mini-Centrifuge	Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	BioRad, Hercules, Californien, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, Californien, USA
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
UV Transilluminator TFX-20.M	Vilber Lourmat, Paris, Frankreich
Waage PR803	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Wasserbad	GFL-Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Materialien	
Extra Thick Blot Paper	BioRad, Hercules, USA
X-ray Film	Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA

2.1.2 Chemikalien

In der Tabelle 2 sind alle Chemikalien aufgelistet, die für die beschriebenen Experimente genutzt wurden.

Tabelle 2: Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller
30% Acrylamide	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agar-agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (w/v) 10% (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BigDye 3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
BSA 100x	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
dNTP's	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33528	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Paraformaldehyde (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Schwefelsäure, 2.5M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Super SignalWest Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Logan, USA
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Puffer

Eine Liste der benutzten Puffer und deren Zusammensetzung oder die Herstellerangaben sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Puffer

Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Probenpuffer	
6x DNA Ladepuffer	10 mM TRIS-Aceta, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0.4 % Orange-G (w/v) (Sigma) in <i>Aqua bidest</i>
2x Laemmli Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Puffer und Medien für Zellkultur	
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
2x HBS	50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Dinatriumhydrogenphosphat, <i>Aqua bidest</i> , pH 7.1 (eingestellt mit NaOH)
IGEPAL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland (<i>Aqua bidest</i> mit 0,5 % IGEPAL)
Isoton R II Diluent	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Medien für die Kultivierung von Bakterien	
LB-Agar	LB Medium enthält 20 g/L Agar-Agar
SOC-Medium	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
ELISA	
Carbonat-Bicarbonate Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
PBST	PBS mit 0.05 % Tween-20
Phosphat-Citrat Puffer 0.05 mM, pH 5.0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
PM	2 % Magermilchpulver in PBS
PMT	2 % Magermilchpulver in PBS mit 0.05 % Tween-20
SDS PAGE	
Stacking Gel Buffer 0.5 M Tris-HCL pH 6.8	BioRad, Hercules, Californien, USA

Resolving Gel Buffer 1.5 M Tris-HCL pH 8.8	BioRad, Hercules, Californien, USA
Running buffer	BioRad, Hercules, Californien, USA
Western Blot	
PMT	4 % Magermilchpulver in PBS mit 0.1 % Tween-20
Blot Transfer-Puffer	10 % 10xTris/Glycerin Puffer + 20 % Ethanol + 70 % <i>A.bidest.</i>
PBST	PBS mit 0.1 % Tween-20
Weitere Puffer	
Phosphate buffered saline (PBS)	137 mM Natriumchlorid, 2.7 mM Kaliumchlorid, 8.8 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 0.7 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH7.2
1x TAE	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Acetat, pH 8.0
DNA Polymerase Puffer	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Californien, USA
DNA Polymerase Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
T4 DNA Ligase Puffer	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
5X Sequenzierungspuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NEB Puffer	New England Biolabs Inc., Beverly, USA

2.1.4 Bakterienstämme

Für Bakterien-Transformationen wurden die Bakterienstämme verwendet, die in der Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Bakterienstämme

Bakterien	Hersteller
One Shot® TOP10 Chemically competent <i>E. coli</i>	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
One Shot® Stbl2 Chemically competent <i>E. coli</i>	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

2.1.5 Zelllinien

Für alle beschriebenen Experimente wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK) 293T (American Type Culture Collection ATCC®CRL-11268) verwendet. Bei den Infektionsversuchen wurden zusätzlich noch *Crandell Rees feline kidney* (CrFK)-Zellen (Katzennierenzelllinie), die ursprünglich aus den Nieren einer Hauskatze gewonnen wurde, eingesetzt.

2.1.6 Nährmedium

HEK 293T- und CrFK-Zellen wurde mit dem standardisierten Nährmedium Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), welches 1 g/L Glukose und L-Glutamin enthält und zusätzlich mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FKS versetzt wurde, kultiviert. *E.coli* Bakterienzellen wurden in LB (lysogeny *broth*)-Medium vermehrt. Die Zusammensetzung des LB-Mediums ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des LB-Mediums

Komponente	Konzentration
Hefe Extrakt	0,5 %
NaCl	1 %
Trypton	1 %
pH 7.0 mit NaOH	

2.1.7 Enzyme

Die Tabelle 6 enthält die Liste der verwendeten Enzyme.

Tabelle 6: Enzyme

Enzyme	Hersteller
0.05 % Trypsin (pH 7.2), 0.02 % EDTA in PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Agel	New England Biolabs® Inc.Ipswich, USA
AmpliTaq Gold®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

BamHI	New England Biolabs® Inc.Ipswich, USA
DraIII	New England Biolabs® Inc.Ipswich, USA
EcoRI	New England Biolabs® Inc.Ipswich, USA
HindIII	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
KpnI	New England Biolabs® Inc.Ipswich, USA
NotI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4 DNA Ligase	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
XhoI	New England Biolabs® Inc.Ipswich, USA

2.1.8 Kits

Alle eingesetzten Kits sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Kits

Kits	Hersteller
DNA-free™ DNA Removal Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Luciferase 1000 Assay System	Promega Corporation, Madison, USA
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PolyFect Transfection Reagent	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
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TOPO® TA Cloning R Kit for Sequencing	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

2.1.9 Marker und Standards

Eine Auflistung der verwendeten Marker und Standards befindet sich in der Tabelle 8.

Tabelle 8: Marker und Standards

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

2.1.10 Antibiotika

Eingesetzte Antibiotika sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Antibiotika

Antibiotika	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland

2.1.11 Antikörper

Die in Tabelle 10 aufgelisteten Antikörper wurden in Westernblot-, Immunfluoreszenz- und ELISA-Experimenten verwendet.

Tabelle 10: Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
F2 420-3 (IgM) α -EBOLA Gp	Maus	Niederstadt Dissertation, 2012
HERV-K_Env (A-h HERV K env 79kDa IgG2a 100)	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA
α VSV-G IgG (P5D4): sc-66180	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
α -Capsid-HERV-K	Ratte	George et al., 2011
α -Capsid-HERV-K	Kaninchen	Hohn et al., in Veröffentlichung

α -Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -Maus IgG Alexa-568	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
α -Maus IgG HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -Maus IgG IRDye800CW	Esel	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA
α -Maus IgM HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -Ratte IgG IRDye680RD	Ziege	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA
α -Ratte IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α -Ratte IgG-HRP	Ziege	BioLegend, San Diego, USA
α -V5 IgG	Maus	AbD Serotec, Raleigh, USA
α - β -Actin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.1.12 Konstrukte/Vektoren

Konstrukte und Vektoren, die in der Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Konstrukte/Vektoren

Konstrukte	Vektoren	Bezugsquelle
pcDNA4 Leervektor	pcDNA TM 4/V5-His	Life technologies, Thermo Fisher Scientific
Δ KS	pSVIII	Bannert et al., 2000; Helseth et al., 1990
CMV _{orico} GPP	pcDNA 3.1	George et al. 2011
CMV _{ori} EGFP	pTH	Kramer et al., in Veröffentlichung
CMV _{ori} Luci	pTH	Kramer et al., in Veröffentlichung
oricoEnv_V5	pcDNA3	Hanke et al.2009
orico Env $\Delta_{659-699}$ (Env Δ C)	pcDNA 3.1	Hanke et al.2009
orico Rec_V5	pcDNA 3.1	Hanke et al, 2012
pBSK ori HERV K113 full	pBSK	Chudak et al., 2013
pcDNA 3 5'UTR orico HERV 113	pcDNA 3	Hohn et al., 2014
pTH_zebov_GP4_V5	pTH	Niederstadt Dissertation, 2012

Staufen-1		Hanke, K., et al.2013
VSV-G (EnvVSV-G_V5)	pTH	Im Laufe der Arbeit erstellt

2.1.13 Oligonukleotide

In der Tabelle 12 befindet sich eine Liste der verwendeten Primer und deren Primersequenzen.

Tabelle 12: Oligonukleotide

Primer Name	Primersequenz 5' → 3'
BGH-Rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
EGFP-C-For	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
pcDNA CMV	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
pTH for	CTTTCCATGGGTCTTTTCTG
HERV-pFor	CCAACGTGGAGGCTTTTCTCTAG
HERVpVL-Rev2	CGTACTCGGGATCTCTCGTC
HERV Probe (FAM)	AGGTACGCTCGAGCGTGGTCATTGAGG
qHERV-U5 Rev	CTACACACCTGTGGGTGTTTCT
For_O Sequence pBSK ori HERV	GGCGATTAAGTTGGGTAACG
qRT-pBSK ori_Rev	TGAACAAGGCAAATCATTCA
Clon_pTH_VSV-G-For	GTACGTAAGCTTGCCACCATGaagtgctttgtacttag
Clon_pTH_VSV-G-Rev	ACGTACGGATCCTAGGTCATCCATctttccaagtcggtcatc

2.1.14 Software

Tabelle 13 zeigt eine Liste der Software, die zur Anfertigung der Arbeit genutzt wurde.

Tabelle 13: Software

Software
Microsoft Office 2010
Nanodrop ND-1000 v3.3
BioEdit
GraphPad Prism5

MxPro-Mx3005P

Adobe Photoshop CS5

MikroWIN 2000

Zen2012

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Analytik

2.2.1.1 Chemische Transformation von Bakterien

Durch eine Transformation kann Plasmid-DNA gezielt in *E.coli* eingebracht und somit amplifiziert werden. Die bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten Zellen (Top 10, Stbl2) wurden auf Eis aufgetaut. Für jeden Transformationsansatz wurde ein $50\ \mu\text{l}$ Aliquot der chemisch kompetenten Zellen verwendet. Entweder wurde $1\ \text{ng}$ DNA oder $1,5\ \mu\text{l}$ eines Ligationsansatzes vorsichtig durch rühren zu den chemisch kompetenten Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für genau 25 Sekunden mit anschließender Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Danach wurde $250\ \mu\text{l}$ vorgewärmtes SOC Medium zu jedem Ansatz gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Durch LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum konnten plasmidtragende Klone selektioniert werden. Es wurden $50\ \mu\text{l}$ und $200\ \mu\text{l}$ auf die Antibiotika tragenden LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden verkehrt herum bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.2 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle Methode zur Amplifikation von definierten DNA-Bereichen. Die durch die Polymerasen-Kettenreaktion hergestellte Menge an identischer DNA wurde für molekulare und genetische Analysen verwendet. Für jeden PCR Ansatz wurden spezifische Primer für das jeweilige DNA Segment verwendet. In der Tabelle 14 ist ein Beispiel für eine PCR Reaktion aufgeführt.

Tabelle 14: Ansatz für eine Polymerase-Kettenreaktion

Komponenten	Konzentration	Volumen/Menge
Template	10-30 ng	5 µl
Polymerase Puffer	10x	2,5 µl
dNTPs	2,5 mM	1 µl
Forward Primer	10 µM	1 µl
Reverse Primer	10 µM	1 µl
Polymerase	-	0.125 µl
<i>Aqua bidest</i>	-	Ad 25 µl

Die Tabelle 19 zeigt ein beispielhaftes Temperaturprofil einer PCR. Die Gradzahl der *Annealing*-Temperatur ist mit einem X gekennzeichnet, da diese Temperatur von den verwendeten Primer abhängig ist.

Tabelle 15: Temperaturprofil einer PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen	Schritt
95°C	10 min	1	Initiale Denaturierung
95°C	30 s	35	Denaturierung
X°C	20 s		Annealing
72°C	1,5 min		Elongation
72°C	5 min	1	Finale Elongation
4°C	∞		

Die Zeit des Elongationsschrittes ist ebenso variabel, denn sie hängt von der Länge des amplifizierten Segments ab.

2.2.1.3 Sequenzierungs-PCR

Für die Sanger Sequenzierung wurde das Applied Biosystems ABI BigDye® Terminator v3.1 Verfahren verwendet. Der Mix besteht aus einer AmpliTaq-DNA-Polymerase, dNTPs und einen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphat-Mix (ddNTPs). Die Komponenten der Sequenzierungsreaktion sind in der Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 16: Ansatz für eine Sequenzierungs-PCR

Komponenten	Konzentration	Volumen/Menge
Template	-	150-300 ng
Abi BigDye 3.1 Puffer	5x	1,5 µl
Sequenzierungsprimer	10 µM	0,5 µl
BigDye 3.1	-	1 µl
<i>Aqua bidest</i>	-	ad 10 µl

Die Tabelle 16 zeigt das genutzte Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR. Im Sequenzierungslabor des Robert Koch-Institutes wurden die generierten DNA-Fragmente sequenziert und die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe von BioEdit.

Tabelle 17: Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen	Schritt
96°C	2 min	1	Initiale Denaturierung
96°C	10 s	25	Denaturierung
X°C	10 s		Annealing
60°C	4 min		Elongation
4°C	∞		

2.2.1.4 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR war eine schnelle Überprüfung des Klonierungserfolg möglich, da als DNA-Vorlage keine gereinigte Plasmid-DNA benötigt wird, sondern von der Agarplatte direkt eine Bakterienkolonie gepickt werden konnte. Die gepickte Kolonie wurde in 10 µl *Aqua bidest* resuspendiert und 5 µl der Suspension wurden als Template in der PCR Reaktion verwendet.

Tabelle 18: Kolonie-PCR Reaktion

Komponenten	Konzentration	Volumen/Menge
Template	-	5 µl
Polymerase Puffer	10x	2,5 µl
DMSO	50 %	2,5 µl
dNTPs	2,5 mM	1 µl
Forward Primer	10 µM	0,5 µl
Reverse Primer	10 µM	0,5 µl
AmpliTaq Gold®	250 $\frac{U}{\mu l}$	0,125 µl
<i>Aqua bidest</i>	-	ad 25 µl

Das Temperaturprofil der Kolonie-PCR ist in der Tabelle 19 gezeigt. Für die vollständige Aufbrechung der Bakterienzellen wurde die initiale Denaturierung um 15 min verlängert, sodass sichergestellt ist, dass es zur Freisetzung der Template DNA kommt und diese für die PCR Reaktion verfügbar ist.

Tabelle 19: Temperaturprofil der Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen	Schritt
95°C	15 min	1	Initiale Denaturierung
95°C	20 s	35	Denaturierung
X°C	20 s		Annealing
72°C	1 min		Elongation
72°C	5 min	1	Finale Elongation
4°C	∞		

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Der Rest der Bakteriensuspension von positiven Klonen konnte zum Animpfen von Übernachtskulturen verwendet werden.

2.2.1.5 Real-Time PCR

Die Real-Time-PCR basiert auf dem Verfahren der Polymerasen-Kettenreaktion, bei der aber bereits während der Amplifikation des DNA-Segmentes die Menge an neu gebildetem Produkt über die Zunahme der freigesetzten Fluoreszenz verfolgt werden

kann. Zusätzlich zu den Primern enthält die Reaktion eine Sequenz spezifische Sonde, welche mit einem Reporter Fluorophor und einem Quencher gekoppelt ist. Während die Sonde frei vorliegt oder an der DNA gebunden ist und die Polymerase noch nicht ihre 5' zu 3' Exonuklease Aktivität ausgeübt hat, unterdrückt die Nähe des Quenchers die Fluoreszenz des Reporters durch den Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer. Wenn durch die Polymerase die Sonde hydrolisiert wird und somit die Nähe des Quenchers zum Reporter zerstört wird, kann die Fluoreszenz des Reporters nach Anregung mit einem Laser detektiert werden. Nach jedem PCR-Zyklus erfolgt eine Messung des Fluoreszenzsignals. Der Ct- Wert (*cycle threshold*) gibt den Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal das Hintergrundsignal übersteigt.

Tabelle 20: Real-Time PCR Reaktion

Komponenten	Konzentration	Volumen / Menge
Template	-	5 µl
5x Qiagen RT-PCR Puffer	5x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1 µl
dNTPs	10 mM	1 µl
Rox	10 µM	0,125 µl
HERV-pFor	10 µM	1 µl
HERV pVL-Rev2	10 µM	1 µl
HERV Probe (FAM)	10 µM	0,5 µl
Qiagen Enzym-Mix	-	1 µl
RNase-freies Wasser	-	ad 25 µl

Die Tabelle 20 zeigt den Reaktionsansatz für eine Real-Time PCR und die Tabelle 21 das Temperatur Profil. Die Real-Time PCR Reaktion erfolgte im Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System. Um den RNA-Gehalt von Virusüberständen zu messen, muss ein reverse Transkriptase Schritt zu Beginn der der Real-Time PCR erfolgen. Zur Vermeidung der Messung von zuvor vorhandener DNA (genomische oder auch Plasmid-DNA) wurde ein DNase-Verdau mit dem DNA-free™ DNA Removal Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 21: Temperaturprofil der Real-Time PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen	Schritt
50°C	30 min	1	Reverse Transkription
95°C	15 min	1	Initiale Denaturierung, Inaktivierung RT
95°C	30 sec	45	Denaturierung
54°C	1 min		Annealing
72°C	30 sec		Elongation

2.2.1.6 Plasmidpräparation (Mini- und Maxipräparation)

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden abhängig von der benötigten Menge an Plasmid-DNA das „QIAprep Spin Miniprep“ oder QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Das QIAGEN Plasmid Purification Protocol basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen, mit anschließender Bindung der Plasmid-DNA an die QIAGEN *Resin*. RNA, Proteine und Verunreinigungen werden durch das Waschen entfernt und die gereinigte DNA wurde mit *Aqua bidest* eluiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den Herstellerangaben.

