



BEUTH HOCHSCHULE
FÜR TECHNIK
BERLIN
University of Applied Sciences

FACHBEREICH V

ROBERT KOCH INSTITUT



FACHGEBIET 18

Funktionelle Analyse der putativen Rezeptorbindungsregion des Hüllproteins von HERV-K(HML-2)

BACHELORARBEIT

im Bachelor-Studiengang Biotechnologie
der Beuth-Hochschule für Technik Berlin
- University of Applied Sciences -

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

vorgelegt von
Maria PRIESNITZ

April 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.2 Humanes endogenes Retrovirus HERV	1
1.2.1 humanes endogenes Retrovirus (HERV)-K	2
1.2.2 Das Envelope-Protein	3
1.2.3 Rekonstruktion der ursprünglichen Envelopeproteine von HERV-K113	5
1.2.4 Das Plasmid $\Delta C1_V5$	6
1.3 Zielsetzung	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Puffer	9
2.1.2 Plasmide	10
2.1.3 Antikörper	10
2.2 Methoden	11
2.2.1 Zellkultur	11
2.2.2 Protein-Analytik	13
3 Ergebnisse	17
3.1 Proteinexpression	17
3.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	17
3.1.2 Western Blot	17
3.2 Virusexpression	19
3.2.1 p24-ELISA	20
3.2.2 Western Blot	20
3.3 Infektionsversuche	22
4 Diskussion	27
5 Fazit	33
6 Ausblick	35
A Anhang	39

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
CS	Furinprotease-Schnittstelle
D138A	pCDNA3-HERV _{oricoEnv} _D138A- Δ 659-699_V5
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
Δ144-153	pCDNA3-HERV _{oricoEnv} _ Δ 144-153- Δ 659-699_V5
ΔC1_V5	pCDNA3-HERV _{oricoEnv} _ Δ 659-699_V5
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEE146-148AAA	pCDNA3-HERV _{oricoEnv} _EEE146-148AAA- Δ 659-699_V5
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Env	Envelope (Hüllprotein)
Fa.	Firma
FKS	fetales Kälberserum
G135A	pCDNA3-HERV _{oricoEnv} _G135A- Δ 659-699_V5
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HML	<i>human MMTV-like group</i>
JSRV	Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus
kb	kilo Basen

kD	kilo Dalton
Ko	Kontrolle
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
MPMV	Mason-Pfizer-Affen-Virus
MSD	Transmembranbereich
Myr	Millionen Jahre
N128A	pCDNA3-HERVoricoEnv_N128A- Δ 659-699_V5
N153A	pCDNA3-HERVoricoEnv_N153A- Δ 659-699_V5
n.p.	nicht publiziert
ORF	<i>open reading frames</i> (offene Leseraster)
P145A	pCDNA3-HERVoricoEnv_P145A Δ 659-699_V5
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS-M	PBS-Magermilchpulver
PBST	PBS-Tween 20
PBST-M	PBST-Magermilchpulver
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/Streptomycin
R140A	pCDNA3-HERVoricoEnv_R140A- Δ 659-699_V5
R140C	pCDNA3-HERVoricoEnv_R140C- Δ 659-699
RBS	Rezeptorbindungsstelle
rER	raues endoplasmatische Retikulum
RKI	Robert-Koch-Institut
RLU	<i>relative light unit</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

RT	Reverse Transkriptase
S130A	pCDNA3-HERVoricoEnv_S130A- Δ 659-699_V5
S155A	pCDNA3-HERVoricoEnv_S155A- Δ 659-699_V5
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP	Signalpeptid
SU	<i>surface unit</i>
SW	Software
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TM	transmembrane Untereinheit
UZ	Ultrazentrifugation
WB	Western Blot

1 Einleitung

Viren sind infektiöse Einheiten mit einer Größe von ca. 16-300 nm. Der aus dem griechischen stammende Begriff „Virus“ wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts verwendet und bedeutet so viel wie „Gift“ oder „Schleim“. Es handelt sich dabei um obligat intrazelluläre Erreger, die somit zur Vermehrung und Verbreitung auf einen entsprechenden Wirt angewiesen sind. Die meisten Viren sind dabei hoch spezialisiert und interagieren nur mit Zellen bestimmter Spezies oder Zellarten. Viren werden an Hand von Faktoren wie Art des Genoms (DNA/RNA), Form, Ausprägung einer Membranhülle und anderen in Familien und Unterfamilien eingeteilt [1].

1.1 Retroviren

Bei Retroviren bzw. der Familie der *Retroviridae* handelt es sich um einzelsträngige RNA-Viren mit besonderen Eigenschaften. Retroviren sind durch das Enzym Reverse Transkriptase in der Lage ihre RNA innerhalb einer Wirtszelle in doppelsträngige DNA umzuschreiben und so den Einbau ihres Genoms in das Wirtsgenom zu ermöglichen. Des Weiteren können sie nicht nur horizontal - also über Produktion und Übertragung von Viruspartikeln an andere Zellen - übertragen werden, sondern auch vertikal. Dies bedeutet, dass sie ihr Genom mit Hilfe der viruseigenen Integrase in das Wirtsgenom von Keimbahnzellen integrieren und dieses dann vor der Zellteilung ebenfalls repliziert und so an die Tochtergeneration weitergegeben wird. Ist dies der Fall, tragen alle Zellen des Organismus das so genannte Provirus und es wird von endogenen Retroviren gesprochen.

Retroviren werden in zwei große Unterfamilien eingeteilt in *Orthoretrovirinae* und *Spumavirinae*. Innerhalb der Orthoretroviren wird nochmals in die Genera α bis ϵ , sowie Lentiviren unterschieden. Der wohl prominenteste Vertreter ist das humane Immundefizienz-Virus (HIV), welches zum Genus der Lentiviren gehört [1]. Endogene Retroviren finden sich unter den α , β , γ und δ -Retroviren, wobei einige von diesen auch im menschlichen Genom vorhanden sind. Einer der Gründe warum nicht alle Retroviren dauerhaft in das Wirtsgenom integriert werden bzw. wurden, ist die unterschiedliche Komplexität des Virusgenoms, wobei ausschließlich die weniger komplexen Viren endogen nachweisbar sind [1][2].

1.2 Humanes endogenes Retrovirus HERV

Gut 8 % des menschlichen Genoms bestehen aus den erwähnten zum Teil vollständigen endogenen Retroviren. Allerdings ist der Großteil dieser retroviralen Elemente auf Grund von diversen Mutationen und Deletionen nicht mehr funktional. Es gibt jedoch Gensequenzen die bis heute noch aktiv sind und dem Wirtsorganismus sogar nutzen. Beispiele dafür sind Syncytin-1 und

2, welche beide für die humane Plazentabildung relevant sind. Diese beiden Proteine werden über die so genannten *env*-Gene von HERV-W und HERV-FRD synthetisiert [3].

1.2.1 HERV-K

HERV-K wurde in den 1980er Jahren entdeckt, wobei das „K“ für die Aminosäure (AS) Lysin steht. Hintergrund dieser Bezeichnung ist, dass der Startpunkt der reversen Transkription dieser Virusfamilie eine Lysin-spezifische Primer-Bindungsstelle für tRNA besitzt. Auf Grund seiner Ähnlichkeit zu Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) - wodurch HERV-K überhaupt erst entdeckt wurde - wird diese Virusgruppe auch als *human MMTV-like group* (HML) bezeichnet. Beide Viren werden der Gruppe der β -Retroviren zugeteilt [4].

Wie in Abbildung 1.1 zu sehen ist, hat die Integration von HERV-K voraussichtlich vor ca. 35 Millionen Jahren stattgefunden, da man dieses Virus bereits in frühen Altweltaffen noch vor der Abspaltung der humanoiden Spezies nachgewiesen hat [5].

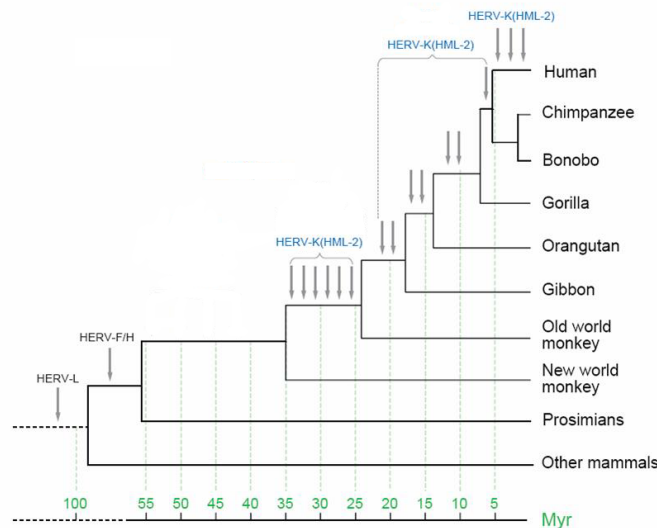


Abbildung 1.1: Grafische Darstellung des Nachweises von retroviralen Elementen von HERV-K(HML2) innerhalb der Entwicklungsgeschichte der Säugetiere (mammals); Zeitangabe in Millionen Jahre (Myr) [5]

Allerdings gibt es einige retrovirale Elemente, die ausschließlich in der humanen Spezies nachweisbar sind - also erst nach Abspaltung von den Chimpanzen vor etwa 5 Millionen Jahren in das Genom integriert worden sein können [6].

Das bisher jüngste gefundene endogene Retrovirus ist HERV-K113. Die Integration fand laut phylogenetischer Studien vermutlich vor nur 150.000 - 200.000 Jahren statt. Etwa 15 % der Weltbevölkerung tragen dieses Provirus in ihrem Genom. Dabei fällt auf, dass im afrikanischen Raum die Prävalenz mit 30-40 % deutlich höher liegt, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Infektion mit dem damals noch exogenen Virus dort stattgefunden und sich von dort nach Osten und Norden verbreitet hat [7]. Das Provirus, welches auf Chromosom 19p13.11 integriert, besitzt noch immer vollständige *open reading frames* (ORF) für alle viralen Proteine

[8]. ORF bezeichnet dabei die zwischen Start- und Stopcodon liegende Nukleotid-Sequenz [9]. In Abbildung 1.2 ist der Aufbau des Provirus sowie die daraus synthetisierten RNA-Spezies dargestellt.

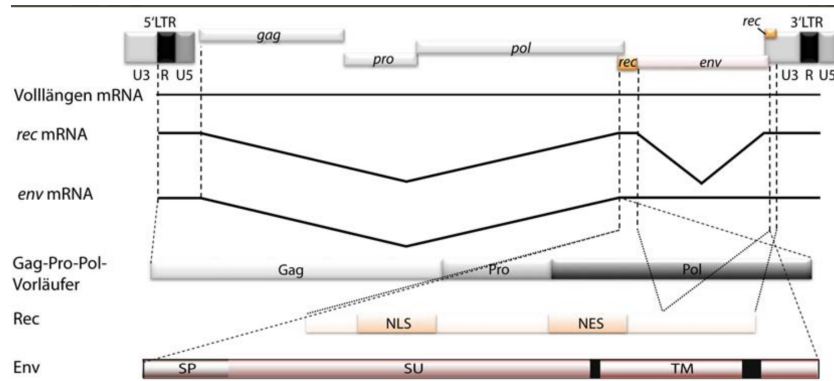


Abbildung 1.2: Provirus von HERV-K113, sowie die daraus gebildete RNA vor und nach dem Spleißvorgang, die Spleißstellen sind durch die gestrichelten Linien angedeutet, unten im Bild sind die Vorläufermoleküle für das Env- und das Gag-Pro-Pol-Protein dargestellt, sowie das bereits fertig prozessierte Rec-Protein [10]

Das Provirus hat eine Länge von ca. 8,9 kb und besitzt noch den üblichen Aufbau exogener Retroviren. Es beinhaltet im wesentlichen vier große aufeinander folgende Gene nämlich *gag*, *pro*, *pol* und *env* welche an 5' und 3'-Ende von *long terminal repeats* (LTRs) begrenzt werden. LTRs sind sich an Anfang und Ende des Genoms wiederholende Gensequenzen, welche die Genexpression kontrollieren. *Gag* codiert für die Synthese des Hauptstrukturproteins dem (Nukleo-)Capsidprotein. *Env* codiert für das Envelope (Hüllprotein), welches im Laufe der vertikalen Verbreitung des Virus unerlässlich ist. *Pro* und *pol* hingegen codieren für die viralen Enzyme. *Pro* für die zur Prozessierung der Vorläufermoleküle notwendige Protease und *pol* für die reverse Transkriptase, Integrase und die RNaseH [10]. Die RNaseH dient dem Abbau des RNA-Anteils aus dem durch die reverse Transkriptase gebildeten DNA/RNA-Hybridstrang und ermöglicht so die Synthese einer dsDNA [1]. Des Weiteren wird das akzessorische Rec-Protein codiert, welches im Verdacht steht die Tumorentwicklung zu begünstigen. Seine eigentliche Aufgabe ist es den Transport der ungespleißten mRNA in das Zytoplasma zu ermöglichen [11].

1.2.2 Das Envelope-Protein

Das Envelope (Env)-Protein oder auch Hüllprotein beinhaltet diejenigen Elemente welche für die Anheftung des Virus an eine Wirtszelle nötig sind, die wiederum die Fusion des Virus mit der Zelle ermöglicht und somit die Übertragung der viralen RNA. Zunächst entsteht aus der volllängen mRNA ein etwa 80 kD großes Präprotein (siehe Abbildung 1.2 und 1.3), welches durch die anschließende Prozessierung in zwei funktionelle Einheiten - die *surface unit* (SU) und die transmembrane Untereinheit (TM) - getrennt wird.

Die TM besitzt ein Molekulargewicht von 26 kD, während die SU mit 44 kD etwa doppelt so schwer ist. Die verbleibenden ca. 10 kD ergeben das Signalpeptid (SP), welches im Laufe der Prozessierung abgespalten wird.