2.2.1.7 Spezifische Spaltung von DNA mittels *Typl* Restriktionsendonuklease

Typl Restriktionsendonucleasen schneiden DNA-Moleküle sequenzspezifisch. Als Alternative zur Sequenzierung konnten Plasmide zur Kontrolle verdaut und im Agarosegel getestet werden. Außerdem wurden die Restriktionsendonucleasen verwendet, um Überhänge für eine Ligation zu schaffen. Ist es notwendig die DNA nach Überprüfung im Agarosegel wieder mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit zu isolieren, sollten 5 µg DNA für den Restriktionsverdau verwendet werden. In der Tabelle 22 ist ein beispielhafter Restriktionsverdau gezeigt. Der Ansatz kann auf größere Volumina erhöht werden, wenn die DNA in einer zu niedrigen Konzentration vorliegt. Es ist wichtig zu beachten, ob die Temperatur und Pufferbedingungen der Enzyme übereinstimmen. Der Restriktionsverdau erfolgte für 2 h bei 37°C.

Tabelle 22: Beispielhafter Ansatz für einen Restriktionsverdau

Komponenten	Volumen / Menge
DNA	5 µg
Enzym 1	1 µl
Enzym 2	1 µl
Puffer	2 µl
10 x BSA	2 µl
<i>Aqua bidest</i>	Ad 20

2.2.1.8 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten durch einen elektrischen Strom. Mit Hilfe eines kommerziellen Größenstandards kann man den DNA-Fragmenten eine molekulare Größe zuordnen. Ethidiumbromid dient als Fluoreszenzfarbstoff, um die DNA im Agarosegel zu detektieren. Es wurden 0,8-1,5 %ige (w/v) Agarosegele angefertigt und die entsprechende Menge an Agarose abgewogen und durch Erhitzen in der Mikrowelle in 50 ml (kleines Gel) oder 100 ml (großes Gel) 1x-TAE-Puffer gelöst. Die Verdampfte Flüssigkeit wurde gewogen und wieder zugefügt. Abhängig von der Größe des Gels wurden 2-4 µl Ethidiumbromid zugegeben. Das fertige Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gegeben und mit 1x-TAE-Puffer übergossen. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versehen und in die Taschen des Gels pipetiert. Es wurde ein Generuler 1 kb Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80V. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA, konnten die DNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Entweder wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA gereinigt oder es wurde für die Dokumentation des Gels ein Foto angefertigt.

2.2.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Um sicherzugehen, dass bei der PCR das richtige DNA-Fragment amplifiziert wurde, wurde das PCR-Produkt erst im Agarosegel überprüft. Es erfolgte eine Auftrennung der Nukleinsäuren über Gelelektrophorese. War die gewünschte Bande des Zielfragmentes via Transluminator identifizierbar, wurde diese mit einem gereinigten Skalpell aus

dem Gel ausgeschnitten und mittels „QIAquick Gel Extraction“ Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die aufgereinigte DNA wurde mit 50 µl *Aqua bidest* eluiert

2.2.1.10 Aufreinigung von PCR-Produkten

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

2.2.1.11 Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten

DNA Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe eines DNA-Doppelstrangs mit der freien 3'-OH-Gruppe eines anderen oder auch des gleichen DNA-Moleküls. Mit Hilfe von designten Primer wurde das gewünschte Gen mittels einer PCR amplifiziert. Der Verdau des Vektors und Inserts erfolgte mit dem gleichen Satz an Restriktionsendonukleasen, um dann das DNA Fragment in den Vektor zu ligieren. Die Menge des Inserts (X ng) wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor[ng]} * \text{Insertgröße [Kb]}}{\text{Vektorgröße [Kb]}} * \text{molares Verhältnis Insert/Vektor}$$

Der Ligationsansatz ist in der Tabelle 23 gezeigt.

Tabelle 23: Ligationsansatz

Komponenten	Volumen/Menge
Vektor	1 µl
Insert	X ng
10x T4 Ligase Puffer	1 µl
T4 Ligase	1 µl
<i>Aqua bidest</i>	Ad 10 µl

2.2.1.12 Anlegen einer Übernachtskultur

Bei -80°C gelagerte Glycerolstocks von Bakterien oder Kolonien von einer Agarplatte wurden in 2 ml LB Medium mit geeignetem Antibiotikum über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 220 rpm herangezogen. Aus den Übernachtskulturen wurden die gewünschten Plasmide aufgereinigt oder die Übernachtskulturen wurden zum Animpfen einer Maxikultur verwendet, um eine Maxipräparation durchzuführen.

2.2.1.13 RNA-Isolation

Um die enthaltene RNA der retroviralen Partikel zu messen, erfolgte zunächst eine RNA-Isolation. Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen benutzt und alle Arbeitsschritte erfolgten nach den Herstellerangaben.

2.2.2. Protein-Analytik

2.2.2.1 SDS-Gelelektrophorese

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wird für die Proteinanalytik angewendet und dient zur elektrophoretischen Trennung von Proteine nach ihrer Länge. Zur Anfertigung von 1,5 mm dicken Gelen mit einem Anteil von 15 % Acrylamid für das Trenngel und 5% für das Sammelgel, wurde das Bio-Rad System verwendet. Die genaue Zusammensetzung des Polyacrylamidgels ist in der Tabelle 24 aufgelistet. Die Proben wurden mit 2x Leamli Sample Buffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 5-10 min bei 95°C gekocht, um eine komplette Linearisierung der Proteine sicherzustellen. Wegen der großen Zahl an SDS-Molekülen pro Proteinmolekül, besitzt der SDS-Protein-Komplex eine negative Gesamtladung. Die Trennung der Proteine erfolgt nach der Größe. Die kleineren Proteine wandern in Abhängigkeit von der Stromstärke und dem Acrylamid-Anteil schneller durch das Gel als die größeren Proteine. Zum Sammeln der Proteine lief das Gel zunächst 10 min bei 100 V und die weitere Trennung der Proteine erfolgte bei 180 V für weitere 45-55 min. Im Anschluss wurde das Polyacrylamidgel für 10 min in Transferpuffer gelegt und dann sofort für Western-blot-Analysen weiter verwendet.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels

Komponenten	Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
Aqua bidest	4,8 ml	5,7 ml
30% Acrylamide	10 ml	1,7 ml
Resolving gel buffer	5 ml	-
Stacking gel buffer	-	2,5 ml
10 % SDS	200 µl	100 µl
Ammonium persulfate (w/v) 10%(APS)	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

2.2.2.2 Westernblot

Zur dauerhaften Fixierung der Proteine auf eine Membran wird das Westernblot- Verfahren angewendet. Die zuvor im Gel elektrophoretisch getrennten Proteine wurden durch das Anlegen einer Spannung im halbtrockenen Blotverfahren (*semi-dry blot*), bei dem der Transfer über lediglich puffergesättigte Filterpapiere erfolgt, auf die PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wird zuerst mit reinem Ethanol für 5 min aktiviert und dann wie das Gel ebenfalls in Transferpuffer kurz inkubiert. Wie ein Sandwich angeordnet, befindet sich die Membran und dann das Gel zwischen zwei Filterpapieren (Extra Thick Blot Paper). Das Blotting erfolgte für 38 min bei 20 V. Danach wurde die Membran dreimal mit PBST gewaschen. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen während der Inkubation der Antikörper, wurde die Membran 30-60 min bei RT in PMT (4 % Magermilchpulver in PBS) inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in den entsprechenden Verhältnissen eingesetzt und in PMT verdünnt. Die Membran wurde für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Überschüssiger primärer Antikörper wurde durch drei- bis sechsmal Waschen von je 5-10 min entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in PMT verdünnt und für eine 1 h bei RT inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert und katalysiert die Chemolumineszenzreaktion des Luminols. Zur Entfernung des sekundären Antikörpers wird die Membran wieder mit PBST gewaschen. Der HRP-konjugierte Antikörper wurde mit dem Super Signal West Dura Extended Duration Substrat detektiert. Durch das Auflegen eines Röntgen Filmes auf die Membran in einer lichtundurchlässigen Entwicklermappe, wurde die entstandene

ne Lichtreaktion auf den Röntgen Film eingefangen und in der Filmentwicklermaschine Agfa Curix 60 entwickelt. Zur Dokumentation wurden die Filme eingescannt.

2.2.2.3 Stripping

Um auf einer Membran verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Antikörpern zu detektieren, müssen die Antikörper durch Strippen wieder von der Membran entfernt werden. Dazu wurde der Restore Western Blot Stripping Puffer verwendet. Das Strippen erfolgte nach Herstellerangaben. Die Membran wurde erneut für 30-60 min in PMT geblockt und dann wie in 2.2.2.2 Westernblot mit dem primären Antikörper fortgeföhren.

2.2.2.4 Immunfluoreszenz-Analyse transfizierter Zellen

Bei der Immunfluoreszenz können mit Hilfe von Antikörpern, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert sind, spezifische Antigene in transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurden 10^5 HEK 293T Zellen in einer 6-well Platte auf Deckgläschen, die zuvor einmal mit 70 % Ethanol und dreimal mit PBS gewaschen wurden, ausgesät. Sobald die Zellen am nächsten Tag eine 40 %ige Konfluenz aufwiesen, folgte die Transfektion mit dem PolyFect Transfection Reagent. Nach 18 h und 40 h wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz fixiert. Dazu wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen dreimal mit 1 ml/well PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 % Paraformaldehyd für 30 min bei 37 °C fixiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Das Permeabilisieren der Zellen erfolgte mit 0,5% TritonX-100 in PBS für 15 min und danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Geblockt wurde mit 1 % Magermilchpulver in PBS für 20 min. Der primäre Antikörper wurde in 1 % Magermilchpulver in PBS in die benötigte Konzentration verdünnt und die Zellen wurden damit 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung vom überschüssigen primären Antikörper wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der Fluorophor-konjugierte sekundäre Antikörper, ebenfalls in 1 % Magermilchpulver in PBS verdünnt, wurde für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen. Um die Zellkerne (Nukleinsäuren) sämtlicher Zellen sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit dem Hoechst-Reagenz (1:20; 1 ml/well) für 10 min bei RT inkubiert und anschließend wurde es mit einem weiteren Waschschrift entfernt. Mowiol 4-88 diente zur Fixierung des Deckglases umgedreht auf einen Objektträger. Die Proben

wurden mit Hilfe des Confocal laser scanning Mikroskop von Zeiss (LSM 780) analysiert.

2.2.2.5 CA-Antigen Capture ELISA / p27 ELISA

Zur Quantifizierung der Viruslast im Zelllysat und Virusüberstand diente der Capture Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Der p27 ELISA dient zum Nachweis des Capsidproteins des humanen endogenen Retrovirus K113. Der Antikörper HERMA 7 [74] wurde in einer vorher ermittelten Verdünnung in Carbonatpuffer verdünnt (1:100) und eine 96-well Mikrotiterplatte damit über Nacht bei 4°C gecoatet (50µl/well). Die 96-well Mikrotiterplatte wurde dreimal mit PBST gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte wurde diese mit 200 µl/well PM geblockt. Die Proben wurden durch Zugabe von Tween-20 für eine 0,02 % Endkonzentration für 10 min bei RT inaktiviert und 50 µl/well der Probe wurden bei 37°C für 1h inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde dreimal mit PBST gewaschen. Der primäre Antikörper α-Capsid HERV-K wurde in PMT verdünnt (1:5000) und die Mikrotiterplatte mit 50 µl/well für 1h bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der sekundäre Antikörper α-Ratte IgG-HRP von BioLegend in PMT verdünnt (1:2500) und die Mikrotiterplatte mit 50 µl/well für 1h bei 37°C inkubiert. Es folgte ein abschließender Waschschrift. Zum Schluss wurde eine 5 mg OPD (o-Phenylenediamine) Tablette und 12 µl 30 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in 12,5 ml Phosphat-Citrat Puffer pH 5.0 gelöst und 50µl/well wurden auf die Mikrotiterplatte gegeben. Die Reaktion wurde nach 10-15 min mit 25 µl/well 25 %iger Schwefelsäure gestoppt. Die OD-Werte wurden bei 492 nm im Microplate Reader Sunrise (ELISA Reader) gemessen.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Zellkultivierung

Für die Kultivierung der verschiedenen eukaryotischen Zelllinien wurden 75 cm² oder 150 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Um Säugerzellkulturen *in-vitro* ähnlichen Umgebungsbedingungen wie im lebenden Organismus zu bieten, wurden sie bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Die verwendeten HEK 293T- und CrFK-Zellen wurden in DMEM (engl. = Dulbecco's modified Eagle's medium), welches 1 g/l Glukose

und L-Glutamin enthielt und mit 10% Fetales Kälberserum (FKS) und 0,5% Penicillin/Streptomycin ergänzt wurde, angezogen. Alle 48-72 h wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde zuerst das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert. Die Zellen wurde durch Zugabe von frischem Medium in Suspension gebracht und 1:5-1:10 in neuem Medium verdünnt.

2.2.3.2 Auftauen von stickstoffgelagerten Zellproben

Die in einem Stickstofftank gelagerten Zellen wurden in einem Wasserbad aufgetaut und dann in ein mit 10 ml DMEM befülltes 50 ml Falcon gegeben. Zum Ausverdünnen wurden das 50 ml Falcon mit PBS auf 40 ml aufgefüllt und dann bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und durch auf dem Kopf stellen des 50 ml Falcons wurde es vollständig von Flüssigkeit befreit. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche gegeben und wie oben beschrieben kultiviert.

2.2.3.3 Transfektion von HEK 293T-Zellen

Transfektion ist eine Methode mit der es möglich ist, fremde DNA in Zellen einzuschleusen, um so eine Expression der kodierten Gene zu erreichen. Man unterscheidet grob in biologische, chemische und physikalische Transfektionsmethoden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene chemische Transfektionsmethoden angewendet, bei denen entweder die Plasmid-DNA in Calciumkristalle oder Dendrimerstrukturen eingebettet und von Zellen aufgenommen wird.

2.2.3.3.1 Polyfect Transfektion

Wenn für eine Transfektion HEK 293T-Zellen in 6 well oder 12 well Platten ausgesät wurden, erfolgte die Transfektion mit dem PolyFect Transfection Reagent von Qiagen. Die Transfektion wurde nach dem Protokoll für transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen durchgeführt.

2.2.3.3.2 Calcium-Phosphat Transfektion

Die Calcium-Phosphat Transfektion wurde für die Transfektion in 100 mm Schalen angewendet. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät. Alle Reagenzien wurden auf RT gebracht. In 1,5 ml Eppendorfgefäße wurden 500 µl 2x HBS Puffer vorgelegt. Die 30 µg Plasmid-DNA wurde mit *Aqua bidest* auf ein Volumen von 450 µl gebracht und unter Vortexen wurden 50 µl 2,5 M CaCl₂ dazu gegeben. Der DNA/CaCl₂ Mix wurde tropfenweise zu dem 2x HBS Puffer zugeführt und für 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erhielten frisches DMEM-Medium. Nach der Inkubation wurde das 1 ml Präzipitat unter Schwenken auf die Zellen getropft. Die Schale wurde erschütterungsfrei in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurde das alte Medium entfernt und neues Medium zu den Zellen gegeben.

2.2.3.4 Präparation von Zelllysaten

Die Zellkulturschale mit den transfizierten Zellen wurde zunächst auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und das PBS wieder entfernt. Der kalte IGEPAL-Lysepuffer (0,5 % IGEPAL in *Aqua bidest*) wurde frisch mit Protease-Inhibitor versetzt und auf die Zellen gegeben. (1 ml pro 100 mm Schale; 0,2 ml pro Loch eine 6-well Platte). Die adhärennten Zellen wurden mittels eines Zellschabers in ein vorgekühltes Mikrozentrifugenröhrchen übertragen. Bei leichtem schütteln bei 4°C wurden die Zellen für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden für 20 min bei 2300 g und 4°C zentrifugiert. Die Mikrozentrifugenröhrchen wurden vorsichtig aus der Zentrifuge entnommen und auf Eis gestellt. Der Überstand wurden in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet entsorgt. Die Zelllysate wurden bei -20 C gelagert.

2.2.3.5 Ultrazentrifugation von Kulturüberständen

Die Kulturüberstände wurden 48 nach der Transfektion geerntet, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2254 g und 4°C für 10 min zellfrei-zentrifugiert. Die Kulturüberstände wurden auf eine 8 ml 20%ige Sucroselösung geschichtet und mit 20 µl Colloidal Gold versetzt. Mit PBS wurde das Zentrifugenröhrchen bis zum Rand aufgefüllt und anschließend in die Zentrifugenbuckets gegeben. Bei 175.000 g und 4 °C wurden die pseudotypisierten Viren für 3h pelletiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde der

Überstand verworfen und das Zentrifugenröhrchen zur völligen Entleerung auf den Kopf gestellt. Das Pellet wurde in 100 µl 0,05 M HEPES resuspendiert und bei -80°C gelagert. Bei einer Transfektion von 6-well Platten wurden die Virusüberstände (~1,8 ml) zellfrei-zentrifugiert, jedoch durch das geringe Volumen in einer Tischzentrifuge bei 27670 g pelletiert.

2.2.3.6 Herstellung pseudotypisierter HERV-K113 Reporterviren

Um pseudotypisierte HERV-K113-Reporterviren zu erzeugen, wurden HEK 293T-Zellen mit einem Mix aus Plasmid-DNA von insgesamt ~30 µg oder 2 µg transfiziert. In der Tabelle 25 ist die Zusammensetzung des Plasmid Mix aufgeführt. Die Transfektion erfolgte wie in 2.2.3.3 beschrieben wurde.

Tabelle 25: Plasmid-DNA Mix zur Herstellung pseudotypisierter HERV-Reporterviren

Plasmid-DNA	Menge		Prozentual
	100 mm Schale	6 well Platte	
CMVoriLuzi/EGFP	18 µg	1,2 µg	60 %
CMVoricogPP	5 µg	0,332 µg	16,7 %
oricoRec	5 µg	0,332 µg	16,7 %
Env	~1,8 µg	0,132 µg	6,6 %

2.2.3.7 Infektionsversuche mit pseudotypisierten Reporterviren

Wie in 2.2.3.3 beschrieben, wurden HEK 293T-Zellen transfiziert. Nach 72 h wurde der produzierte Virusüberstand für Infektionsversuche geerntet. Pseudotypisierte Viren, die infektiös sind, lassen auf einen korrekten Einbau und Funktionalität der Hüllproteine schließen. Der Virusüberstand wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2254 g und RT für 10 min zellfrei-zentrifugiert. Um die gleiche Anzahl an Viruspartikel für jeden Infektionsansatz zu verwenden, fand eine Normalisierung des Virus durch einen p27 ELISA (s. 2.2.2.5) statt. Die höher konzentrierten Virusüberstände wurden mit DMEM-Medium verdünnt. Die somit normalisierten Viruspartikel wurden mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt und 500 µl auf die ein Tag zuvor in einer 24-well Platte ausgesäten Zellen gegeben. Die Platte wurde mit einer Klebefolie beklebt und die Spin-Inokulation erfolgte bei 1200 g und bei RT für 2 h. Nach der Spin-Inokulation wurde 1

ml DMEM-Medium, welches ebenfalls mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt wurde, auf die Zellen gegeben und für 48 h bei 37°C inkubiert. Für die Quantifizierung der infizierten Zellen kann ein Luziferase Assay oder die Betrachtung der grün fluoreszierenden Zellen unter einem Mikroskop angeschlossen werden.

2.2.3.8 Luziferase Assay

Die Nukleotidsequenz des Luziferase-Gens stammt aus *Photinus pyralis*, ein Käfer aus der Familie der Leuchtkäfer (Lampyridae). Bei den infizierten Zellen, die das Luziferase-Gen exprimieren, erfolgte eine Messung der Luziferase-Aktivität. Die Firefly Luziferase katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, welches die Emission von Licht zu Folge hat.



Die Stärke der Biolumineszenz korreliert mit der Menge an Luziferase und somit mit der Menge an infizierten Zellen. Der Virusüberstand wurde entfernt und die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Präparation der Zelllysate erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Promega Luciferase Assay System). Für die Zellyse wurde der Passive Lysis Puffer verwendet. In eine 96 well Platte wurden 20 µl/well des infizierten Zelllysats gegeben und mit Hilfe des Injektors wurden 100 µl/well Luziferase-Assay-Reagenz ergänzt. Die Luziferase-Aktivität wurde mittels des Luminometer Centro LB 960 bestimmt.

2.2.3.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Transfizierte HEK 293T-Zellen wurden mit 2,5 %igen Glutaraldehyd in 0,05 M HEPES (pH 7,2) überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Der Virusüberstand wurde wie in 2.2.3.5 beschrieben pelletiert. Weder die Zellen noch das Viruspellet dürfen für die nächsten Schritte antrocknen. Die weitere Fixierung, Einbettung und Anfertigung der Aufnahmen von den Dünnschnitten bei der Transmission-Elektronenmikroskopie erfolgten im elektronenmikroskopischen Labor von ZBS4 des Robert Koch-Institutes.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion eines V5 getaggen VSV-G

Es ist bekannt, dass HERV-K113-Partikel mit dem VSV-G pseudotypisiert werden können und es möglich ist, verschiedene humane und tierische Zellen zu infizieren. Da die im weiteren verwendeten Hüllproteine von HERV-K113 und Ebola ein V5-Tag tragen, der eine parallele Detektion im Westernblot erlaubt, soll auch das vorliegende Hüllprotein vom Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) in ein Expressionsvektor kloniert werden, der die V5-Tag Sequenz C-terminal an das VSV-G fusioniert (s. Abb. 8). Das V5-Tag soll der späteren Detektion des Hüllproteins dienen. Es wurden zwei Primer (Clon_pTH_VSV-G-For, Clon_pTH_VSV-G-Rev) designt, die in einer PCR eine Amplifizierung der Sequenz für das *vsv-g* aus dem pCL-Vektor ermöglichten und zusätzlich zwei Restriktionsschnittstellen für die *TyplI* Restriktionsendonucleasen *Bam*HI bzw. *Hind*III an die amplifizierten Sequenzen anfügten. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel überprüft und zeigte die erwartete Größe für das *vsv-g* bei 1533 bp (s. Abb. 7, Spur 1-4). Die vier Ansätze wurden für die PCR-Aufreinigung vereint.

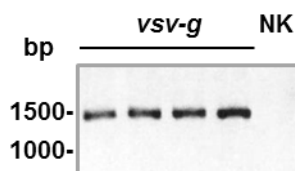


Abbildung 7: Größenüberprüfung des *vsv-g* PCR-Produktes. Die PCR-Produkte von vier Ansätzen wurden mit einem 6x DNA Ladepuffer versetzt und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Der Größenstandard Generuler 1kb DNA Ladder wurde zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente mitgeführt. Als Negativkontrolle diente *Aqua bidest*.

Der pTH-Vektor enthielt bereits die Sequenz für das C-terminale V5-Tag und wurde wie das amplifizierte *vsv-g* mit den Restriktionsendonucleasen *Bam*HI bzw. *Hind*III geschnitten. Dadurch ist eine Ligation des PCR-Produktes im Leseraster für das V5-Tag möglich. Eine anschließende Ligation führte zur Generierung des pTH-VSV-G Vektors. Das V5-Tag erhöht das Molekulargewicht des VSV-G um ~1,7 kDa. Eine partielle Sequenzierung des pTH-VSV-G Vektors bestätigte den Erfolg der Klonierung.

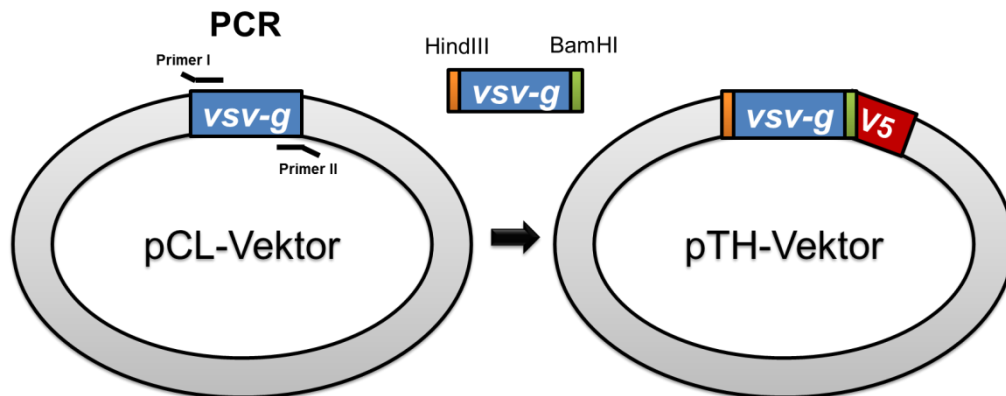


Abbildung 8: Schematische Darstellung der pTH-VSV-G Klonierung. In einer PCR wurde das vsv-g durch zwei designte Primer aus einem pCL-Vektor amplifiziert und zusätzlich durch diese mit zwei Restriktionsschnittstellen ergänzt. Durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BamHI konnte das vsv-g in den pTH-Vektor kloniert werden. Der pTH-Vektor enthielt bereits die Sequenz für das V5-Tag.

3.2 Expressionsnachweis der Hüllprotein-Konstrukte

Zunächst soll gezeigt werden, dass die für die Pseudotypisierung vorgesehenen Hüllproteine von ihren Plasmidkonstrukten exprimiert werden. Durch vorige Arbeiten lagen die Expressionsplasmide für das Ebola-Hüllprotein (pTHzebovGP4_V5, kurz EboV-Gp) [75] und das HERV-K113-Hüllprotein (pcDNA3oricoEnv_V5, kurz oricoEnv) [40] bereits vor. Für die Konstruktion des pTHzebovGP4_V5 Expressionsplamids wurde eine publizierte Sequenz des kodierenden Gens von der *Zaire-Ebolavirus* Spezies für das Vorläuferglykoprotein preGp verwendet. Diese Sequenz des Glykoproteins wurde für die optimale Expression in Säugerzellen codonoptimiert und die für den Leserahmenwechsel verantwortliche „slippery site“ im Bereich des Gp₁ entfernt, sodass es nicht zur Synthese des sekretierten Glykoproteins (sGp) kommt. Das oricoEnv wurde ebenfalls codonoptimiert und auch hier wird durch die entfernte interne Spleißstelle nur das Glykoprotein exprimiert (s. 1.2.3). Die Expression der Hüllproteine wurde durch eine transiente Transfektion in HEK 293T-Zellen untersucht. Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen für Immunfluoreszenz- und Westernblot-Analysen präpariert. Zur Detektion besitzen die Hüllproteine ein C-terminales V5-Tag, das mit Hilfe eines V5-spezifischen Antikörper lokalisiert werden konnte. Der Fluorophor-konjugierte sekundäre Antikörper (Alexa-568) erbrachte das detektierbare Fluoreszenz Signal (rot) während der Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Die Westernblot-Analysen von den Lysaten der transfizierten Zellen zeigen unterschiedlich intensive Banden (s. Abb. 9). Die Bande für das oricoEnv

ist schwach und entspricht der erwarteten Größe der prozessierten TM Untereinheit von 43 kDa [40]. Bei EboV-Gp war eine Bande bei ~24 kDa detektierbar, die der Größe des Gp₂ (26 kDa) entspricht. Das VSV-G ergibt eine sehr starke überbelichtete Bande bei einer Größe von ~60 kDa. Es sind weitere Banden detektierbar, die Spleißvarianten und Isoformen des VSV-G darstellen. In einem anderen Westernblot wurde die Belichtungszeit für das VSV-G verkürzt und bis auf eine weitere Bande, die spezifische Bande für das VSV-G detektiert (~60 kDa und ~13 kDa). Das VSV-G wird bei einer Größe von 58,2 kDa erwartet. Mit dem V5-Tag (1,7 kDa) entspricht es der detektierten Bande.

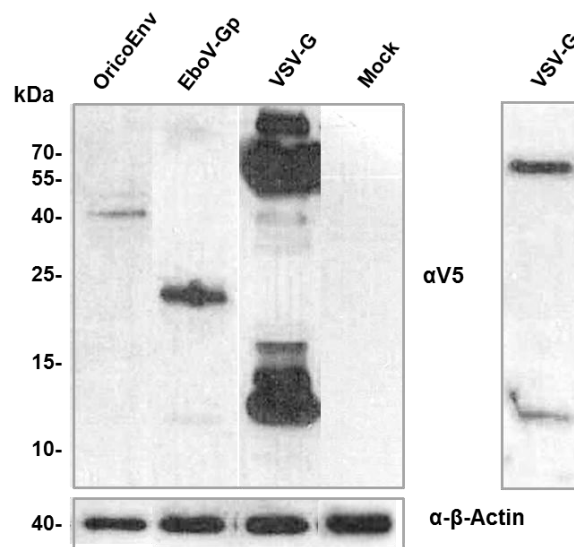


Abbildung 9: Westernblot-Analysen zum Expressionsnachweis der Hüllprotein-Konstrukte. Auftrag von Lysaten transfizierter Zellen mit den Hüllprotein Expressionsplasmiden oricoEnv, EboV-Gp und VSV-G. Zur Detektion der Hüllproteine diente ein V5-Tag-spezifischer Antikörper. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich das β -Actin detektiert. Als Negativkontrolle wurde Mock-DNA transfiziert. Da das VSV-G durch die starke Expression überbelichtet ist und unspezifische Banden aufweist, befindet sich rechts vom Westernblot ein Ausschnitt eines kürzer belichteten Westernblots.

Auch in den Immunfluoreszenz-Experimenten mit HEK 293T-Zellen konnte die Expression aller Hüllproteine von ihren Konstrukten nachgewiesen werden. Zur besseren Einschätzung der Lokalisation der Proteine, wurden die Zellkerne mit dem Hoechst Reagenz angefärbt. Aufnahmen der Zellen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM780 angefertigt (s. Abb. 10). Die Hüllproteine sind membranständig lokalisiert, welches an der stark rot gefärbten Membran erkennbar ist. Als Negativkontrolle wurden in beiden Experimenten Mock DNA transfiziert. Bei der Immunfluoreszenz diente zusätzlich das transfizierte HIV-1 Env Δ KS Plasmid als Negativkontrolle, da es

kein V5-Tag besitzt. Bei Δ KS handelt es sich um eine defektive Variante des HIV-1 Hüllproteins.

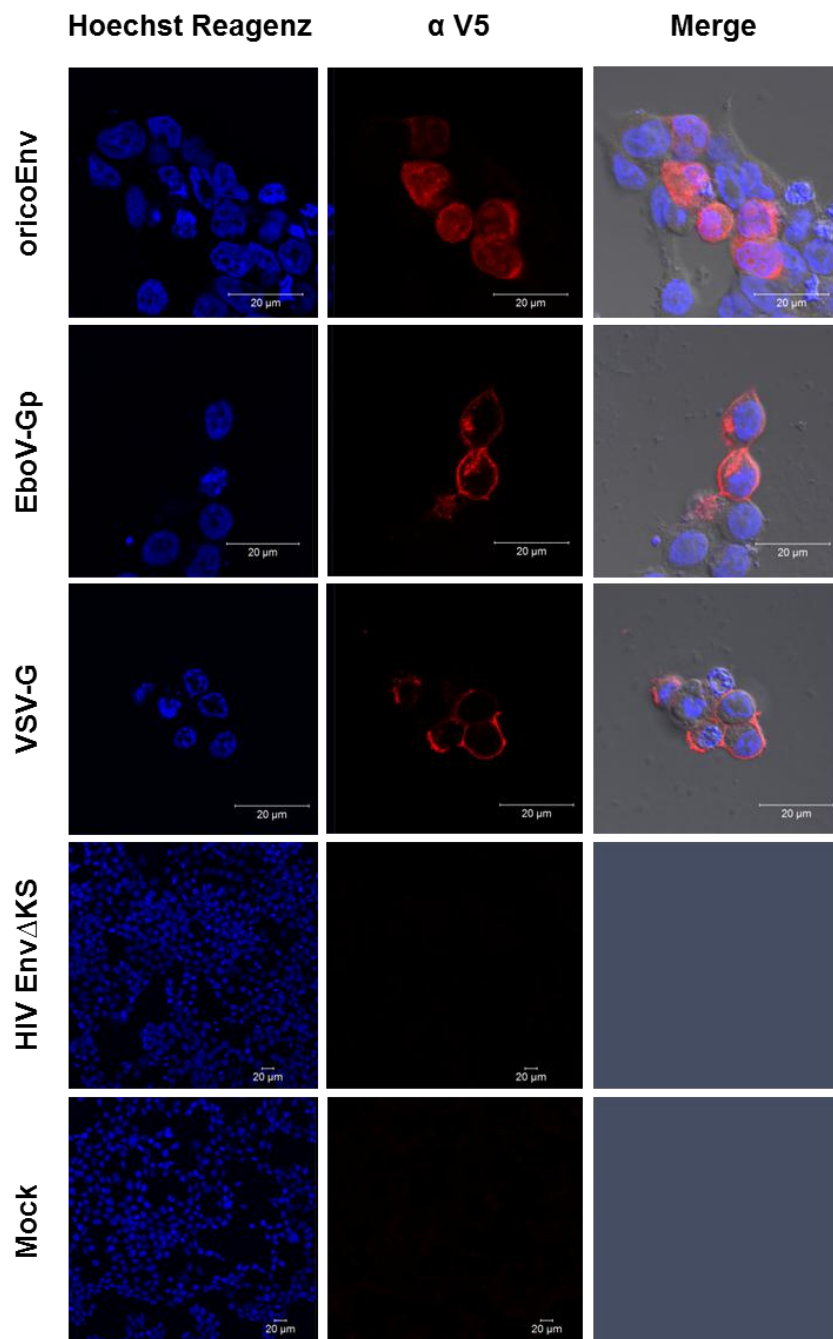


Abbildung 10: Immunfluoreszenz-Analysen zum Expressionsnachweis der Hüllprotein-Konstrukte. HEK 293T-Zellen wurden mit den Hüllprotein-Expressionsplasmiden transfiziert. Die Expression des oricoEnv, EBoV-Gp und VSV-G kann in den Zellen nachgewiesen werden. Mit HIV-1 Env Δ KS und Mock DNA transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle.

3.3 Pseudotypisierung von HERV-K113-Partikeln

Die Wiederherstellung der vermutlich ursprünglichen Sequenz des humanen endogenen Retrovirus K113 zum Zeitpunkt der Integration in das Genom menschlicher Vorfahren ermöglicht die *in-vitro* Produktion von *bona-fide* HERV-Partikeln. Für die Generierung eines funktionalen HERV-K113 Moleklarklons wurde die vollständige Sequenz des HERV-K113 Elements auf Chromosom 19p13.11 (Genbank AY037928) in einen pBSK Plasmidvektor kloniert [33]. Es wurden 25 nicht synonyme postinsertionale Mutationen in den *env*, *rec* und *gag-pro-pol* offenen Leserahmen des HERV-K113-Element identifiziert und durch gezielte Mutagenese revertiert. Der oriHERV-K113 genannte Moleklarklon zeigte trotzdem nur geringe Expressionsraten [35]. Der Austausch der U3-Promoterregion der viralen 5'LTR gegen die Promotersequenz des Cytomegalovirus führte zu einer deutlichen Steigerung der Expression [41]. Für die Herstellung pseudotypisierter HERV-K113-Partikel wurden die bereits vorhandenen Reporterkonstrukte des CMVoriHERV-K113 verwendet (s. Abb.11). Bei diesen Reporterkonstrukten wurde das *env* deletiert und mittels der Endonuklease AgeI ein Luziferase- oder *enhanced green fluorescent protein* (eGFP)-Gen an diese Position kloniert. Dadurch wurde auch der akzessorische Rec-Leserahmen entfernt. Eine Eliminierung des Spleißdonor und -akzeptor des deletierten *env* verhindert das Spleißen des Reportergens. Der „*human elongation factor 1 α* “ (EF1 α)-Promoter, der eine hohe und effiziente Proteinexpression in eukaryotischen Zellen gewährleistet, treibt die Expression der Reporter gene an. Zur Herstellung von HERV-K113-Reporterviren und Untersuchung des EboV-Gp-Einbaus, wurden HEK 293T-Zellen mit vier verschiedenen Plasmiden co-transfiziert. Zusätzlich zu dem CMVori-Reporterkonstrukt wird ein Env (EboV-Gp, oricoEnv, VSV-G, HIV-1 Env Δ KS), Rec (oricoRec), und ein codonoptimiertes *gag-pro-pol* (CMVoricogpp) Expressionsplasmid co-transfiziert. Die Deletion des *env* erlaubt den Einbau eines anderen Hüllproteins. Das Rec hat eine ähnliche Funktion wie das HIV Rev und wird für den Transport der mRNA aus dem Nucleus ins Cytoplasma benötigt. Das CMVoricogpp dient für eine starke Expression der strukturellen Proteine und erhöht die Produktion reifer VLPs [76]. Die pseudotypisierten Reporterviren werden im Folgenden nach dem Reporterkonstrukten und dem Hüllprotein benannt.