Da diese Proteine auf der Oberfläche der Viruspartikel zu finden sind, werden sowohl SU als

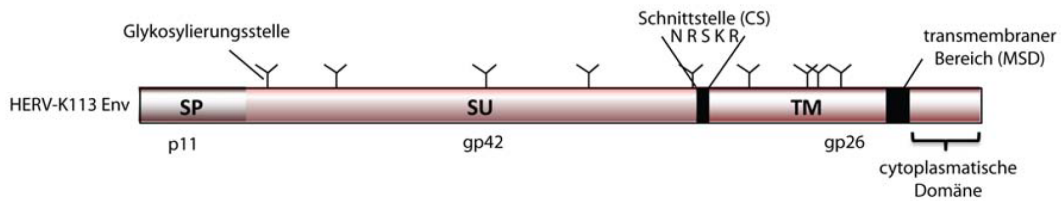


Abbildung 1.3: Env-Präprotein von HERV-K113 zusammengesetzt aus Signalpeptid (SP), *surface unit* (SU) und transmembrane Untereinheit (TM) [10]

auch TM bereits vor ihrer proteolytischen Spaltung durch die Furinprotease innerhalb des rauen endoplasmatischen Reticulums (rER) an den in Abbildung 1.3 gekennzeichneten, spezifischen Stellen N-glycosyliert [12]. Innerhalb der Aminosäure-Sequenz des Envelope-Proteins finden sich neun dieser Glycosylierungsstellen, fünf auf der SU und vier auf der TM. Die Verzuckerungen finden stets an der AS-Abfolge N-X-S/T statt, wobei X eine beliebige AS darstellt, abgesehen von Prolin [10]. Während der Translation am rER erfolgt ebenfalls die Verankerung des Transmembranbereichs MSD der TM in der Zellmembran, sowie die anschließende Entfernung des SP. Nach bzw. während noch weiterer Modifikationen der Glycosylierungen im Golgi-Apparat wird das noch immer ungespaltene Präprotein in Richtung Membran transportiert. Auf dem Weg dorthin kommt es dann zur Spaltung zwischen SU und TM durch die zelleigene Furin-Protease an der in Abbildung 1.3 ebenfalls gezeigten Furinprotease-Schnittstelle (CS) [10][12]. Die so fertig prozessierten Proteine lagern sich anschließend unter Ausbildung nicht-kovalenter-Bindungen zu Trimeren aus SU-TM-Heterodimeren zusammen [1] [13].

Die Rezeptorbindungsstelle

Die Rezeptorbindungsstelle (RBS) liegt in der SU des Env. Dies ist der Teil des Hüllproteins welcher sich nach außen hin auf der Oberfläche des Virus befindet. Die RBS ist von Interesse, weil sie der notwendige Faktor für eine erste Anheftung an eine potentielle Wirtszelle ist und somit Grundvoraussetzung für eine Fusion von Virus und Wirt. Bis heute ist die RBS von HERV-K unbekannt. Es wurde aber bereits die AS-Sequenzen dessen mit MMTV und Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV) - zwei weiteren β -Retroviren - in ihrer Gesamtheit verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass, obwohl die AS-Sequenzen deutlich voneinander abweichen es sich auf Grund der übergeordneten strukturellen Organisation der Genome um homologe handelt [14]. Dementsprechend wurde versucht durch Alignment dieser drei Virusgenome die RBS für HERV-K zu finden. Für MMTV befindet sich die bereits bekannte RBS zwischen zwei Glycosylierungspunkten 35 Aminosäuren downstream des Beginns der AS-Sequenz der SU [15]. Sowohl HERV-K als auch JSRV besitzen an ähnlichen Positionen ebenfalls Glycosylierungsstellen in Form eines Arginins (N). Dies diente unter anderem als Orientierungspunkt für das Alignment. Richtet man die drei Sequenzen innerhalb dieser Punkte so aneinander aus, dass der Konsens möglichst hoch ist, entsteht das in Abbildung 1.4 gezeigte Ergebnis (Gespräch mit Prof. Dr. Norbert Bannert, RKI, n.p.).

Innerhalb dieses Sequenzbereiches konnten vier Positionen ermittelt werden, an denen alle drei Viren die selbe AS besitzen, und sechs weitere, an denen die Sequenzen für zumindest zwei Viren übereinstimmen. Hierzu sei generell gesagt, dass davon auszugehen ist, dass über viele Jahre konservierte Aminosäuren in noch funktionsfähigen Viren, wie MMTV und JSRV und zusätzlich noch in relevanten Bereichen wie der RBS, eine Bedeutung für dessen Funktion

	128	RBS	155
HERV-K	:	NDSVWVPGPTDDRCPAKPEEEGMMINISI	
MMTV	:	NQTIYLGGS SPDFHGFR----- NMSG	
JSRV	:	NDTSL LG GKSDIHIS --PQQA---- NISF	

Abbildung 1.4: Alignment der (putativen) Rezeptorbindungsstelle (roter Kasten) verschiedener Retroviren, dunkelgrün: in allen drei Viren konserviert; hellgrün: in 2 Viren konserviert [15]

haben und somit auch relevant sein könnten für die Funktionalität des Env von HERV-K. Insofern ist es sinnvoll bei der Suche nach bzw. der Bestätigung der RBS von HERV-K ein besonderes Augenmerk auf diese Aminosäuren zu legen. Ebenfalls interessant sind dabei charakteristische Sequenzbereiche wie z.B. die drei aufeinander folgenden Glutaminsäuren (E), welche gemeinsam mit Prolin (P) und Glycin (G) eine hydrophilenbereich darstellen welcher potentiell relevant ist für die Funktion bzw. die Faltung des Proteins [16] [17]. Bei MMTV war unter anderem die gezielte Mutation eben solcher Bereiche oder Aminosäuren und der anschließenden Untersuchung der Effekte auf die Funktionalität der Proteine ein Teil der Ermittlung der publizierten RBS [15].

1.2.3 Rekonstruktion der ursprünglichen Envelopeproteine von HERV-K113

Wie bereits erwähnt, spielt HERV-K113 eine große Rolle auf Grund des nahezu vollständig vorhandenen Provirus. Da aber das Virus heute ausschließlich endogen existiert, war es für weitere Untersuchungen des Envelope-Proteins notwendig, das ursprüngliche Virus exogen zu rekonstruieren. Dazu wurde die Aminosäure-Sequenz des endogenen HERV-K-Env zunächst mit 10 ebenfalls gut erhaltenen HERV Sequenzen verglichen. Wichtig dabei war, dass es sich hierbei ebenfalls um human-spezifische Sequenzen handelt. Es wurden acht Positionen gefunden, welche vermutlich durch postinsertionale Mutationen die Funktionalität der entsprechenden Proteine beeinflusst. Eine dieser Mutationen befindet sich - wie in Abbildung 1.5 zu sehen - innerhalb der putativen Rezeptorbindungsstelle.

Diese Mutationen wurden mittels Mutagenese rückgängig gemacht und die Aminosäuren der Consensus-Sequenz entsprechend eingefügt. Auf Grund dessen wurde die entstandene Sequenz mit „oricoEnv“ betitelt, wobei „ori-“ für Original-Sequenz steht.

Neben diesen acht Mutationen wurden noch weitere drei Positionen ermittelt welche jedoch als Varianten innerhalb der Sequenz interpretiert und deshalb nicht verändert wurden. Eine dieser Positionen ist ebenfalls in Abbildung 1.5 zu sehen; in diesem Fall ist sichtbar, dass einige Proviren an Position 137 ein Isoleucin (I) aufweisen, während HERV-K113 sowie drei weitere Proviren an der selben Stelle ein Threonin (T) besitzen.