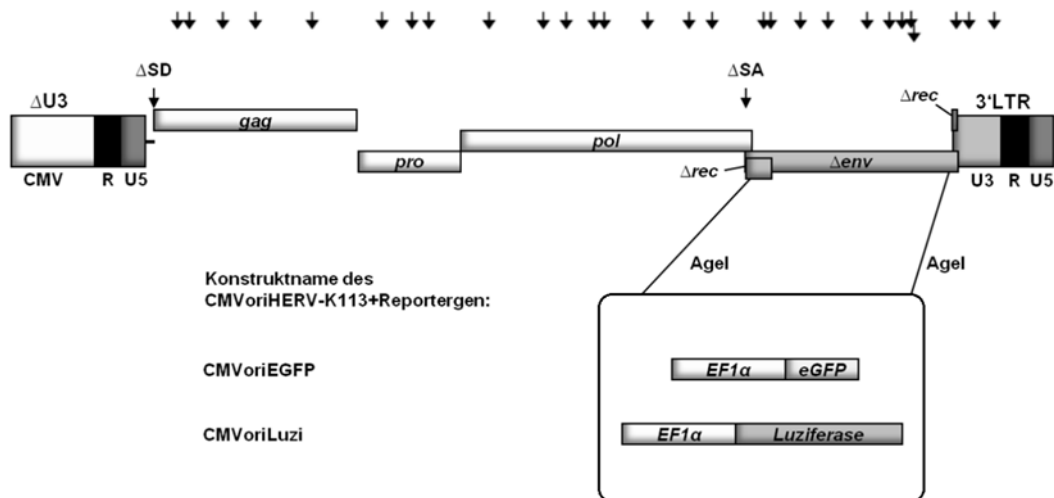


Abbildung 11: Aufbau der HERV-K113 Reporterkonstrukte. Durch den Austausch der U3-Promoterregion der viralen 5'LTR gegen die Promotersequenz des Cytomegalovirus und Austausch des *env* durch ein Reportergen, mit zusätzlicher Eliminierung des Spleißdonor und – akzeptor, entstanden die CMVoriEGFP und CMVoriLuzi genannten Reporterkonstrukte. Die Pfeile oberhalb des Konstruktes symbolisieren die nicht synonymen postinsertionalen Mutationen, in welchen sich die oriHERV-K113 Sequenz von der publizierten HERV-K113 Sequenz (Genbank AY037928) unterscheidet (verändert nach Philipp Kramer [41]).

3.3.1 Einfluss des V5-Tag an VSV-G auf die Produktion retroviraler Partikel

Um auszuschließen, dass das fusionierte V5-Tag einen Einfluss auf den Einbau des VSV-G in die HERV-K113-Partikel bzw. die Virusproduktion hat, wurden HEK 293T-Zellen mit dem Mix der Expressionsplasmide CMVoriEGFP, CMVoricGPP, oricoRec und mit dem pCL-VSV-G oder pTH-VSV-G co-transfiziert. Im Westernblot und in einem CA-Antigen Capture ELISA (p27 ELISA) wurden die präparierten Zelllysate und pelletierten Virusüberstände getestet. Zum spezifischen Nachweis des VSV-G im Westernblot wurde ein VSV-G-spezifischer Antikörper verwendet. In naiven Zelllysaten wurde keine unspezifische Bindung des Antikörpers detektiert (nicht gezeigt). Zur Detektion des HERV-K113 Capsids (p27) diente ein Gag (CA)-Protein-spezifisches Antiserum. Der Westernblot zeigt, dass im Zelllysate das pTH-VSV-G in diesem Versuch stärker exprimiert wird als das pCL-VSV-G (s. Abb. 12A), wobei in zwei von drei Ansätzen die Transfektion mit pCL-VSV-G exprimierendem Vektor nicht optimal verlaufen ist. Die p27 Menge ist ebenfalls ähnlich zu der von dem pCL-VSV-G. Die β -Actin Banden zeigen, dass es keine Unterschiede in der Proteinbeladung gab. Die Untersuchung des Zelly-

sats und des Virusüberstand im p27-ELISA zeigt, dass das fusionierte V5-Tag keinen negativen Einfluss auf die Expression und Virusproduktion hat (s. Abb. 12B). Die erhöhte Menge an p27/Capsid Protein im Überstand ist auf die bessere Transfektionseffizienz der Ansätze mit pTH-VSV-G zurückzuführen.

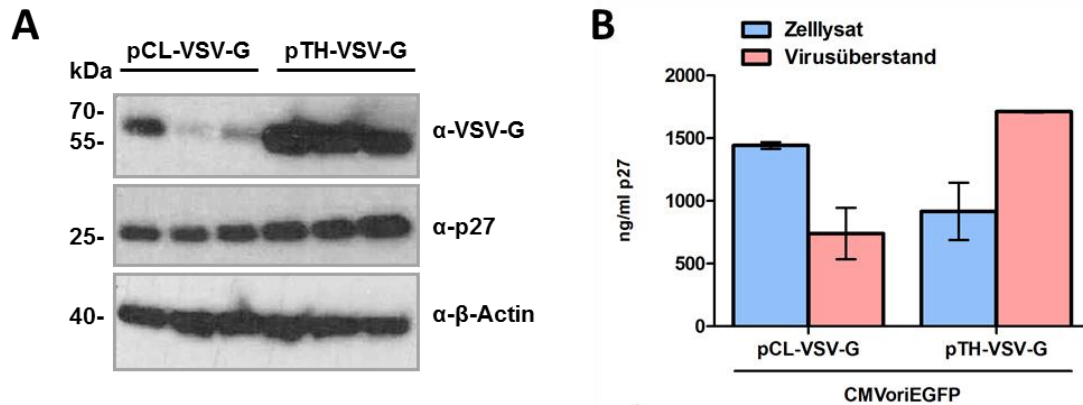


Abbildung 12: Vergleich von pCL-VSV-G und pTH-VSV-G. HEK 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden CMVoriEGFP, CMVoricogPP, oricoRec und pCL-VSV-G oder pTH-VSV-G co-transfiziert. **A)** Im Westernblot wurden VSV-G, p27 und β -Actin mit spezifischen Antikörpern im Zelllysate detektiert. **B)** Im CA-Antigen Capture ELISA (p27 ELISA) wurde die Menge an p27 im Zelllysate und im pelletierten Virusüberstand bestimmt.

3.3.2 Produktion von EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113-Partikeln

Um zu bestimmen, ob das Ebolavirus Glykoprotein (EboV-Gp) in die Virushülle der HERV-K113-Partikel eingebaut wird, wurden HEK 293T-Zellen mit den Expressionsplasmiden CMVoriEGFP, CMVoricogPP, oricoRec und EboV-Gp co-transfiziert. Statt des EboV-Gp wurden auch die Expressionsplasmide oricoEnv bzw. VSV-G co-transfiziert. Für die folgenden Untersuchungen wurde immer das pTH-VSV-G Expressionsplasmid verwendet, bei dem das V5-Tag an das VSV-G fusioniert wird. 48 h nach der Transfektion wurden die Zelllysate präpariert und die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation über ein Sucrosekissen gereinigt, um zum einen sicherzustellen, dass kein sekretiertes Glykoprotein in der Probe vorhanden ist und die pseudotypisierten HERV-K113-Partikel konzentriert vorliegen. Der Westernblot wurde mittels V5-Tag-spezifischer Antikörper auf die Glykoproteine analysiert. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit einem Gag-spezifischen Antikörper die Existenz von retroviralen Partikeln bestätigt.

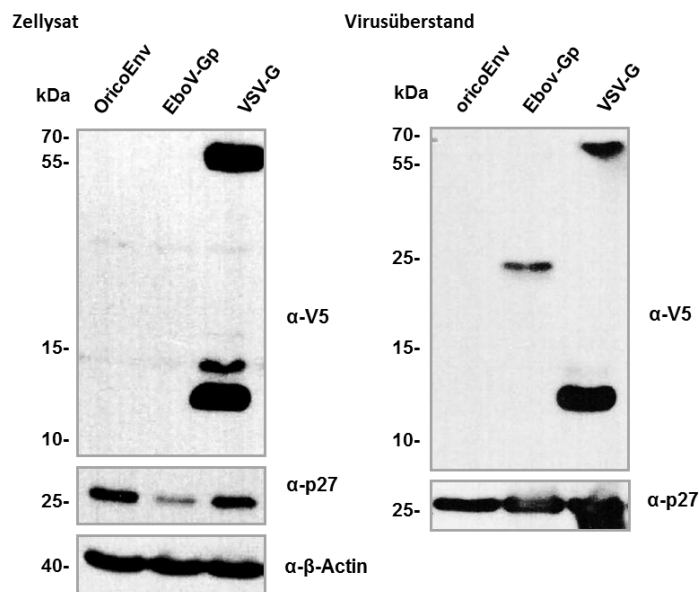


Abbildung 13: Westernblot-Analysen zum Nachweis der Inkorporation des EboV-Gp in HERV-K113-Partikel. HEK 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden CMVoriEGFP, CMVori-coGPP, oricoRec und Env (oricoEnv, EboV-Gp, VSV-G) co-transfiziert. Zellysate und pelletierte Virusüberstände wurden im Westernblot untersucht. Die Detektion der Hüllproteine erfolgte mit einem V5-Tag spezifischen Antikörper und des HERV-K113 Capsids mit einem Gag (CA)-Protein-spezifisches Antiserum. Im Zellysat wurde ein α - β -Actin Antikörper verwendet, der zur Ladekontrolle dient.

Die erwartete 43 kDa Bande (siehe 3.2 Abb.7) für die TM des oricoEnv ist weder im Zellysat noch im Virusüberstand detektierbar, obwohl das Capsid (p27) in beiden nachweisbar ist (s. Abb. 13). Das EboV-Gp (Gp₂: 26 kDa) wird im Vergleich mit dem VSV-G (~60 kDa) schwächer in HERV-K113-Partikel inkorporiert, jedoch konnte EboV-Gp nicht im Zellysat detektiert werden, wobei auch im Ansatz mit EboV-Gp das Capsid-Protein schwächer detektiert wurde. Erneutes Strippen und die Behandlung der Membran mit einem β -Actin-spezifischen Antikörper zeigt die gleichwertige Proteinbeladung. Dieser Westernblot zeigt, dass der Einbau des EboV-Gp in HERV-K113-Partikel möglich ist.

3.3.3 Einfluss des EboV-Gp bei der Produktion und Ausschleusung von HERV-K113-Partikeln

Untersuchungen der Partikelproduktion sollten Aufschluss darüber geben, ob der Einbau des EboV-Gp einen Einfluss auf die Produktion von Viruspartikeln und die Ausschleusung des Virus hat. Für die Quantifizierung der Partikelproduktion, wurde die

Menge an p27 im Zelllysats und im Virusüberstand mit einen CA-Antigen Capture ELISA (p27-ELISA) gemessen. Im Zelllysats gibt es keine deutlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlich pseudotypisierten HERV-K113 Reporterviren in der p27 Menge (s. Abb. 14). Im Virusüberstand scheint jedoch die Menge der mit EboV-Gp pseudotypisierten viralen Partikel leicht erhöht gegenüber den mit VSV-G und HIV-1 Env Δ KS pseudotypisierten VLPs, während die mit oricoEnv pseudotypisierten VLPs nur in sehr geringen Mengen im Überstand nachzuweisen sind.

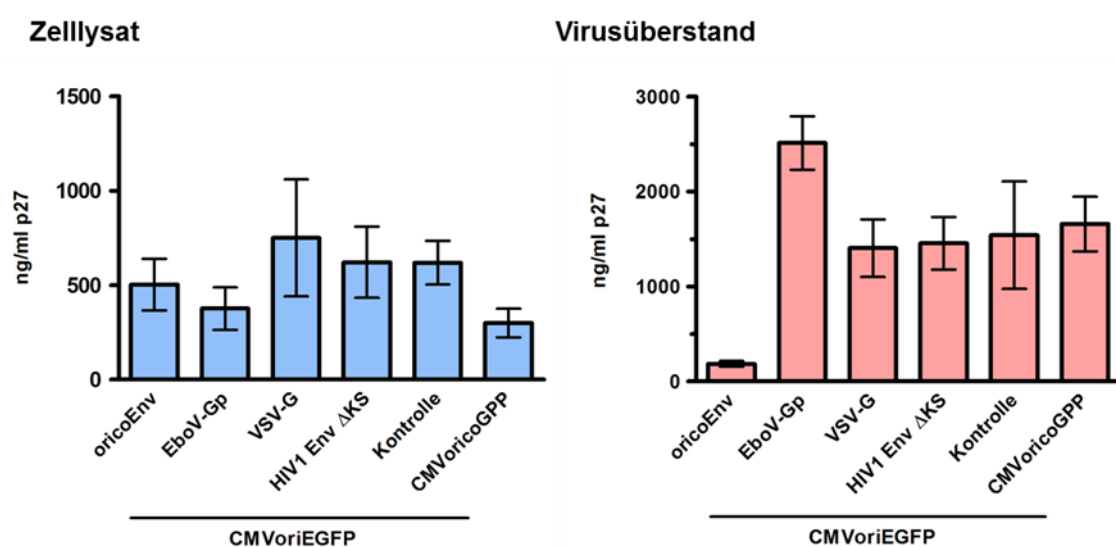


Abbildung 14: Quantifizierung der Partikelproduktion durch einen p27 ELISA. HEK 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden CMVoriEGFP, CMVoricogpp, oricoRec und Env (oricoEnv, EboV-Gp, VSV-G, HIV-1 Env Δ KS) co-transfiziert. In einem p27 ELISA wurden in den Zelllysaten und Virusüberständen die p27 Menge bestimmt. Als Kontrolle wurden HEK 293T-Zellen ohne ein Glykoprotein Expressionsplasmid (Kontrolle) oder nur mit dem CMVoricogpp transfiziert.

Westernblot-Untersuchungen des Zelllysats und des Virusüberstandes unterstützen die Ergebnisse des p27 ELISA. Die Banden für das p27 der pseudotypisierten HERV-K113-Partikel mit EboV-Gp, VSV-G und HIV-1 Env Δ KS sind im Virusüberstand deutlich intensiver im Vergleich zu den schwachen Banden die im Zelllysats detektiert werden (s. Abb. 15). Im Gegensatz dazu, ist die Bande des p27 von den mit oricoEnv pseudotypisierten HERV-K113-Partikeln im Zelllysats intensiver als im Virusüberstand. Anscheinend verlassen die CMVoriEGFP/oricoEnv Viren die Zelle schlechter als die anderen pseudotypisierten Viren.

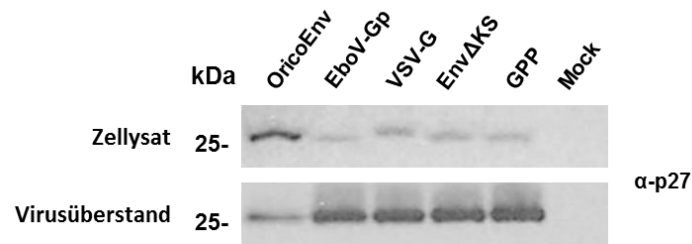


Abbildung 15: Westernblot-Analysen der Partikelproduktion pseudotypisierter HERV-K113 Viren. Mittels einem Gag (CA)-Protein-spezifischen Antiserum wurde das p27 der pseudotypisierten HERV-K113 detektiert und diente zur Quantifizierung der Viruspartikelproduktion. Als Negativkontrolle diente Mock-DNA.

3.3.4 Einfluss von Staufen-1 auf die Virusproduktion

Das humane Staufen-1 ist ein RNA-bindendes Protein, das am Transport und an der Lokalisation von mRNA beteiligt ist und sowohl an ssRNA als auch dsRNA bindet. Charakteristisch für diese Proteine sind die Doppelstrang RNA-Bindedomänen (dsRBD), die das Protein befähigen, RNAs mit doppelsträngigen Sekundärstrukturen zu binden. Beobachtungen zeigten, dass Staufen-1 mit viralen Proteinen interagiert. Die HERV-K (HML-2) kodierten Proteine Rec und Gag wurden als weitere Interaktionspartner des humanen Staufen-1 identifiziert. Bei einer Überexpression von Staufen-1 konnte eine ca. 20-fache Steigerung der oriHERV-K113-Produktion beobachtet werden [77]. Um den Einfluss von Staufen-1 auf die Produktion von CMVoriEGFP/EboV-Gp Reporterviren zu testen, wurden bei der Transfektion von HEK 293T-Zellen zusätzlich verschiedene Mengen des Staufen-1 Expressionsplamids co-transfiziert. Im CA-Antigen Capture ELISA wurde die Menge an p27 bestimmt, welche wiederum eine quantitative Aussage über die Menge der produzierten Partikeln ermöglicht. Die HERV-K113 Expression von dem Volllängen-Molekularklon oriHERVK113 zeigt eine Steigerung der viralen Partikel bis zu einem 2:1 Verhältnis von oriHERV-K113 zu Staufen-1-DNA (s. Abb. 16A). Das Volllängenkonstrukt enthält alle HERV-K113 Gene, auch die für das Glykoprotein und das Rec und benötigt deshalb keine co-Transfektion anderer Plasmide. Bei den CMVoriLuzi/oricoEnv Reporterviren hat Staufen-1 ebenso einen Effekt auf die Produktion viraler Partikel, wobei die gemessene Menge an p27 für oricoEnv pseudotypisierte VLPs etwas höher ausfällt (s. Abb. 16B) und mit EboV-Gp sogar um Faktor 10 mehr VLPs produziert werden (s. Abb. 16C).