Mit der so rekonstruierten Originalsequenz von HERV-K113 konnten anschließend erfolgreich Viruspartikel produziert werden, welche auch in der Lage waren, Zellen zu infizieren [18].

		130	140	RBS	150	160
					
K113	121	NPIEIIYVNS	VWVPGPTDDC	CPAKPEEEGM	MINISIGRY	
K101	24	...V.....	E.....R			
K102	24I..R			
K104	121	...V.....R			
K107	24	...V.....I..R			
K108	121	..T.V.....I..R		H.
K109	121	...V.....I..R			
K115	121	...V.....I..R			
Y178333	121	...V.....H			
AP000776	121	...V.....I..R			
AC025420	120	...V.....H..I..R		H.
consensus	121	...V.....I..R			
oricoEnv	121	...V.....I..R			

Abbildung 1.5: Ausschnitt des Alignment der Aminosäuresequenz des Envelope-Proteins verschiedener human spezifischer endogener Retroviren, grau hinterlegt: rückmutierte Positionen, schwarzer Kasten: in oricoEnv unveränderte Variationen, roter Kasten: putative RBS [18]

1.2.4 Das Plasmid $\Delta C1_V5$

Die durch die Rekonstitution entstandene Original-Sequenz wurde zur Optimierung der Proteinexpression und dem verbesserten Einbau des Envelopes in virale Partikel noch weiteren Modifikationen unterzogen. Die *env*-Sequenz befindet sich in einem 5,4 kb großen pcDNA3 Vektor, welcher C-Terminal einen V5-Tag aufweist [18]. Der V5-Tag ist ein 15 AS langes sogenanntes Fusionsprotein und dient bei späteren Analysen als Antikörper (AK)-target. Gegen den V5-Tag gibt es verschieden spezifische Antikörper, wodurch sich die exprimierten Proteine z.B. in einem Western Blot (WB) sehr leicht nachweisen lassen [19]. Ein weiterer wichtiger Faktor zur Optimierung der Proteinexpression stellt die Codonoptimierung dar, woher der zweite Teil des Sequenznamens „-co“ herrührt [18]. Im Zuge dessen wurde ohne Veränderung der Aminosäuresequenz der GC-Gehalt von 42 % auf 63 % erhöht und zugleich die Verwendung seltener Codons verringert. Eine weitere Modifikation stellt die in Abbildung 1.6 gezeigte Trunkierung des C-Terminus des Envelope-Proteins dar.

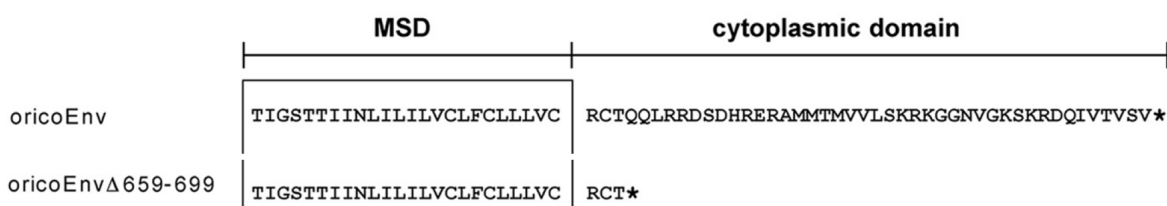


Abbildung 1.6: Darstellung der Verkürzung des C-Terminus (*cytoplasmatic domain*) des für die Untersuchung der RBS verwendeten Konstruktes $\Delta C1_V5$ im Vergleich mit der nicht verkürzten Originalsequenz; MSD = Transmembranbereich [18]

Dabei wurden - wie in Abbildung 1.6 gezeigt - die Aminosäuren 659 - 699 entfernt, sodass sich der C-Terminale V5-Tag nun direkt an den Transmembranbereich (MSD) anschließt. Die Verkürzung des Envelope-Proteins erzeugt eine geringfügige Verringerung der Proteingröße, insbesondere sichtbar bei dem prozessierten TM, der hinzugefügte V5-tag „vergrößert“ das Protein wiederum nur unbedeutend um ca. 1,7 kD.

Das optimierte Konstrukt mit dem vollständigen Namen pCDNA3-HERV_{oricoEnv_Δ659-699_V5} ($\Delta C1_V5$) weist im Verhältnis zum Wildtyp, eine deutlich höhere Proteinexpressionsrate und eine verbesserte Inkorporation in virale Partikel auf [18].

1.3 Zielsetzung

Ziel des Projektes ist es die putative RBS von HERV-K genauer zu untersuchen und somit den postulierten Bereich in der SU zu bestätigen. Zwecks dessen wurden bereits im Vorlauf dieser Arbeit diverse Mutanten von $\Delta C1_V5$ mit Mutationen an spezifischen Stellen der SU auf oder in unmittelbarer Nähe der putativen RBS generiert. Nun soll beurteilt werden welchen Einfluss diese Mutationen auf die Expression des Envelope-Proteins sowie dessen Inkorporation in lentivirale Partikel (HIV) haben. Des Weiteren soll die Infektiosität und somit die Funktionalität produzierter Viruspartikel beurteilt werden, indem humane Zellen gezielt infiziert werden und die Infektionsrate durch ein entsprechendes Reporter-System überprüft wird.

2 Material und Methoden

Geräte wie Zentrifugen (Fa. Eppendorf), Brutschränke, Schüttler etc. sowie die regulär verwendeten Reagenzien (Fa. Roth) entsprachen der üblichen Ausstattung eines mikro- und molekularbiologischen Laboratoriums.

2.1 Material

2.1.1 Puffer

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung/Hersteller	Verwendung
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	123 mmol/L Natriumchlorid, 2,7 mmol/L Kaliumchlorid, 10 mmol/L Dinatriumhydrogenphosphat, 2 mmol/L Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,0	Zellkultur, WB, ELISA
L-Glutamin	200 mmol/L (Biochrom)	Zellkultur
100x Penicillin/Streptomycin (P/S)	10 000 IE Penicillin/ 10 000 µg/mL Streptomycin (Biochrom)	Zellkultur
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS (Biochrom)	Zellkultur
Succrose 20 %	20 % (w/v) Succrose in Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) gelöst	Ultrazentrifugation
Polybrene [®] 1 mg/mL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Virusinfektion
PBS-Tween 20 (PBST) 0,05 %	0,05 % Tween 20 in PBS	ELISA
PBS-Magermilchpulver (PBS-M) 2 %	2 % (w/v) Magermilchpulver in PBS gelöst	ELISA
PBST-Magermilchpulver (PBST-M) 2 %	2 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Tween 20 (PBST) 0,05 % gelöst	ELISA
Bicarbonat-Puffer	1 Carbonate-Bicarbonat-Buffer-Tablette (Fa. Sigma) in 100 mL A. dest	ELISA
Phosphat-Citrat-Puffer	1 Phosphate-Citrate-Tablette (Fa. Sigma) in 100 mL A. dest	ELISA
1x Laemmli-Probenpuffer	60 mmol/L Tris-HCl-Puffer (pH 6,8), 2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 5 % <i>beta</i> -Mercaptoethanol, 10 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau	SDS-PAGE
Laufpuffer	25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 in A. dest gelöst	SDS-PAGE
Transferpuffer	20 % (v/v) Methanol in Laufpuffer	WB
Waschpuffer (PBST 0,1 %)	0,1 % Tween 20 in PBS	WB
Blocking-Puffer (PBST-M 5 %)	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T 0,1 % gelöst	WB