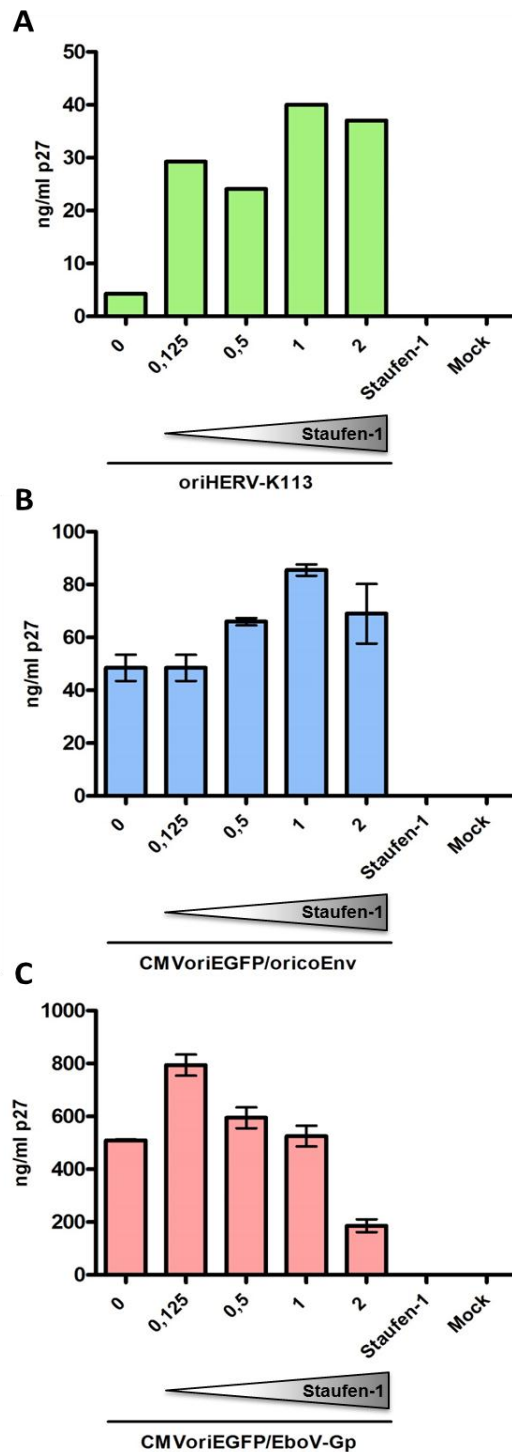


Abbildung 16: Co-Expression des humanen Stau1 bei der HERV-K113-Partikelproduktion. HEK 293T-Zellen wurden mit festgelegten Mengen vom oriHERV-K113 Vollängen-Moleklarklon **A**), CMVoriLuzi/oricoEnv **B**) oder CMVoriLuzi/EboV-Gp **C**) und steigenden Mengen des Stau1 Expressionplasmids co-transfiziert. Durch einen p27 ELISA wurde die Viruspartikelproduktion quantifiziert. Als Kontrolle wurde sowohl nur Stau1- als auch nur Mock-DNA transfiziert.

Das Maximum der Capsid-Expression liegt bei dem Transfektionsansatz mit oricoEnv bei einem 2:1 Verhältnis, bei EboV-GP liegt es bei einem 24:1 Verhältnis von oriHERV-K113 zu Staufen-1-DNA. Bei höheren Mengen Staufen-1 DNA sinkt die Menge an p27 und bei 2 µg Staufen-1 DNA sogar unter den Wert, der ohne die Zugabe von Staufen-1 DNA bei EboV-Gp gemessen wird. Als Negativkontrolle wurden die HEK 293T-Zellen nur mit Mock-DNA oder Staufen-1 DNA transfiziert, bei denen keine Partikelproduktion nachweisbar war.

3.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113-Partikeln

Die Vorbereitung der Proben für die Elektronmikroskopie der Viren erfolgte nach einem Protokoll, das ausführlich in Laue M. 2010 *Electron microscopy of viruses* beschrieben ist. Zur Herstellung von EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113 Partikeln wurden HEK 293T-Zellen mit den vier beschriebenen Plasmiden co-transfiziert. Als Negativkontrolle wurde statt des EboV-Gp Expressionsplasmids Mock DNA co-transfiziert. Die angefertigten Präparate der fixierten Zellen und der pelletierten Viren wurden elektronenmikroskopisch im TEM untersucht.

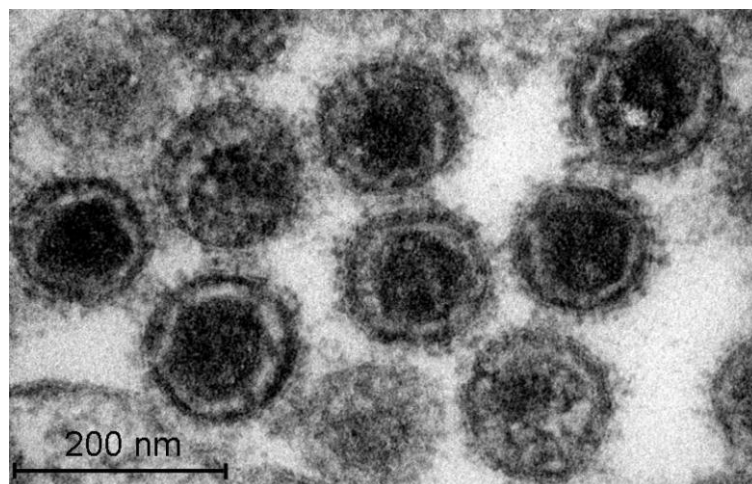


Abbildung 17: Elektronenmikroskopische Aufnahme von CMVoriHERV-K113. Die Elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt reife HERV-K113 Viruspartikel. Das typische hexagonale Capsid ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben. Bei den elektronenmikroskopisch erkennbaren kleinen „Spikes“ auf der Partikeloberfläche handelt es sich um die eingelagerten Hüllproteine. (Herstellung der Partikel: Nadine Beimforde; Aufnahmen: Lars Möller)

Sowohl in der Begutachtung der Zellpräparate als auch der Viruspellets waren wenige Ereignisse zu finden, die knospende oder reife Viruspartikel zeigen, obwohl im Vergleich im Viruspellet deutlich mehr Viruspartikel und auch reife Partikel zu finden waren. Die Beurteilung, ob es sich um retrovirale Partikel handelt, wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ZBS4 (Spezielle Licht und Elektronenmikroskopie) von Dr. M. Laue durchgeführt. Ein Vergleichspräparat von oriHERV-K113 konnte nicht erfolgreich hergestellt werden, deswegen ist in Abbildung 17 eine bereits vorhandene Aufnahme von reifen CMVoriHERV-K113-Partikeln als Vergleich gezeigt.

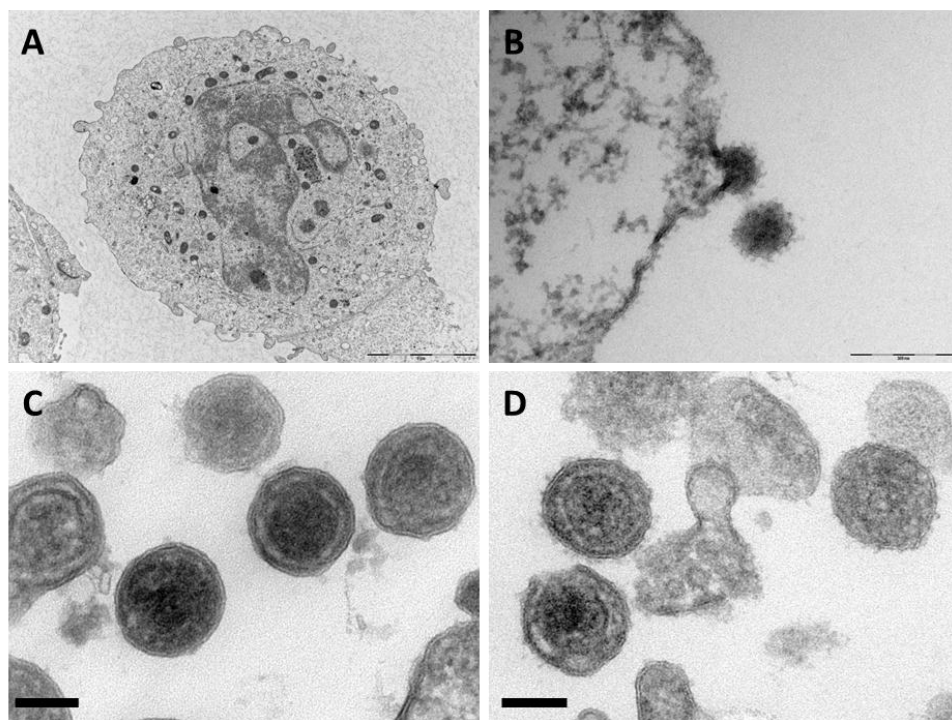


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme von CMVoriEGFP/EboV-Gp Viruspartikeln. Für die Untersuchung des Einflusses von inkorporiertem EboV-Gp auf die Morphologie der HERV-K113-Partikel wurden pseudotypisierte HERV-K113-Partikel mit EboV-Gp im Zellpräparat **B**) und im Viruspelletpräparat **D**) im TEM untersucht. Als Negativkontrolle dienten HERV-K113-Partikel ohne co-transfiziertes EboV-Gp im Zellpräparat **A**) und im Viruspelletpräparat **C**).

In der Negativkontrolle des Zellpräparats waren keine Ereignisse zu finden (s. Abb. 18A). Die Probe von den Virus-produzierenden Zellen mit dem co-transfizierten EboV-Gp zeigt nur unreife Partikel (s. Abb. 18B). Die Oberflächenstruktur ist unauffällig und eine leichte Gag-Polyprotein Ringstruktur ist erkennbar. Die deutlich unregelmäßige Strukturierung der Virusoberfläche deutet auf die Inkorporation von den Glykoproteinen in die Viruspartikel hin (s. Abb. 18B u. D). In der Kontrolle ohne EboV-Gp bei dem Viruspelletpräparat sind auf der Virusoberfläche keine inkorporierten Hüllproteine er-

kennbar (s. Abb.18 C). In der Morphologie der Partikel sind keine erkennbaren Unterschiede zu den Partikeln, die vermutlich das EboV-Gp eingebaut haben (s. Abb.18D). Die Elektronendichte im Capsid lässt darauf schließen, dass ein Reifungsprozess stattgefunden hat und dass es sich um reife Partikel handelt.

3.5 Messung des RNA-Gehalts mittels quantitativer Real-Time PCR

Ohne verpacktes RNA-Genom sind Retroviren nicht in der Lage in der Zelle zu replizieren bzw. Reportergene einzuschleusen. Die pseudotypisierten HERV-K113 Viren wurden mittels quantitativer Real-Time PCR auf ihren RNA-Gehalt untersucht. Dies erlaubt eine weitere Charakterisierung der Partikel und zeigt, ob der Einbau des viralen RNA-Genoms durch die Pseudotypisierung mit EboV-Gp beeinflusst wird. Damit das Messen von genomischer DNA, die HERV-K Sequenzen enthält, als auch die zur Herstellung der Partikel eingesetzte Plasmid-DNA, die ebenfalls von der Real-Time PCR detektiert wird, vermieden wird, wurde ein DNase-Verdau vor oder nach der RNA-Isolation durchgeführt. Bei der Real-Time PCR selbst wurde ein Ansatz mit einem Reverse Transkriptase (RT)-Schritt und ein Ansatz ohne RT-Schritt durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden anhand der bestimmten Menge an viralen Partikeln durch den p27 ELISA normalisiert. Für die Real-Time PCR wurde eine Standardreihe von dem oriHERV-K113 Plasmid hergestellt. Anhand der erhaltenen *cycle threshold* (Ct)-Werte für die Standardreihe, konnte die Anzahl der Kopien in den verschiedenen Ansätzen berechnet werden. Der Ansatz ohne RT-Schritt sollte im Experiment nur die genomische bzw. Plasmid-DNA anzeigen und der Ansatz mit RT-Schritt zeigt sowohl vorhandene RNA als auch genomische bzw. Plasmid DNA. Das Abziehen der detektierten DNA vom Ansatz ohne RT-Schritt vom Ansatz mit RT-Schritt lässt eine Aussage über den RNA-Gehalt in den pseudotypisierten HERV-K113-Partikel zu. Wird der DNase-Verdau mit den intakten VLPs vor der RNA-Isolation durchgeführt, wird eine hohe Zahl von Kopien auch ohne RT-Schritt gemessen (s. Abb. 20A). Nach Abzug dieser Werte ergeben sich für oricoEnv $2,1 \times 10^4$ und für EboV-Gp $7,1 \times 10^3$ RNA-Kopien. Bei VSV-G war das detektierte Signal mit RT-Schritt sogar ein wenig geringer als ohne RT-Schritt, sodass keine RNA detektiert werden konnte. Mit HIV-1 Env Δ KS und CMV-oricoGPP war sowohl mit RT-Schritt als auch ohne RT-Schritt kaum ein Signal detektierbar.

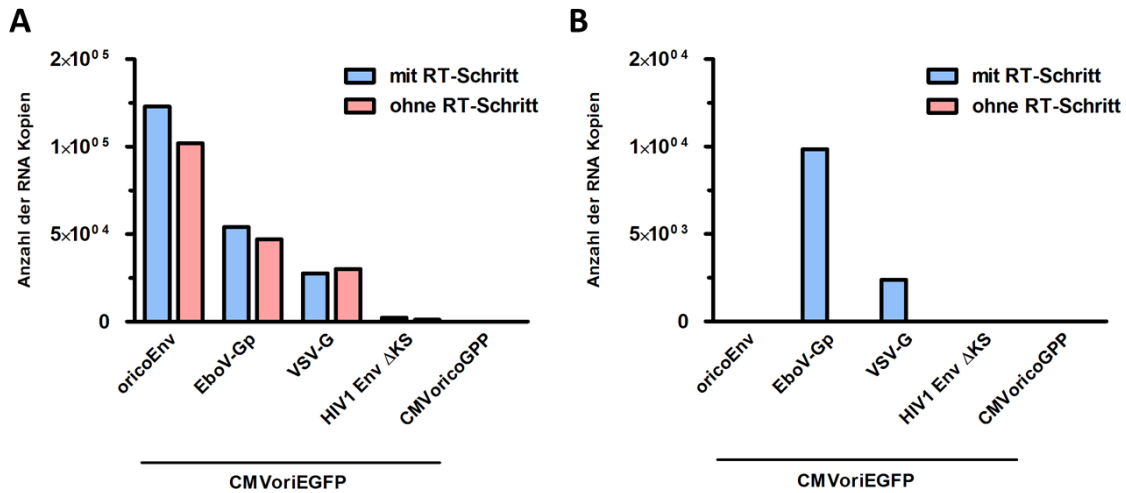


Abbildung 19: RNA-Gehalt pseudotypisierter HERV-K113 Viren. Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde der RNA-Gehalt von pseudotypisierten HERV-K113 Viren bestimmt. Ein DNase-Verdau erfolgte vor **A)** und einer nach **B)** der RNA-Isolation. Bei der Real-Time PCR fand jeweils ein Ansatz mit einem Reverse Transkriptase (RT)-Schritt statt und einer ohne RT-Schritt. Die Anzahl der RNA-Kopien wurde von oricoEnv, EboV-Gp, VSV-G, HIV-1 Env Δ KS pseudotypisierten HERV-K113-Partikeln und von Partikeln, die von CMVoricogpp gebildet wurden, gemessen.

Im Gegensatz dazu ist ein deutlicher Unterschied beim DNase-Verdau nach der RNA-Isolation zu erkennen. In keinem Ansatz ohne RT-Schritt ist genomische oder Plasmid-DNA detektierbar (s. Abb. 20B). Bei oricoEnv sind mit RT-Schritt jedoch auch keine RNA-Kopien mehr detektierbar. Bei EboV-Gp sind $9,8 \times 10^3$ und bei VSV-G $2,4 \times 10^3$ RNA-Kopien messbar. Bei HIV-1 Env Δ KS und CMVoricogpp war wie beim DNase-Verdau vor der RNA-Isolation sehr wenig bzw. keine RNA messbar. Da das CMVoricogpp Expressionsplasmid kein Verpackungssignal besitzt, war eine RNA Detektion auch theoretisch nicht zu erwarten und zusätzlich findet an diesem Konstrukt keine Primerbindung statt. Die Ergebnisse zeigen, dass in den CMVoriEGFP/EboV-Gp Reporterviren RNA enthalten ist.

3.6 Infektiosität der Glykoproteine

Das Glykoprotein auf der Virusoberfläche ist für eine Infektion notwendig. Der Nachweis einer erfolgreichen Penetration von permissiven Zelllinien gibt Auskunft über die Präsenz und Funktionalität des Glykoproteins. Weiterhin kann durch die Untersuchung

der funktionellen Eigenschaften auf eine native Faltung rückgeschlossen werden. Bei den Infektionsversuchen wurde eine deletierte Mutante (oricoEnv $\Delta_{659-699}$) des HERV-K113 verwendet. Es handelt sich dabei um eine der am stärksten C-terminal verkürzten oricoEnv Mutanten, die in der Arbeitsgruppe hergestellt wurde und die höchste Infektionsrate zeigt. Es wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Zum einen die HEK 293T-Zelllinie und die aus der Niere stammende feline CrFK-Zelllinie. Beide Zelllinien waren permissiv gegenüber dem HERV-K113 Hüllprotein. Für diese Untersuchungen wurden pseudotypisierte CMVoriLuzi-Reporterviren in HEK 293T-Zellen hergestellt. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit zuvor im p27-ELISA normalisierten Mengen an oricoEnv $\Delta_{659-699}$, EboV-Gp, VSV-G, oder HIV-1-Env Δ KS pseudotypisierten CMVoriLuzi-Reporterviren. Die Ergebnisse der Luziferaseaktivitätsmessung im Luminometer werden in RLU (*relative light units*) ausgegeben.