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen unter Angabe der Zusammensetzung (soweit bekannt) und dem Verwendungszweck

2.1.2 Plasmide

Konstrukte/ Vektoren	Bezugsquelle
pCDNA3-HERVoricoEnv_Δ659-699_V5 (ΔC1_V5)	Kirsten Hanke [18]
pCDNA3-HERVoricoEnv_D138A-Δ659-699_V5 (D138A)	Eigene Arbeit
pCDNA3-HERVoricoEnv_G135A-Δ659-699_V5 (G135A)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_P145A_Δ659-699_V5 (P145A)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_R140A-Δ659-699_V5 (R140A)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_S130A-Δ659-699_V5 (S130A)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_S155A-Δ659-699_V5 (S155A)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_Δ144-153-Δ659-699_V5 (Δ144-153)	Jula Wamara, n.p.
pCDNA3-HERVoricoEnv_EEE146-148AAA-Δ659-699_V5 (EEE146-148AAA)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_N128A-Δ659-699_V5 (N128A)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_N153A-Δ659-699_V5 (N153A)	
pCDNA3-HERVoricoEnv_R140C-Δ659-699 (R140C)	
pWPXL-GFP	
pWPXL-Luzi	
psPAX2	Anja Richter

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Plasmide; n.p. nicht publiziert

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
α-GapDH	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α-HIV Gag-Antikörper AG3.0	Maus	Norley <i>et al.</i> [20]
α-V5	Maus	AbD Serotec, MorphoSys AG, Martinsried, Deutschland
Anti-Human-IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HERV-K α-Env (HERM-1811-5)	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA
HIV-Poolserum (α-HIV)	Mensch	Norley <i>et al.</i>
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG	Ziege	LI-COR Biosciences - GmbH, Bad Homburg, Deutschland
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG	Ziege	LI-COR Biosciences - GmbH, Bad Homburg, Deutschland

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Antikörper

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Medien

Medium	Bezugsquelle
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
RPMI-1640	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Zellkultur-Medien

Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Medium
HEK293T	humanes embryonales Nierenkarzinom	DMEM + 10 % FKS, 1 %L-Gly, 1 % P/S
SKmel28	humanes Melanom	RPMI + 10 % FKS, 1 %L-Gly, 1 % P/S

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Zelllinien

Zellkultivierung

Die Zellen wurden im Allgemeinen in T150-Zellkulturflaschen (Biochrom) bei 37 °C mit einer CO₂-Begasungsrate von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 98 % kultiviert. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte nach mikroskopischer Kontrolle 2-3 mal die Woche. Dabei wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Kunststoffoberfläche gelöst, im entsprechenden Verhältnis (meist 1:8 - 1:10) gesplittet und frisches Medium hinzugegeben. Die überzähligen Zellen wurden verworfen. Zu Beginn jeder Woche wurden die Zellen in frische Kulturflaschen überführt.

Virusproduktion

Die Produktion von Viruspartikeln erfolgte mittels PEI-Transfektion mit einem 3:1 Verhältnis von PEI zu DNA. Transfiziert wurden 293T-Zellen in T75-Zellkulturflaschen mit einer Konfluenz von ca. 60-70 %.

Neben dem von HERV-K stammenden und zu untersuchenden *env* mussten außerdem die zur Bildung eines vollständigen Virus nötigen *gag*, *pro* und *pol* Gene transfiziert werden. Dies erfolgte durch Co-Transfektion mit dem psPAX2-Plasmid. Hierbei handelt es sich um die Gensequenzen von HI-Viren, weshalb hier HERV-HIV-Pseudotypisierte Viren entstehen, welche auch als „lentivirale-Partikel“ bezeichnet werden. Als Reporter-Gen wurde noch eine drittes Plasmid (pWPXL-GFP/Luzi) Co-Transfiziert, welches jeweils die Gensequenz für die Expression von Grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder Luziferase trägt und somit eine

Detektion der Viren mittels Fluoreszenz-Detektion oder aber Luziferase-Assay ermöglicht. Die verschiedenen Plasmide wurden in einem spezifischen Verhältnis zueinander in den Transfektions-Ansatz gegeben, welche neben dem restlichen Pipettierschema in Tabelle 2.6 angegeben sind. Bei dem ebenfalls in Tabelle 2.6 angegebenen DMEM-Basal handelte es sich um das reine Nährmedium ohne weitere Zusätze wie Antibiotika oder fetales Kälberserum (FKS)

	Menge	Anteil-DNA [%]
pWPXL-GFP	6,25 µg	50
psPAX2	4,7 µg	37,5
Envelope	1,6 µg	12,5
PEI	37,5 µg	
DMEM Basal	2500 µL	

Tabelle 2.6: Pipettierschema der Ansätze für die PEI-Transfektion zur Produktion von pseudotypisierten HERV-HIV-Viruspartikeln bei Transfektion einer T75 Zellkulturf Flasche mit einer DNA-Gesamtmenge von 12,55 µg DNA, ausgesäte Zellzahl: $3,75 \cdot 10^6$

Die fertigen Ansätze inkubierten 15 Minuten bei Raumtemperatur und wurden dann auf die Zellen gegeben. Nach 8-16 h erfolgte ein Mediumwechsel, die Virusernte jeweils nach 48 und 72 h. Die gesammelten Virusüberstände wurden jeweils bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert und anschließend steril filtriert (0,45 µm). Zur weiteren Aufreinigung des Virus erfolgte anschließend eine Ultrazentrifugation (UZ).

Ultrazentrifugation

Zum Aufreinigen und Konzentrieren der filtrierten Virusüberstände wurden diese zunächst vorsichtig auf 5 mL einer 20 %igen Sucroselösung pipettiert. Die UZ erfolgte bei 32 000 rpm, 4 °C für 3 h. Nach Abschluss der Zentrifugation wurden die Röhrchen zügig abgekippt und das Viruspellet im Rücklauf resuspendiert. Nach 30 minütiger Kühlung im Eisbad wurden die Viren aliquotiert und bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

Virusinfektion

Die Virusinfektion erfolgte je nach Reporter-Gen unterschiedlich. Bei GFP als Reporter erfolgte die Infektion in 48-Well-Platten mit einer Zellzahl von $4 \cdot 10^4$ Zellen/Well. Infiziert wurde jeweils im Doppelansatz mit 500 ng Virus bei einem Gesamtvolumen von 250 µL pro Well. Bei gewünschter Detektion mittels Luziferase-Assay wurden je $1,5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. In diesem Fall wurde mit 10 ng Virus und 50 µL Gesamtvolumen infiziert. Bei den zu infizierenden Zellen handelte es sich um SKmel28-Zellen.

Der Infektionsansatz setzte sich jeweils aus den genannten Mengen DNA, Medium sowie 8 µg/mL Polybrene[®] zusammen. Das Volumen des Mediums war variabel, da dieses dem Auffüllen des Volumens auf das Gesamtvolumen entsprach. Nach Zugabe des Infektionsansatzes wurden die Kulturen für 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Nach 72 h erfolgte die Auswertung entsprechend dem Reportersystem mittels FACS-Analyse oder Luziferase-Assay.