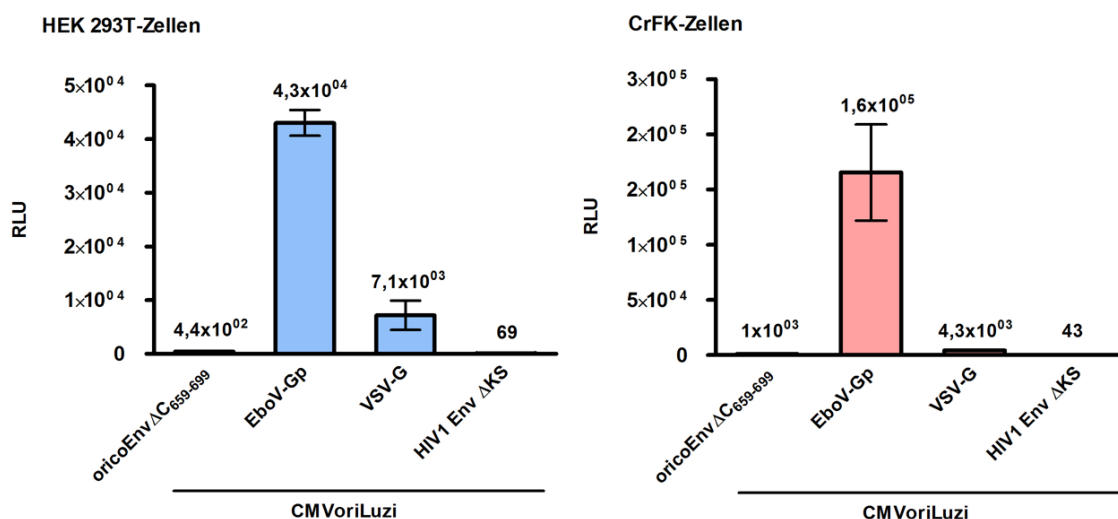


Abbildung 20: Infektionsversuche mit den pseudotypisierten Reporterviren. Messung der Luziferaseaktivität von infizierten HEK 293T- und CrFK-Zellen mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$, EboV-Gp, VSV-G pseudotypisierten Reporterviren. Die Luziferaseaktivität ist in RLU (*relative light units*) angegeben. Als Negativkontrolle dienten die CMVoriLuzi/HIV-1 Env Δ KS Viren.

Für den Nachweis positiver Infektionen wurden CMVoriLuzi/VSV-G-Viren eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten die CMVoriLuzi/HIV-1 Env Δ KS Viren, da es sich bei HIV-1 Env Δ KS um ein nicht-funktionelles HIV Glykoprotein handelt, das nicht fähig ist Zellen zu infizieren und somit die unspezifische Aufnahme von viralen Partikeln darstellt. Im Vergleich zu den CMVoriLuzi/VSV-G Viren infizieren die CMVoriLuzi/EboV-Gp-Viren sowohl die HEK 293T-Zellen als auch die CrFK-Zellen besser (s. Abb. 20). Die Luzi-

feraseaktivität der CMVoriLuzi/EboV-Gp-Viren ist in HEK 293T-Zellen 6-fach und in CrFK-Zellen 37-fach höher als die Luziferaseaktivität der CMVoriLuzi/VSV-G, wobei die Messung bei den CrFK-Zellen mit EboV-Gp eine hohe Standardabweichung aufweist. Bei der Infektion mit CMVoriLuzi/Env Δ C₆₅₉₋₆₉₉-Viren liegt die Luziferaseaktivität deutlich über die der Negativkontrolle, wodurch man auch hier von infektiösen VLPs sprechen kann.

4 Diskussion

In der Vergangenheit wurden retrovirale Vektoren verwendet, die defizient für das Glykoprotein-Gen (*env*) sind, um Viren zu generieren, die fremde virale Glykoproteine in ihrer Virushülle tragen. Die daraus entstehenden Viruspartikel werden als pseudotypisiert bezeichnet [78,79]. Die Inkorporation von heterologen Glykoproteinen scheint unspezifisch zu sein. Env-defekte Proviren können effizient infektiöse Partikel mit fremden retroviralen Glykoproteinen oder sogar mit Glykoproteinen von nicht-retroviralen Virus-Familien produzieren. Es gibt zunehmend Hinweise, dass die Inkorporation weder ein passiver noch zufälliger Prozess ist, sondern eher sorgfältig kontrolliert verläuft. Dieser von einer Vielzahl umhüllter Viren verwendete Prozess erfolgt durch ein Zusammenspiel mehrerer redundanter Mechanismen [80].

Im Fokus dieser Arbeit sollte die Untersuchung der Pseudotypisierung retroviraler Partikel des humanen endogenen Retrovirus K113 mit viralen Glykoproteinen stehen. Das Glykoprotein des Ebolavirus wurde als Kandidat für diese Untersuchungen ausgewählt und mit dem bereits für mehrere Retroviren verwendete VSV-G [78,79] und dem codonoptimierten HERV-K113 Hüllprotein (*oricoEnv*) verglichen. Um den Einbau aller verwendeten Glykoproteine (EboV-Gp, *oricoEnv*) direkt miteinander zu vergleichen und die Detektion zu vereinfachen, wurde ein V5-getaggttes VSV-G konstruiert. Mittels PCR wurde das *vsv-g* Gen amplifiziert und geeignete Schnittstellen für die Restriktionsenzyme angehängt, die eine Klonierung in einen Vektor, der das V5-Tag enthält, ermöglichen. Das V5-Tag ist eine 14 Aminosäuren (GKPIPPLLGLDST) lange Sequenz, die von kommerziell erhältlichen Antikörpern erkannt wird und kann dadurch zum Nachweis von Proteinen, vor allem bei Westernblots und Immunfluoreszenzen, verwendet werden. Da die cytoplasmatische Domäne ein kritischer Bereich ist und Einfluss auf die Inkorporation haben kann, wurde der Einfluss des fusionierten V5-Tag beim VSV-G überprüft [42-44]. Es konnte kein negativer Einfluss auf die Expression oder Partikelproduktion im Vergleich zum ungetaggtten VSV-G gezeigt werden. Zunächst konnte durch Westernblot- und Immunfluoreszenz-Analysen die Expression der Glykoproteine *oricoEnv*, EboV-Gp und VSV-G von ihren Konstrukten in HEK 293T-Zellen nachgewiesen werden. Für die weiteren Untersuchungen konnte somit davon ausgegangen werden, dass die Glykoproteine für den Einbau in retrovirale Partikel vorhanden sind und mit dem V5-Tag detektiert werden können. Die meisten retroviralen Glykoproteine werden zur Zellmembran transportiert, aber dort werden diese auch

rasch wieder abgebaut. Die Immunfluoreszenzen zeigen eine vor allem membranständige Lokalisation der Glykoproteine, da diese an der Zellmembran lokalisiert sein müssen, um beim retroviralen *Budding*-Prozess in die viralen Partikel inkorporiert zu werden, wie für andere pseudotypisierte Viren gezeigt wurde [80-82]. Die transfizierten HEK 293T-Zellen sind auf den Aufnahmen bereits abgerundet. Für die Abrundung könnte die eingesetzte Plasmid-Menge und damit die Menge an produziertem Protein, aber auch die Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz verantwortlich sein. Zytotoxische Effekte auf exprimierende Zellen wurden bereits für verschiedene Hüllproteine beschrieben. Es ist bekannt, dass eine Überexpression des Ebola Glykoproteins toxisch auf die Zellen wirkt und zur Abrundung dieser führt, jedoch eine moderate Expression nicht [68]. In bisherigen Arbeiten wurde die Expressionsstärke des verwendeten codonoptimierten Konstrukts untersucht und die hier eingesetzte Menge an DNA dahingehend gewählt [75]. Auch für oricoEnv wurde eine Toxizitätsbestimmung durchgeführt und eine zelltoxische Wirkung ab 1 µg DNA beschrieben [83]. Daher wurde in den folgenden Experimenten darauf geachtet, dass die Zellen mit niedrigen Mengen an Expressionsplasmiden der Glykoproteine transfiziert wurden.

In der Vergangenheit stieg die Anzahl an Beispielen für erfolgreich generierte pseudotypisierte Viren. Dennoch gibt es Beispiele wie bei den Lentiviren (z.B. HIV-1), deren Env eine besonders lange cytoplasmatische Domäne (150 AS und mehr) besitzt. Diese können üblicherweise infektiöse Partikel nur mit ihrem ursprünglichen Gag oder mit dem Gag von nah verwandten Viren bilden [80]. Um nun herauszufinden, ob eine Pseudotypisierung von den HERV-K113-Partikeln mit dem EboV-Gp möglich ist, wurde für die Produktion von pseudotypisierten HERV-Partikeln ein auf vier Plasmiden basierendes System verwendet. Die Verhältnisse der Expressionsplasmide für die Strukturproteine, dem viralen Genom und den notwendigen akzessorischen Proteinen für eine Transfektion wurden bereits optimiert und auch so in dieser Arbeit verwendet [41,84]. Für die weiteren Untersuchungen wurde nun mit Viruspartikeln gearbeitet, die durch Transfektion von den vier Plasmiden in HEK 293T-Zellen hergestellt wurden. Dabei unterschieden sich die Viruspartikel jeweils nur im verwendeten Env. Der gleichzeitige Nachweis der Glykoproteine und der Capsidproteine (repräsentativ für die Viruspartikel) bestätigen eine Pseudotypisierung. Das VSV-G wird stark exprimiert und anscheinend mit einer hohen Anzahl in die Viruspartikel eingebaut. Eine etwas schwächere Bande war für die Transmembrandomäne GP₂ (26 kDa) des Ebola-Glykoprotein sichtbar. Durch den Denaturierungsschritt vor der Beladung der Proben werden die Disul-

fidbrücken reduziert, wodurch kein Nachweis des GP_{1,2} möglich ist. Da das V5-Tag sich nur am GP₂ befindet, waren die ungetaggten Gp₁ Einheiten auch nicht nachweisbar. Unter den Bedingungen war es nicht möglich das oricoEnv bei produzierten HERV-Partikeln nachzuweisen, obwohl bereits gezeigt wurde, dass oricoEnv auf Viruspartikeln zu finden ist [41]. Da es sich bei diesen Untersuchungen aber um ein ungetaggttes oricoEnv handelte, könnte es sein, dass das V5-Tag einen Einfluss hat. Auch mit der Veränderung bestimmter Parameter wie Zeitpunkt der Virusernte, Aufbereitung der Proben (Variierung des Lysispuffers) oder die Größe des Transfektionsansatzes konnte oricoEnv nicht detektiert werden. Da jedoch später in den Infektionsversuchen gezeigt werden kann, dass die oricoEnv pseudotypisierten HERV-K113-Partikel infektiös sind, kann von einer Inkorporation ausgegangen werden. Weil die Expression der Glykoproteine von den Konstrukten im Westernblot und in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte, müssten weitere Optimierungsarbeiten in der Methode des Westernblots vollzogen werden, um neben EboV-Gp und VSV-G auch oricoEnv in Verbindung mit viralen Partikeln zu detektieren. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass die eingesetzte Menge an oricoEnv immer noch zu toxisch für die Zellen ist.

Es konnte bereits bei anderen viralen Vektoren gezeigt werden, dass diese mit dem Hüllprotein des Ebolavirus pseudotypisiert werden können [71,85]. Auch konnte bereits u.a. in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass HERV-K113-Partikel zusätzlich mit VSV-G pseudotypisiert werden können [84]. Die Herstellung von HERV-Partikeln mit inkorporierten Glykoproteinen des Ebolavirus erlaubt eine Bewertung über die Möglichkeit HERV-Partikel mit weiteren viralen Glykoproteinen zu pseudotypisieren und ob der Einbau verschiedener Glykoproteine Einfluss auf die Produktion dieser Partikel hat. Die p27 ELISA Daten zeigen, dass das Hüllprotein anscheinend einen Einfluss auf die Virusproduktion und die Ausschleusung des Virus haben kann. Dies ist besonders am oricoEnv deutlich. Die Inkorporation von oricoEnv zeigt eine schlechtere Ausschleusung des Virus oder eine verminderte Produktion von allen viralen Proteinen. Die Menge an p27 im Virusüberstand ist mit oricoEnv deutlich geringer als die Menge an p27, die allein von dem CMV_{oricoGPP} gebildet werden. Anscheinend wird durch einen Mechanismus die Ausschleusung des Virus gehemmt. Auch im Westernblot war dieser Effekt zu erkennen. Auch hier könnte die beschriebene Toxizität des oricoEnv eine Rolle spielen, jedoch zeigten die Zellen unter dem Mikroskop keine deutlichen Unterschiede in der Morphologie zwischen den verschiedenen Glykoprotein-Ansätzen. Auch

Toxizitätsbestimmung zeigte, dass die Toxizität bei Zugabe von weniger als 1 µg Expressionsplasmid keine Rolle spielt [83]. Verschiedene Aspekte des Env-Transport und der Inkorporation bei unterschiedlichen Viren sind bereits beschrieben [10]. Der genaue Mechanismus für diesen komplexen biologischen Prozess ist jedoch noch unklar. Das Env wird synthetisiert, prozessiert und zu bestimmten Mikrodomänen in der Plasmamembran transportiert. Es ist weiterhin bekannt, dass das Vorläufer-Polyprotein von Gag für die Assemblierung unreifer virus-like particles (VLP) ausreichend ist, jedoch ist die Inkorporation von Glykoproteinen in die Virionen für die Herstellung von infektiösen retroviralen Partikeln entscheidend [86]. Gag fördert aktiv den späten Assemblierungsschritt, in dem es die Komponenten des zellulären *Budding*-Weg einschaltet. Die anderen Virion-Komponenten haben nur einen kleinen Effekt auf die Effizienz der viralen Partikelproduktion. Die MA-Domäne des Gag Polyproteins ist hauptsächlich für das Gag Membran-*Targeting* und die Inkorporation der viralen Glykoproteine in die Virion-Nachkommen erforderlich [19]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass C-terminal verkürzte oricoEnv Proteine effektiver in SHIV und HERV-Partikel eingebaut werden, wobei man davon ausgehen könnte, dass die im Virus selbst codierte Sequenz am effektivsten ist. Die höhere Infektiosität und bessere Inkorporation des oricoEnv Δ C₆₅₉₋₆₉₉ könnte auf eine reduzierte Interferenz zwischen Matrix und Env-Proteine oder möglicherweise auf eine erhöhte Transport- und Reifungskinetik und verminderte Endozytose-rate zurückzuführen sein [41].

Die hier beobachtete bessere Ausschleusung, vor allem von EboV-Gp aber auch von VSV-G und HIV-1 Env Δ KS pseudotypisierten HERV-K113-Partikel gegenüber dem oricoEnv, könnte aufgrund unterschiedlicher Effizienzen bei der Transfektion von oricoEnv enthaltenden Ansätzen gegenüber EboV-Gp enthaltenden Ansätzen resultiert sein. Außerdem kann die Toxizität des oricoEnv weiterhin ein Grund dafür sein. Die dreifache Wiederholung des Versuches minimiert die technische Fehlerrate. Da es sich bei oricoEnv um ein artifizielles Konstrukt handelt, ist eine Einschätzung, ob es sich um eine gute oder schlechte Ausschleusung handelt aufgrund fehlender Wildtyp-Vergleiche nicht möglich. Der Grund, warum bei den Ansätzen mit EboV-Gp, VSV-G und HIV-1 Env Δ KS mehr pseudotypisierte HERV-K113-Partikel in den Überstand entlassen werden, bleibt zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass Staufen-1 die Partikelproduktion von HERV erhöht [77]. Um eine Steigerung der Partikelproduktion zu erzielen, wurden verschiedene Mengen des humanen Staufen-1 co-transfiziert. Staufen-1 ist ein RNA-Transportprotein, das von den

einfachsten bis zu den komplexesten Eukaryoten exprimiert wird [77]. Staufen-1 ist funktionell den retroviralen RNA-Transportproteinen ähnlich. Es bindet mRNAs und transportiert sie zu Polysomen und gewährleistet eine effiziente Translation. Es wurde gezeigt, dass das Staufen-1 mit dem Gag-Protein von HIV-1 interagiert und die Gag-Oligomerisierung und RNA-Enkapsidation fördert [87,88]. In einer Protein-Interaktionsstudie vom HERV Rec, wurde Staufen-1 als Interaktionspartner identifiziert [77]. Staufen-1 besitzt vier Doppelstrang-RNA-Bindungsdomänen (RBD2-RBD5). Staufen-1 interagiert mit Rec über die RBD4 und mit Gag. Staufen-1 verbessert den Rec-vermittelten nuklearen Export und die Translation viraler RNA. Staufen-1 kann zu einer etwa 20-fachen Steigerung der Viruspartikel-Produktion führen [77]. Bei der Co-Transfektion von Staufen-1 mit dem Vollängen-Molekularklon oriHERV-K113 konnte in dieser Arbeit eine 10-fache Steigerung der Partikelproduktion erreicht werden. Dieses entspricht ungefähr den Erwartungen zu vorigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe. Da bei der Transfektion mit dem Vollängen-Molekularklon oriHERV-K113 kein CMV_{orico}GPP co-transfiziert wurde, ist ein Vergleich der Virusproduktionen nicht direkt möglich. Die Transfektion mit dem oricoEnv zeigt bereits ohne Staufen-1 eine 10-fach höhere Virusproduktion im Vergleich zu oriHERV-K113, welche vermutlich durch das co-transfizierte CMV_{orico}GPP resultiert, aber dafür ist bei oricoEnv nur noch eine 1,8-fache Steigerung durch Staufen-1 zu messen. Auch in diesem Versuch wurde gezeigt, dass bei dem Ansatz mit EboV-Gp gegenüber oricoEnv deutlich mehr HERV-K113-Partikel im Überstand vorhanden sind. Auch die Virusproduktion von pseudotypisierte HERV-K113-Partikel mit EboV-Gp kann durch Staufen-1 gesteigert werden. Es scheint das Staufen-1 die Virusproduktion nur zu einem bestimmten Grad verbessern kann und das Glykoprotein Einfluss darauf hat, welche Menge an Staufen-1 zu einer effektiven Steigerung führt. Man könnte auch anhand dieser Daten von EboV-Gp spekulieren, dass Staufen-1 in zu hohen Konzentrationen die Virusproduktion wieder reduzieren kann. Ergebnisse innerhalb dieser Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass dieser Effekt von Staufen-1 auch für HIV-1 und 2 zu beobachten ist (nicht veröffentlicht). Da die genaue Rolle von Staufen-1 auf die viralen Proteine noch nicht vollständig entschlüsselt ist, sind die Ergebnisse nur ein Hinweis auf einen eventuellen Einfluss der Glykoproteine.