FACS-Analyse

Die FACS-Analyse wurde zur Beurteilung der Infektionsversuche verwendet und stellt eine Form der Durchflusszytometrie dar. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann trypsiniert. Anschließend wurden diese für 10 min bei 1000 rpm pelletiert, in 2%igem Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und für 30 Minuten bei 8 °C fixiert. Die so vorbereiteten Zellen wurden dann am FACS-Analyser (BD FACSCalibur™) gemessen. Es wurden jeweils 20.000 Zellen gezählt. Mittels der Software (SW) CellQuest Pro von Becton Dickinson konnte anschließend ein Histogramm erstellt werden. Die weitere Auswertung erfolgte mittels der SW GraphPad Prism 7.03.

Luziferase Assay

Mittels des Luziferase-Assays wurde die Enzymaktivität 72 Stunden nach Infektion überprüft. Die Zellen wurden nach den Herstellerangaben für das Luciferase Assay System von Promega präpariert und anschließend die Luziferase-Aktivität mit Hilfe des Centro LB 960 Luminometers von Berthold Technologies bestimmt [21]. Die Auswertung der gemessenen Extinktionen erfolgte mittels GraphPad Prism 7.03.

2.2.2 Protein-Analytik

Proteinextraktion

Um die Proteinexpression innerhalb von Zelllinien oder Viruspartikeln untersuchen zu können mussten diese zunächst entsprechend extrahiert werden. Im Fall der Proteine innerhalb von humanen Zelllinien müssen die Zellen zunächst lysiert werden. Dazu wurden die mit PBS gewaschenen und trypsinierten Zellen für 10 Minuten bei 1000 rpm pelletiert und je nach Größe des Pellets mit 100-400 µL NP40-Lysepuffer versetzt. Nach ca. 30 Minuten Inkubation auf Eis mit mehrmaligem kräftigem Schütteln wurde der Ansatz erneut abzentrifugiert und der die Proteine enthaltende Überstand abgenommen.

Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels dem Qubit™3 Fluorometer von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Messung erfolgte an Hand der Herstellerangaben für das Qubit™ Protein Assay Kit (Invitrogen) [22]. Für die Ermittlung der Kalibrationsgerade wurden die drei im Kit enthaltenen Standards mit definierten Konzentrationen gemessen. Das Fluorometer ermittelt daraus selbstständig eine Eichgerade und gibt direkt die Konzentration der gemessenen Proben aus, sodass keine weiteren Berechnungen mehr nötig sind.

p24-Gag-ELISA

Der p24-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) diente dem Nachweis der HIV-Gag-Proteine der pseudotypisierten Viren. Der Erste Schritt war das Coating der 69-Well-plate (96 Wellplate falcon 353915) mit AG3.0. Dafür wurden 50 μ L des entsprechend verdünnten AK (1:50) in jedes Well pipettiert und die Platte bei 4 °C für mindestens 24 h inkubiert.

Die so mit AK-beschichtete Platte wurde dreifach mit PBST gewaschen und anschließend mit Milchpuffer für ca. 1 h bei 37 °C blockiert (200 μ L/Well). Nach erneutem Waschen der Platte mit PBST konnte diese nun beladen werden. Dafür wurden die nachzuweisenden Viren zunächst inaktiviert, dies geschah durch Zugabe von 0,2% Tween.

Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Probe aufgetragen. Der Standard wurde jeweils in Doppelbestimmung links und rechts in die äußeren Wells pipettiert und bei Verwendung mehrerer Platten auf jeder Platte mitgeführt. Die unterste Reihe wurde jeweils nicht mit Proben oder Standards beladen und diente als Negativ-Kontrolle (Ko) um unspezifische Bindungen oder Verunreinigungen der Reagenzien auszuschließen. In die restlichen Wells wurden die Proben jeweils im Doppelansatz in einer linearen Verdünnungsreihe aufgetragen. Zum Verdünnen von Probe und Standard wurde PBS verwendet. Nach Inkubation der Proben für 1 h bei 37 °C und dreimaligem gründlichen Waschen mit PBST wurde der primäre-AK - in diesem Fall Anti-HIV-AK in Form eines Poolserums - aufgetragen (50 μ L/Well). Der primär-AK wurde ebenfalls für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Platte erneut drei mal mit PBST gewaschen.

Es folgt der Auftrag von 50 μ L/Well von in PBST-Magermilchpulver (PBST-M) (2%) verdünnten Anti-Human-Globulin als sekundärer-AK. Auch dieser wurde erneut bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Platte gründlich mit PBST gewaschen um unspezifische Signale zu vermeiden. Darauf folgend wurden 50 μ L Substrat/Well aufgetragen und die Platten bei Raumtemperatur für ca. 5-10 Minuten inkubiert. Nach Farbumschlag zu einer quittengelben Farbe wurde die Reaktion mit 20 μ L Schwefelsäure/Well abgestoppt und die Extinktionen der einzelnen Vertiefungen der Platte mittels des ELISA-Readers SunriseTM (Tecan) gemessen (492/620 nm). Bei der Auswertung wurden mittels der mitgeführten Standards für jede Platte einzeln Kalibrationsgeraden erstellt. Anhand derer Geradengleichung dann die Konzentrationen der Proben ermittelt wurden. Die linken und rechten Standards innerhalb einer Platte wurden jeweils unabhängig voneinander ausgewertet und die Konzentrationen der Proben bei deutlicher links/rechts-Verschiebung jeweils mit der Geradengleichung des näher gelegenen Standards berechnet. Die weitere grafische Aufarbeitung erfolgte mit GraphPad Prism 7.03.

SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung denaturierter Proteine in einem elektrischen Feld. Dafür musste zunächst ein SDS-Gel gegossen werden. In diesem Fall wurden 1,5 mm breite Gele gegossen mit einem prozentualen Polyacrylamidanteil im Trenngel von 12% und 5% im Sammelgel. Die Bestandteile wurden wie in Tabelle 2.7 angegeben pipettiert.

Nach Einfüllen des Gels in die Gelkammer und Aushärten dessen wurde das Gel in die Laufkammer eingesetzt und die Apparatur mit Laufpuffer gefüllt.

Als Probenvorbereitung mussten die zu untersuchenden Proben mit Dithiothreitol (DTT)-haltigem Probenpuffer (0,6 mol/L) versetzt werden. Hier wurde ein 6x-Probenpuffer (Laemmli-

	Trenngel	Sammelgel
Aqua dest	3,4 mL	5,7mL
30% Acrylamid	4 mL	1,7 mL
Tris 1,5 M	2,5 mL	-
Tris 0,5 M	-	2,5 mL
10% SDS	100 μ L	100 μ L
10% APS	50 μ L	50 μ L
Temed	5 μ L	10 μ L

Tabelle 2.7: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamid-Gele (SDS-PAG), Mengenangaben für Herstellung von 2 Gelen, prozentualer Polyacrylamid-Anteil: Trenngel 12 %, Sammelgel 5 %, Geldicke: 1,5 mm

Puffer) verwendet, welcher vor der Nutzung mit DTT versetzt worden ist. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Für den Proteinnachweis aus Zelllysaten wurden jeweils 20 μ g-Protein eingesetzt. Zum Nachweis der Envelope-Proteine in den produzierten Viren wurden je 20 μ L der ultrazentrifugierten Überstände aufgetragen. Als Negativkontrollen wurden jeweils Lysate bzw. Kulturüberstände untransfizierter Zellen mitgeführt. Als Größenstandard wurde der „Pageruler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet.