Um die Morphologie der EboV-Gp pseudotypisierten HERV-K113-Partikel zu untersuchen, wurden virus-produzierende Zellen und virale Partikel im Elektronenmikroskop untersucht. Zunächst wurden die transfizierten HEK 293T-Zellen untersucht. Bei der

Negativkontrolle ohne co-transfiziertes EboV-Gp konnten keine Viruspartikel identifiziert werden, jedoch konnten auch bei der Probe mit transfiziertem EboV-Gp nur wenige *Budding*-Prozesse gefunden werden. Das gezeigte Ereignis ist ein nicht klar strukturiertes Viruspartikel, das sich jedoch nach Auskunft der Arbeitsgruppe „Spezielle Licht und Elektronenmikroskopie“ unter Dr. M. Laue (RKI) von zellulären Abschnürungen unterscheiden lässt. Es handelt sich somit um ein unreifes Viruspartikel mit nur einer schwach erkennbaren Gag Polyprotein-Ringstruktur. Der Grund für die kaum oder nicht vorhandenen Viruspartikel könnte eine nicht optimale Transfektion gewesen sein. Auch können Fehler bei der Anfertigung der Elektronenmikroskop-Präparate aufgetreten sein. Weiterhin wurden Elektronenmikroskop-Präparate von HERV-K113-Partikeln angefertigt, die mittels Ultrazentrifugation pelletiert wurden. Die unebenen Strukturen auf der Oberfläche der Viruspartikel deuten auf die inkorporierten Hüllproteine hin. Die Negativkontrolle ohne transfiziertes EboV-Gp zeigte hingegen diese Strukturen nicht. Die retroviralen Partikel scheinen nicht deformiert zu sein. Die reifen Viruspartikel deuten darauf hin, dass das EboV-Gp keinen negativen Einfluss auf die Gag-Assemblierung hat. Wären Auffälligkeiten in der Morphologie erkennbar gewesen, hätte man mit verkürzten Mutanten von EboV-Gp arbeiten können. Die Originallänge eines Proteins müsste eigentlich evolutiv gesehen am optimalsten sein. Für einige Retroviren ist bekannt, dass eine Trunkierung der cytoplasmatischen Domäne Einfluss auf die Inkorporation haben kann [42-44]. Es konnte aber gezeigt werden, dass die am stärksten C-terminal verkürzte Mutante des oricoEnv (oricoEnv Δ C₆₅₉₋₆₉₄) besser in die HERV-Partikel inkorporiert wird und infektiöser ist als das ursprüngliche oricoEnv und die leicht verkürzten Mutanten. Ähnlich dazu führten bei HIV-1 geringe Verkürzungen des C-Terminus vom Env in der Regel zu einer reduzierten Inkorporation und viralen Infektiosität. Eine große Trunkierung des HIV-1 Env, die einen Großteil oder den gesamten cytoplasmatischen Teil entfernt, ergibt jedoch ein Glykoprotein, das infektiöse Partikel bilden kann [80]. Natürlich ist bei einem solchen Vorgehen nicht ausgeschlossen, dass bisher unerkannte Funktionen der cytoplasmatischen Domäne verloren gehen. Diese Bereiche besitzen vielleicht Regulationsmechanismen, die bisher noch nicht bekannt sind. Die Frage, ob die cytoplasmatische Domäne bei viralen Glykoproteinen wichtig für die Inkorporation ist, wird viel diskutiert und erforscht. Beim Marburgvirus Gp konnte gezeigt werden, dass eine Entfernung der cytoplasmatischen Domäne keinen Einfluss auf die Trimerisierung, den intrazellulären Transport und die Inkorporation hat, aber zu Veränderungen des Glykosylierungsmuster und der Erkennung von Gp von neutralisierenden Antikörpern führt [89]. Es kann anscheinend auch zu feinen Veränderungen in

anderen Domänen kommen. Genau wie das Marburgvirus Gp besitzt auch das Ebola Gp (vier AS) eine kurze cytoplasmatische Domäne, die aber vermutlich trotzdem eine Funktion erfüllt. Als Immunogen wäre es nachteilig, wenn die C-terminale Trunkierung zwar zu einem verbesserten Einbau des EboV-Gp führt, jedoch die eventuelle Veränderung des Glykosylierungsmuster eine Erkennung der neutralisierenden Antikörper für das Wildtyp EboV-Gp verändert. Außerdem könnte eine zu effektive und zahlreiche Inkorporation des EboV-Gp möglicherweise nicht nur eine Rezeptorbindung sondern auch die Erkennung von neutralisierenden Antikörpern einschränken [90].

Um einen Einfluss des Glykoproteins auf die Inkorporation der viralen RNA zu untersuchen, wurde mittels einer quantitativen Real-Time PCR der RNA-Gehalt der pseudotypisierten HERV-K113-Partikel in einem bestimmten Volumen vom Virusüberstand bestimmt. Bei dieser Untersuchung besteht das Problem, dass die gewählten Real-Time Primer und die Sonde nicht nur auf der viralen RNA, sondern auch auf den bereits im Genom der HEK 293T-Zellen integrierte HERV-K Proviren binden, da die Unterschiede in den Sequenzen der einzelnen Elemente zu gering sind, um eine spezifische Detektion der oriHERV-K113 Sequenz zu gewährleisten. Ebenso binden die Primer und die Sonde an dem Plasmid, welches für die Virusproduktion in die HEK 293T-Zellen transfiziert wurde und für das virale RNA-Genom sorgt. Sowohl genomische DNA als auch Plasmid-DNA können im Zellkulturüberstand vorhanden sein und in der Real-Time PCR zusätzlich zur RNA als Template dienen und somit für eine falsche Quantifizierung verantwortlich sein. Um eine Detektion von genomischer DNA und Plasmid-DNA zu vermeiden und die RNA Menge möglichst exakt zu messen, wurden die Proben vor oder nach der RNA-Isolation mit einer DNase behandelt. Prinzipiell kann der DNA Verdau im virus-haltigen Überstand [91] oder nach der RNA-Isolation [92] erfolgen. In diesem Versuch war der nachfolgende DNase-Verdau effektiver, denn bei den Ansätzen ohne RT-Schritt wurde kaum messbares bis kein DNA Template detektiert. Es ist möglich, dass die Bedingungen für die DNase vor der RNA-Isolation schlechter waren als nach der RNA-Isolation und ein nicht so effektiver DNase-Verdau stattgefunden hat. Die $2,1 \times 10^4$ messbaren RNA-Kopien bei oricoEnv waren durch den nachfolgenden DNase-Verdau jedoch auch nicht mehr messbar, wohingegen nun $2,3 \times 10^3$ RNA-Kopien für VSV-G ermittelt wurden. Es scheint, dass virale RNA bei oricoEnv vorhanden ist, diese aber durch den DNase-Verdau nach der RNA-Isolation verloren geht. Bei EboV-Gp sind in beiden Ansätze RNA-Kopien messbar (Vor: $7,1 \times 10^3$; Nach: $9,8 \times 10^3$) und man kann annehmen, dass bei diesen Viren eine RNA-Verpackung stattgefunden

hat. Weiterhin wurde durch eine Normalisierung der Viruspartikel mit einem p27 ELISA ausgeschlossen, dass Unterschiede in der RNA Menge Resultate unterschiedlicher Virusproduktionen sind. Es könnte also sein, dass das Glykoprotein einen Einfluss auf die RNA-Verpackung hat. Bei HIV ist bekannt, dass die NC Domäne eine bedeutende Rolle bei der selektiven RNA-Verpackung hat [93]. Der genaue Mechanismus, wie HIV-1 die Verpackung von genau zwei RNA-Kopien reguliert, ist auch noch unbekannt, aber es wurde beschrieben, dass Gag den Hauptakteur spielt [93]. Wenn die veränderte Viruspartikel-Produktion aus Interaktionen von Gag und Env resultieren sollte, könnte auch die RNA-Verpackung beeinflusst werden. Somit scheint das EboV-Gp keinen vergleichsweise negativen Einfluss auf die RNA-Verpackung zu haben. Ob es sich dabei um ein reguläres RNA-Genom zu Viruspartikel Verhältnis handelt, ist aufgrund fehlender Richtwerte für HERV-K113 schwer einzuschätzen und bleibt noch zu untersuchen. Bei der Real-Time PCR können technische Fehler eine Rolle spielen, denn abgesehen von den Fehlern bei der Herstellung der Viruspartikel, geht bei dem Protokoll für den DNase-Verdau und die RNA-Isolation Probenvolumen verloren, das Einfluss auf das Ergebnis haben kann. Es könnte als nächstes getestet werden, ob eine Konzentrierung der Viruspartikel mithilfe einer Pelletierung mit nachfolgender Aufnahme in PBS es ermöglicht, mehr RNA-Kopien zu detektieren. Der Einsatz von speziellen HERV Viren ist denkbar, bei denen die Sequenz so modifiziert ist, dass sie von einem speziellen Primer- und Sonden-Set von den genomischen Proviren zu unterscheiden sind. Jedoch kann auch so nicht die Detektion von Plasmid-DNA ausgeschlossen werden. Aufgrund der doch sehr unterschiedlichen Ergebnisse sind weitere Untersuchungen hier zwingend notwendig, um den RNA-Gehalt zweifelsfrei zu bestimmen und das Ergebnis zu bestätigen.

Ein obligatorischer Schritt bei der Bildung eines infektiösen retroviralen Partikels ist die Inkorporation des Hüllproteins in die Virushülle. Da das Glykoprotein für Absorption und Penetration des Virus verantwortlich ist, ist es für eine Infektion essentiell. Die Ergebnisse dieser Masterarbeit zeigen, dass CMVoriLuzi/oricoEnv, /VSV-G und /EboV-Gp-Viren infektiös sind und somit das jeweilige Glykoprotein funktional ist. Die CMVoriLuzi/oricoEnv Δ C₆₅₉₋₆₉₉-Viren sind jedoch im Gegensatz zu CMVoriLuzi/EboV-Gp und /VSV-G schwach infektiös. Trotz der Rekonstitution, Codonoptimierung und der fast kompletten Deletion (C Δ ₆₅₉₋₆₉₄) der cytoplasmatischen Domäne bleiben diese Viruspartikel schwach infektiös. Die Luziferaseaktivität von CMVoriLuzi/VSV-G-Viren infizierter HEK 293T-Zellen entspricht den Ergebnissen, die bisher gezeigt werden konnten [84].

Bei den Infektionsversuchen hängt die gemessene Infektionsrate u.a. vom Zustand der zu infizierenden Zellen ab und kann teilweise zu Abweichungen zu anderen Ergebnissen führen. In diesem Experiment zeigen die pseudotypisierten HERV-K113-Partikel mit EboV-Gp die höhere Infektionsrate, jedoch wurde mit MLV pseudotypisierten Partikeln gezeigt, dass MLV/VSV-G eine höhere Infektionsrate als MLV/EboV-Gp aufweist.[85]. Potenzielle Fehlerquellen wären die Normalisierung der Viren durch den p27-ELISA, aber auch bei der Methode der Infektion selbst können unterschiedliche Techniken zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. So wurde in diesem Experiment eine Spin-Okulation in der Anwesenheit von Polybrene durchgeführt, was zu einer erleichterten Adhäsion der Viruspartikel führt. Um einen möglichst exakten Vergleich betreffs der Infektiosität von verschiedenen Env Proteinen zu erhalten, könnte hier die Menge von Polybrene titriert werden, um Unterschiede bei auch geringen Mengen von Polybrene zu finden. Wenn in weiterführenden Experimenten die Infektiosität von EboV-Gp und VSV-G verglichen werden soll, müssten verschiedene retrovirale Partikel, MLV als Gammaretrovirus und HERV als Betaretrovirus mit denselben Env Konstrukten direkt miteinander verglichen werden.

In dieser Arbeit wurde mit einem codonoptimierten EboV-Gp gearbeitet, bei dem zusätzlich die *slippery site* entfernt wurde und somit verhindert wird, dass das sekretierte sGp gebildet wird. Es ist nicht auszuschließen, dass dieses Einfluss auf die Virusproduktion in den transfizierten Zellen hat. Viren haben eigene Regulationsmechanismen entwickelt, um einen effizienten Replikationszyklus vollziehen zu können. Jedes virale Protein wird zu jeder Zeit während Replikation in ganz bestimmten Mengen exprimiert. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression des Glykoproteins toxisch auf die Zellen wirkt, eine moderate Expression hingegen keine Abrundung der Zellen zeigt. Es hat also vermutlich einen natürlich evolutiven Hintergrund, dass bei der Replikation des Virus nur 20-25% der Transkriptionen zur Expression des Gp_{1,2} führen. Eine starke Gp_{1,2}-Expression beeinträchtigt die Produktion und Freisetzung von EboV virusähnlichen Partikeln (VLPs) sowie die Infektiosität von GP_{1,2} pseudotypisierten Viren [90]. Durch die hohe GP_{1,2} Expression wird die Synthese anderer Proteine reduziert, die für die Assemblierung gebraucht werden und zusätzlich schränkt es möglicherweise die Rezeptorbindung und die endosomale Prozessierung ein [90]. Auch bei HIV-1 findet man relativ niedrige Mengen des Gp120-Gp41 Oligomers auf HIV-1 Virionen [94]. Die Aufrechterhaltung des niedrigen Levels der Glykoproteine auf der Zelloberfläche hilft zu verhindern, dass die infizierten Zellen vom Wirtimmunsystem erkannt werden [86].

Es gibt viele Faktoren die man für eine erfolgreiche Pseudotypisierung beachten muss, angefangen, dass das Glykoprotein fähig sein muss, sich in die jeweiligen Viruspartikel einbauen zu können, bis hin, dass das heterologe Glykoprotein die Assemblierung und Morphologie des Virus stören könnte, weil es andere virale Proteine beeinflusst. Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Einbau des Glykoproteins vom Ebolavirus in Partikel des HERV-K113 möglich ist und keine negativ messbaren Einflüsse auf die Partikelproduktion, Morphologie, RNA-Verpackung und Infektiosität hat.

5 Ausblick

Ein nächster Schritt wäre nun, in einem Tierversuch die Immunantwort auf diese Viruspartikel zu testen. Wenn mit EboV-Gp pseudotypisierten Viruspartikel Antikörperantworten hervorgerufen würden, die auch die Ebolavirus-Partikel selbst binden würden, könnten HERV-K113/EboV-Gp Partikel als Immunogen dienen, um eine möglicherweise protektive Immunantwort gegen das Ebolavirus zu induzieren. Da das humane Genom HERV-K Sequenzen enthält, die zum Teil in geringen Mengen HERV Proteine bilden, sollten HERV-K Proteine im Menschen nicht stark immunogen sein, abgesehen von Menschen, die z.B. aufgrund von Immunerkrankungen ein gestörtes Immunsystem besitzen. Im Tierversuch wäre die erwartete ausbleibende starke Immunantwort auf HERV, wie beim Menschen, nicht direkt gegeben, aber eine erste Einschätzung, ob das Glykoprotein auf der Oberfläche immunogen wirkt, wäre möglich. Für die Verwendung als Immunogen könnten die VLPs ohne RNA-Genom hergestellt werden, sodass eine Integration und eine folgende Replikation nicht möglich wäre. Weiterhin könnte man den Einbau anderer filoviraler Glykoproteine, wie z.B. das Marburgvirus-Gp, als Vergleich untersuchen. Ob C-terminal trunke Mutanten von EboV-Gp noch besser eingebaut werden, könnte ebenfalls getestet werden. Die Methode zum Messen der Virus RNA müsste weiter optimiert werden, um die aufgezeigten Fehlerquellen zu eliminieren. Mit den im Tierversuch erhaltenen Seren könnte anschließend ein Neutralisations-Assay durchgeführt und geprüft werden, ob wirklich eine protektive Antwort induziert werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] O. Ellermann, V., Bang, "Experimentelle Leukämie bei Hühnern," 1908.
- [2] P. Rous, "A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS.," *J. Exp. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 397–411, 1911.
- [3] D. Baltimore, "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.," *Nature*, vol. 226, no. 5252, pp. 1209–1211, Jun. 1970.
- [4] H. M. Temin and S. Mizutani, "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970.," *Biotechnology*, vol. 24, pp. 51–56, 1992.
- [5] B. J. Poiesz, F. W. Ruscetti, a F. Gazdar, P. a Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo, "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, no. 12, pp. 7415–7419, 1980.
- [6] J. B. Brunet and R. A. Ancelle, "The international occurrence of the acquired immunodeficiency syndrome.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 103, no. 5, pp. 670–674, Nov. 1985.
- [7] W. Bernhard, "The Detection and Study of Tumor Viruses with the Electron Microscope The Detection and Study of Tumor Viruses with the Electron Microscope *," *Cancer Res.*, pp. 712–727, 1960.
- [8] D. Fine and G. Schochetman, "Type D primate retroviruses: a review," *Cancer Res.*, vol. 38, no. 10, pp. 3123–3139, 1978.
- [9] R. Weiss, "The discovery of endogenous retroviruses.," *Retrovirology*, vol. 3, p. 67, 2006.
- [10] S. H. Modrow S, Falke D, Truyen U, "Molekulare Virologiee," *Spektrum Akad. Verlag Heidelb.*, vol. 3. Auflage, 2010.
- [11] Coffin J.M., "Structure and classification of retroviruses," *retroviridae (ed. J.A. Levy)*, pp. 19–49, 1992.
- [12] K. J. Williams and L. A. Loeb, "Retroviral Reverse Transcriptases: Error Frequencies and Mutagenesis," in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1992, pp. 165–80.
- [13] S. Hallenberger, V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten, "Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160.," *Nature*, vol. 360, no. 6402, pp. 358–361, Nov. 1992.
- [14] L. Delamarre, A. R. Rosenberg, C. Pique, D. Pham, I. Callebaut, and M. C. Dokhelar, "The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions.," *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, vol. 13 Suppl 1, pp. S85–91, 1996.
- [15] J. D. Boeke and J. P. Stoye, "Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements," J. M. Coffin, S. H. Hughes, and H. E. Varmus, Eds. Cold Spring Harbor (NY), 1997.
- [16] O. Hohn, K. Hanke, and N. Bannert, "HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease.," *Front. Oncol.*, vol. 3, no. September, p. 246, 2013.
- [17] D. L. Mager and J. P. Stoye, "Mammalian Endogenous Retroviruses," in *Microbiol Spectrum*, 2015, pp. 1079–1100.
- [18] P. Jern, G. O. Sperber, and J. Blomberg, "Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy.," *Retrovirology*, vol. 2, p. 50, 2005.
- [19] R. Kurth and N. Bannert, *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis*. 2010.
- [20] Y. Xiong and T. H. Eickbush, "Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences.," *EMBO J.*, vol. 9, no. 10, pp. 3353–3362, 1990.
- [21] E. C. Holmes, "Ancient lentiviruses leave their mark.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 15, pp. 6095–6096, 2007.
- [22] R. Belshaw, A. Katzourakis, J. Pačes, A. Burt, and M. Tristem, "High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 22, no. 4, pp. 814–817, 2005.
- [23] J. P. Stoye, "Endogenous retroviruses: Still active after all these years?," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 22, pp. 914–916, 2001.

-
- [24] J. F. Hughes and J. M. Coffin, "Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 6, pp. 1668–1672, 2004.
- [25] N. L. Young and P. D. Bieniasz, "Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus," *PLoS Pathog.*, vol. 3, no. 1, pp. 0119–0130, 2007.
- [26] Lander ES, Linton LM, Birren B, "Initial sequencing and analysis of the human genome," *Nature*, vol. 420, no. February, pp. 520–562, 2001.
- [27] J. C. Venter, "The sequence of the human genome.," *Science*, vol. 291, no. 5507, pp. 1304–1351, 2001.
- [28] R. P. Subramanian, J. H. Wildschutte, C. Russo, and J. M. Coffin, "Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses," *Retrovirology*, vol. 8, no. 1, p. 90, 2011.
- [29] G. Turner, M. Barbulescu, M. Su, M. I. Jensen-Seaman, K. K. Kidd, and J. Lenz, "Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans," *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 19, pp. 1531–1535, 2001.
- [30] D. L. Moyes, A. Martin, S. Sawcer, N. Temperton, J. Worthington, D. J. Griffiths, and P. J. Venables, "The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease.," *Genomics*, vol. 86, no. 3, pp. 337–341, Sep. 2005.
- [31] M. Tristem, "Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database.," *J. Virol.*, vol. 74, no. 8, pp. 3715–3730, 2000.
- [32] W. E. Johnson and J. M. Coffin, "Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 18, pp. 10254–10260, 1999.
- [33] N. Beimforde, K. Hanke, I. Ammar, R. Kurth, and N. Bannert, "Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113," *Virology*, vol. 371, no. 1, pp. 216–225, 2008.
- [34] M. Dewannieux, F. Harper, A. Richaud, C. Letzelter, D. Ribet, G. Pierron, and T. Heidmann, "Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements," *Genome Res.*, vol. 16, no. 12, pp. 1548–1556, 2006.
- [35] C. Chudak, N. Beimforde, M. George, A. Zimmermann, V. Lausch, K. Hanke, and N. Bannert, "Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2).," *Retrovirology*, vol. 10, p. 140, 2013.
- [36] V. Armbruster, M. Sauter, E. Krautkraemer, E. Meese, A. Kleiman, B. Best, K. Roemer, and N. Mueller-Lantzsch, "A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 1800–1807, 2002.
- [37] R. Löwer, R. R. Tönjes, C. Korbmacher, R. Kurth, and J. Löwer, "Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K.," *J. Virol.*, vol. 69, no. 1, pp. 141–149, 1995.
- [38] C. Magin, R. Löwer, and J. Löwer, "cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K.," *J. Virol.*, vol. 73, no. 11, pp. 9496–9507, 1999.
- [39] a Boese, M. Sauter, U. Galli, B. Best, H. Herbst, J. Mayer, E. Kremmer, K. Roemer, and N. Mueller-Lantzsch, "Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein.," *Oncogene*, vol. 19, no. 38, pp. 4328–4336, 2000.
- [40] K. Hanke, P. Kramer, S. Seeher, N. Beimforde, R. Kurth, and N. Bannert, "Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain.," *J. Virol.*, vol. 83, no. 24, pp. 12790–12800, 2009.
- [41] P. Kramer, "Untersuchungen zum Hüllprotein und dem Tropismus des humanen endogenen Retrovirus K," *Dissertation*, 2011.
- [42] C. C. P. Celma, M. G. Paladino, S. A. Gonzalez, and J. L. Affranchino, "Importance of the short cytoplasmic domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion activity and envelope glycoprotein incorporation into virions.," *Virology*, vol. 366, no. 2, pp. 405–414, Sep. 2007.

-
- [43] V. Cheynet, a Ruggieri, G. Oriol, J. Blond, B. Boson, L. Vachot, and B. Verrier, "Synthesis , Assembly , and Processing of the Env ERVWE1 / Syncytin Human Endogenous Retroviral Envelope," *J. Virol.*, vol. 79, no. 9, pp. 5585–5593, 2005.
- [44] M. Côté, Y.-M. Zheng, L. M. Albritton, and S.-L. Liu, "Fusogenicity of Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is dependent on low pH and is enhanced by cytoplasmic tail truncations.," *J. Virol.*, vol. 82, no. 5, pp. 2543–2554, 2008.
- [45] K. Khan, "Gene expression in Mammalian cells and its application," *Adv Pharm Bull*, vol. 3, no. 2, pp. 257–63, 2013.
- [46] G. L. Buchschacher and F. Wong-staal, "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases," *Blood*, vol. 95, no. 8, pp. 2499–2504, 2000.
- [47] J. Zavada, "The pseudotypic paradox," *J. Gen. Virol.*, vol. 63, no. 1, pp. 15–24, 1982.
- [48] Z. H. Zhu, S. S. Chen, and A. S. Huang, "Phenotypic mixing between human immunodeficiency virus and vesicular stomatitis virus or herpes simplex virus.," *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 3, no. 3, pp. 215–219, 1990.
- [49] Alan J. Cann, *Principles of Molecular Virology*, vol. Fifth Edit. 2012.
- [50] N. J. Temperton, E. Wright, and S. D. Scott, "Retroviral Pseudotypes - From Scientific Tools to Clinical Utility," *eLS*, no. June, pp. 1–11, 2015.
- [51] E. M. Bentley, S. T. Mather, and N. J. Temperton, "The use of pseudotypes to study viruses, virus sero-epidemiology and vaccination," *Vaccine*, pp. 1–9, 2015.
- [52] J. C. Burns, T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, and J. K. Yee, "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 17, pp. 8033–8037, 1993.
- [53] J. Cronin, X.-Y. Zhang, and J. Reiser, "Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping," *Gene Ther. Progr.*, vol. 5, pp. 387–398, 2012.
- [54] D. Passi, "Ebola Virus Disease (The Killer Virus): Another Threat to Humans and Bioterrorism: Brief Review and Recent Updates," *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 9(6), pp. LE01–LE08, 2015.
- [55] J. Olejnik, E. Ryabchikova, R. B. Corley, and E. Mühlberger, "Intracellular events and cell fate in filovirus infection," *Viruses*, vol. 3, no. 8, pp. 1501–1531, 2011.
- [56] E. Mühlberger, "Filovirus replication and transcription," *Futur. Virol.*, vol. 2 (2), pp. 205–215, 2007.
- [57] a Sanchez, S. G. Trappier, B. W. Mahy, C. J. Peters, and S. T. Nichol, "The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 8, pp. 3602–3607, 1996.
- [58] V. A. Volchkova, H. Klenk, and V. E. Volchkov, "Delta-Peptide Is the Carboxy-Terminal Cleavage Fragment of the Nonstructural Small Glycoprotein sGP of Ebola Virus 1," vol. 171, pp. 164–171, 1999.
- [59] V. Wahl-Jensen, S. K. Kurz, P. R. Hazelton, H. Schnittler, U. Ströher, D. R. Burton, and Heinz Feldmann, "Role of Ebola Virus Secreted Glycoproteins and Virus-Like Particles in Activation of Human Macrophages Role of Ebola Virus Secreted Glycoproteins and Virus-Like Particles in Activation of Human Macrophages," *J. Virol.*, vol. 79, no. 4, pp. 2413–2419, 2005.
- [60] M.-A. de La Vega, G. Wong, G. P. Kobinger, and X. Qiu, "The Multiple Roles of sGP in Ebola Pathogenesis," *Viral Immunol.*, vol. 28, no. 1, pp. 3–9, 2015.
- [61] A. Sanchez, Z. Y. Yang, L. Xu, G. J. Nabel, T. Crews, and C. J. Peters, "Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus.," *J. Virol.*, vol. 72, no. 8, pp. 6442–6447, 1998.
- [62] V. E. Volchkov, H. Feldmann, V. a Volchkova, and H. D. Klenk, "Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 10, pp. 5762–5767, 1998.
- [63] O. Dolnik, V. Volchkova, W. Garten, C. Carbonnelle, S. Becker, J. Kahnt, U. Ströher, H.-D. Klenk, and V. Volchkov, "Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus.," *EMBO J.*, vol. 23, no. 10, pp. 2175–2184, 2004.
- [64] N. Sullivan, Z. Yang, and G. J. Nabel, "MINIREVIEW Ebola Virus Pathogenesis: Implications for Vaccines and Therapies," *J. Virol.*, vol. 77, no. 18, pp. 9733–9737, 2003.

-
- [65] J. D. Cook and J. E. Lee, "The Secret Life of Viral Entry Glycoproteins: Moonlighting in Immune Evasion," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 5, p. e1003258, 2013.
- [66] M. Mehedi, D. Falzarano, J. Seebach, X. Hu, M. S. Carpenter, H.-J. Schnittler, and H. Feldmann, "A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing," *J. Virol.*, vol. 85, no. 11, pp. 5406–5414, 2011.
- [67] K. M. Johnson, J. V. Lange, P. A. Webb, and F. A. Murphy, "Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire.," *Lancet (London, England)*, vol. 1, no. 8011, pp. 569–571, Mar. 1977.
- [68] J. E. Lee and E. O. Saphire, "Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry," *Futur. Virol.*, vol. 4, no. 6, pp. 621–635, 2009.
- [69] A. Troncoso, "Ebola outbreak in West Africa: a neglected tropical disease," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 5, no. 4, pp. 255–259, 2015.
- [70] E. M. Leroy, B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Delicat, J. T. Paweska, J.-P. Gonzalez, and R. Swanepoel, "Fruit bats as reservoirs of Ebola virus.," *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 575–576, Dec. 2005.
- [71] T. W. Geisbert and H. Feldmann, "Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and marburg virus infections," *J. Infect. Dis.*, vol. 204, no. SUPPL. 3, pp. 1075–1081, 2011.
- [72] A. Marzi and H. Feldmann, "Ebola virus vaccines: an overview of current approaches.," *Expert Rev. Vaccines*, vol. 13, no. 4, pp. 521–31, 2014.
- [73] A. M. Henao-restrepo, I. M. Longini, M. Egger, N. E. Dean, W. J. Edmunds, A. Camacho, M. W. Carroll, M. Doumbia, B. Draguez, S. Duraffour, G. Enwere, R. Grais, S. Gunther, S. Hossmann, and M. K. Kondé, "Articles Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial," vol. 6736, no. 15, pp. 1–10, 2015.
- [74] K. Boller, K. Schönfeld, S. Lischer, N. Fischer, A. Hoffmann, R. Kurth, and R. R. Tönjes, "Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles," *J. Gen. Virol.*, vol. 89, no. 2, pp. 567–572, 2008.
- [75] L. Niederstadt, "Herstellung von DNA induzierten mono-/ polyklonalen Antikörpern, zur Schnelldetektion von hochpathogenen viralen Erregern und bioterroristisch relevanten Toxinen," *Dissertation*, 2012.
- [76] M. George, T. Schwecke, N. Beimforde, O. Hohn, C. Chudak, A. Zimmermann, R. Kurth, D. Naumann, and N. Bannert, "Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element.," *Retrovirology*, vol. 8, no. 1, p. 30, 2011.
- [77] K. Hanke, O. Hohn, L. Liedgens, K. Fiddeke, J. Wamara, R. Kurth, and N. Bannert, "Staufen-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production.," *J. Virol.*, vol. 87, no. 20, pp. 11019–30, 2013.
- [78] S. R. Bartz and M. A. Vodicka, "Production of high-titer human immunodeficiency virus type 1 pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein.," *Methods*, vol. 12, no. 4, pp. 337–342, Aug. 1997.
- [79] N. Emi, T. Friedmann, and J. K. Yee, "Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus.," *J. Virol.*, vol. 65, no. 3, pp. 1202–1207, 1991.
- [80] M. C. Johnson, "Mechanisms for Env glycoprotein acquisition by retroviruses.," *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, vol. 27, no. 3, pp. 239–247, 2011.
- [81] W. F. Pickl, F. X. Pimentel-muiños, and B. Seed, "Lipid Rafts and Pseudotyping Lipid Rafts and Pseudotyping," *J. Virol.*, vol. 75, no. 15, pp. 7175–7183, 2001.
- [82] J. A. G. Briggs, T. Wilk, and S. D. Fuller, "Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping?," *J. Gen. Virol.*, vol. 84, no. 4, pp. 757–768, 2003.
- [83] K. Hanke, "FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER HERV-K PROTEINE ENV UND REC," *Dissertation*, 2010.
- [84] Veronika Lausch, "Etablierung eines Verfahrens zur Kombination der Elektronenmikroskopie (EM) mit der Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) sowie Untersuchungen zum Infektionsprozess und der Ultrastruktur des Humanen Endogenen Retrovirus K (HERV-K)," *Dissertation*, 2013.

-
- [85] R. J. Wool-Lewis and P. Bates, "Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines.," *J. Virol.*, vol. 72, no. 4, pp. 3155–3160, 1998.
- [86] T. Murakami, "Retroviral env glycoprotein trafficking and incorporation into virions.," *Mol. Biol. Int.*, vol. 2012, p. 682850, 2012.
- [87] A. J. Mouland, J. Mercier, M. Luo, L. Bernier, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen, "The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation.," *J. Virol.*, vol. 74, no. 12, pp. 5441–5451, 2000.
- [88] L. Chatel-Chaix, K. Boulay, A. J. Mouland, and L. Desgroseillers, "The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus.," *Retrovirology*, vol. 5, p. 41, 2008.
- [89] E. Mittler, L. Kolesnikova, B. Hartlieb, R. Davey, and S. Becker, "The cytoplasmic domain of marburg virus GP modulates early steps of viral infection.," *J. Virol.*, vol. 85, no. 16, pp. 8188–8196, 2011.
- [90] G. S. Mohan, L. Ye, W. Li, A. Monteiro, X. Lin, B. Sapkota, B. P. Pollack, R. W. Compans, and C. Yang, "Less Is More: Ebola Virus Surface Glycoprotein Expression Levels Regulate Virus Production and Infectivity," *J. Virol.*, vol. 89, no. 2, pp. 1205–1217, 2015.
- [91] O. Hohn, K. Strohschein, A. U. Brandt, S. Seeher, S. Klein, R. Kurth, F. Paul, C. Meisel, C. Scheibenbogen, and N. Bannert, "No evidence for XMRV in German CFS and MS patients with fatigue despite the ability of the virus to infect human blood cells in vitro," *PLoS One*, vol. 5, no. 12, 2010.
- [92] M. Geraerts, S. Willems, V. Baekelandt, Z. Debyser, and R. Gijssbers, "Comparison of lentiviral vector titration methods.," *BMC Biotechnol.*, vol. 6, p. 34, 2006.
- [93] M. Kuzembayeva, K. Dilley, L. Sardo, and W. S. Hu, "Life of psi: How full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles," *Virology*, vol. 454–455, no. 1, pp. 362–370, 2014.
- [94] W. Muranyi, S. Malkusch, B. Müller, M. Heilemann, and H. G. Kräusslich, "Super-Resolution Microscopy Reveals Specific Recruitment of HIV-1 Envelope Proteins to Viral Assembly Sites Dependent on the Envelope C-Terminal Tail," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 2, 2013.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit erstmalig einreiche, selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ort, Datum, Unterschrift