Der Gellauf lief zunächst für 10 Minuten bei 120 V und anschließend für weitere 60 min bei 180 V. Im Anschluss wurde das Gel aus der Kammer entfernt, die Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgetrennt. Das so vorbereitete Gel wurde für den nachfolgenden WB verwendet.

Western Blot

Der Western Blot (WB) diente der Beurteilung der Expression spezifischer Proteine. Zunächst wurde das Gel aus der SDS-PAGE sowie 2 Filterpapiere in Transferpuffer gelegt. Waren die Filterpapiere vollständig im Puffer getränkt, wurde eines der Filterpapiere in die Blottingapparatur (Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) eingelegt. Anschließend wurde die Membran (Nitrocellulose, 45 μ m) ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet und auf das erste Filterpapier gelegt. Dann wurde das für ca. 30 Minuten in Transferpuffer äquilibrierte Gel und zu Letzt das zweite Filterpapier darauf geschichtet. Dieses „Sandwich“ wurde mit Transferpuffer übergossen und Luftblasen gründlich entfernt.

Nun konnte die Apparatur angeschlossen und das blotting (20 V / 60 min) gestartet werden. Nach Abschluss dessen wurde die Membran für 40 min in Blocking-Puffer blockiert, anschließend mit PBST gewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C mit dem primären AK inkubiert.

Nach gründlichem Waschen (3x 5 min mit PBST) wurde ein markierter sekundäre-AK auf die Membran gegeben und ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur oder aber über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 3 mal für 10 min bei Raumtemperatur mit PBST gewaschen und ausgewertet.

Die Detektion der gesuchten Proteine erfolgte hier mittels Fluoreszenz markierter sekundär-Antikörper. In diesem Fall konnte mit Hilfe des Odyssey[®] Classic der Firma LI-COR[®] Biosciences die Membran gescannt und die Fluoreszenz erfasst werden. Zur weiteren Auswertung wurde die Software Image Studio Vers 5.2 (LI-COR[®]) verwendet. Die Bestimmung der Proteingrößen wurde mittels des GelAnalysers 2010 durchgeführt [23].

Als Auftragskontrolle wurde beim Proteinnachweis aus Zellysat zusätzlich jeweils das Enzym GapDH detektiert. Beim Nachweis des Envelope-Proteins im Virusüberstand wurde das virale p24-Protein detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinexpression

Zur Ermittlung der Expression des zu untersuchenden Envelope-Proteins in transfizierten 293T-Zellen wurde zunächst die Gesamtproteinkonzentration bestimmt und anschließend eine SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot durchgeführt.

3.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bei der Bestimmung des Gesamtproteins ergab sich für beide Virusproduktionen jeweils eine Konzentration von ca. $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in den jeweiligen Zellysaten. Die im einzelnen gemessenen Konzentrationen sind in Anhang in Tabelle [A.1](#) zu finden.

3.1.2 Western Blot

Die Grafik [3.1](#) zeigt das Ergebnis des Western Blot (WB) für den Nachweis der Expression der Envelope-Proteine der einzelnen Mutanten sowie $\Delta\text{C1_V5}$ in den transfizierten 293T-Zellen.

Teil B der Abbildung [3.1](#) zeigt die auf der Höhe von 36 kD liegende Kontroll-Bande (GapDH). Die Negativ-Kontrolle (Mock) zeigt hier keine Bande, da kein Protein aufgetragen worden ist. An Hand der GapDH-Bande kann davon ausgegangen werden, dass alle Proben gleichmäßig und somit auch die gleiche Menge Protein aufgetragen worden ist.

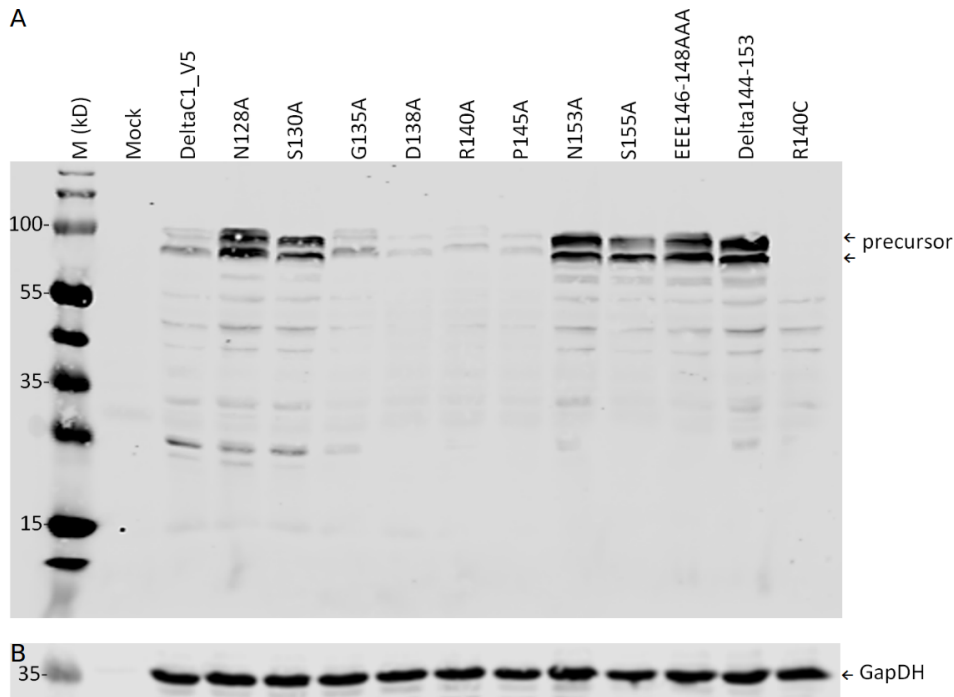


Abbildung 3.1: Western Blot der Zelllysate nach Produktion von HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren mit Luziferase als Reportergen; Auftrag: 20 μ g-Protein; (A) Nachweis der Vorläufer (precursor) des Envelope-Proteins mittels α -V5-AK; (B) Ladekontrolle durch Nachweis der zellulären GapDH mittels α -GapDH-AK

In Teil A der Abbildung 3.1 sind für fast alle Zelllysate jeweils unterschiedlich stark ausgeprägte Banden im Bereich von 80 kD und 90 kD sichtbar, bei welchen es sich um das nachzuweisende Envelope-Protein handelt [18].

Es konnte somit bei allen Proben das unprozessierte Vorläufer-Protein nachgewiesen werden, allerdings in unterschiedlicher Intensität. Während die Mutanten N128A, S130A, N153A, S155A, EEE146-148AAA und Δ 144-153 eine deutlich stärkere Expression der Proteine aufweisen im Verhältnis zu Δ C1-V5, zeigte sich für die verbleibenden Mutanten eine geringere Expression. Allein G135A zeigte in Verhältnis zum Wildtyp eine etwa identische Expression. Kein Nachweis des Envelopes war hier bei der Mutante R140C möglich, da diese keinen V5-tag besitzt. Dieses eindeutig negative Ergebnisse kann hier also als weitere Negativ-Kontrolle gewertet werden. Des Weiteren wird dadurch deutlich, dass es sich bei den anderen auf der Membran befindlichen Banden um unspezifische Bindungen der verwendeten AK handelt.

Darüber hinaus ist mit Abbildung 3.2 ein weiterer WB gezeigt, welcher mit den Zelllysaten nach Produktion von GFP-Viren angefertigt wurde.

Im Unterschied zu Abbildung 3.1 wurde hier der Herm-1811-5-AK verwendet. Auf Grund dessen sind hier auch Banden bei der Mutante R140C zu sehen, da sich dieser AK direkt gegen den TM richtet. Des Weiteren wurden hier nur 16 μ g Protein aufgetragen. Die Ergebnisse dieses Blots sind jedoch weniger gut interpretierbar, da die Kontrollbande (GapDH) nicht bei allen aufgetragenen Proben einheitlich ist. Dennoch wird hier für das Vorläufer-Protein im Wesentlichen das gleiche Ergebnis sichtbar wie es bereits in Abbildung 3.1 zu sehen ist. Die

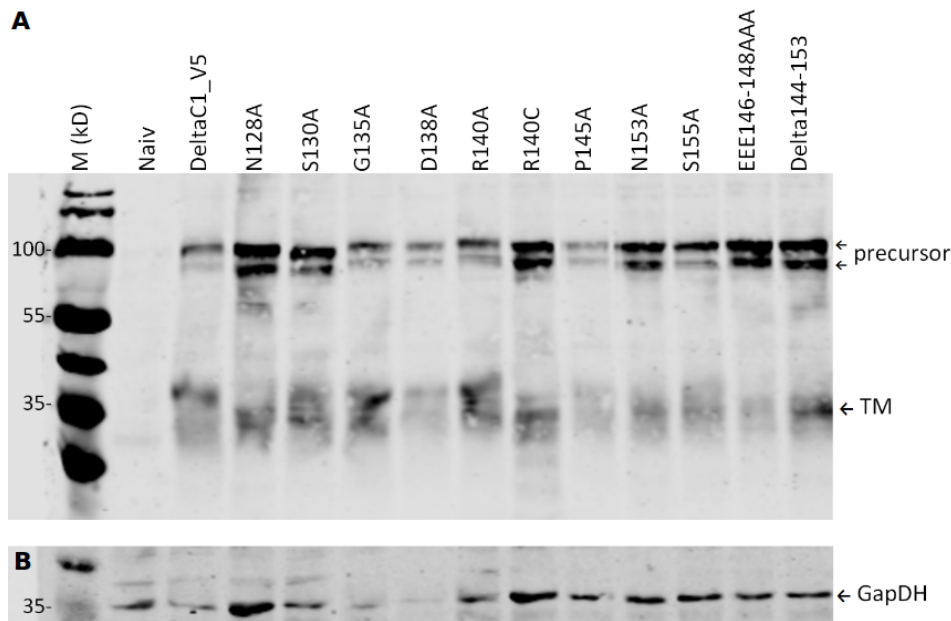


Abbildung 3.2: Western Blot der Zelllysate nach Produktion von HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren mit GFP als Reporter; Auftrag: 16 μ g-Protein; (A) Nachweis der Vorläufer (precursor) des Envelope-Proteins mittels HERM-1811-5-AK; (B) Ladekontrolle durch Nachweis der zellulären GapDH mittels α -GapDH-AK

Mutanten N153A - Δ 144-153 sowie N128A und S130A zeigen ebenfalls sehr starke Signale für das precursor-Protein bei 80 kD und 90 kD. Hier wird aber auch sichtbar, dass die mit R140C transfizierten Zellen das Vorläufer-Protein ebenfalls sehr stark exprimieren. Die weiteren Mutanten sowie Δ C1_V5 zeigen auch hier wieder eine geringere Expression des Proteins. Warum der Blot hier nochmals gezeigt wird liegt an den im Bereich zwischen 27 kD und 38 kD sichtbaren schlierigen Banden. Hierbei handelt es sich um die prozessierten TM [18]. Das TM ist bei allen aufgetragenen Proben - außer natürlich der Negativ-Kontrolle - sichtbar, wenn auch hier wieder in unterschiedlicher Intensität. Die Ergebnisse beider hier gezeigten WBs fanden sich auch bei der Durchführung weiterer WBs mittels zum Teil anderen Zelllysaten wieder (siehe Anhang A.1).

3.2 Virusexpression

Mittels p24-ELISA wurde die Bildung der Viruspartikel im Allgemeinen überprüft sowie dessen Konzentration bestimmt. Da p24 jedoch ein HIV-Protein darstellt, lässt sich allein daran nicht nachweisen, ob das zu beurteilende Envelope-Protein erfolgreich in den Virus eingebaut worden ist. Um dies zu bestätigen, wurde der Virus anschließend mittels WB untersucht.

3.2.1 p24-ELISA

Mittels p24-ELISA konnten die in der folgenden Tabelle 3.1 aufgeführten Viruskonzentrationen ermittelt werden.

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	
	HIV-HERV-GFP	HIV-HERV-Luzi
ΔC1_V5	8,1	9,4
N128A	2,0	4,5
S130A	2,7	5,6
G135A	6,8	4,8
D138A	7,1	5,2
R140A	6,3	8,3
R140C	0,6	5,4
P145A	0,8	6,6
N153A	2,0	7,6
S155A	0,6	3,2
EEE146-148AAA	1,0	2,3
$\Delta 144-153$	2,3	3,5

Tabelle 3.1: Mittels p24-ELISA ermittelte Konzentration der Viren nach UZ in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Die Konzentrationen zwischen den beiden Virusproduktionen schwanken je nach Probe unterschiedlich stark. Während sich die Viruskonzentration bei ΔC1_V5 beispielsweise nicht bedeutend unterscheidet weichen die bestimmten Werte bei den Mutanten R140C und P145A deutlich voneinander ab.

3.2.2 Western Blot

Der spezifische Nachweis der Envelope-Proteine innerhalb der produzierten pseudotypisierten Viren erfolgte mittels WB.

Der in Abbildung 3.3 gezeigte Blot stellt ein eher mäßiges Resultat dar, da in diesem Fall der Auftrag des ultrazentrifugierten Virus nicht auf die p24-Konzentration normiert worden ist sondern einheitlich ein Volumen von $20 \mu\text{L}$ /Tasche aufgetragen wurde. Trotz mehrmaliger Wiederholung gelang es jedoch nicht, erneut das Envelope-Protein in den Viren nachzuweisen, weshalb hier dennoch dieser WB genauer betrachtet werden soll. In Tabelle 3.2 ist gezeigt, welche Konzentration an Virus in den jeweils aufgetragenen $20 \mu\text{L}$ vorhanden war.

	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Aufgetragene Virusmenge [μg]
$\Delta\text{C1_V5}$	8,1	162
N128A	2,0	40
S130A	2,7	54
G135A	6,8	136
D138A	7,1	142
R140A	6,3	126
R140C	0,6	12
P145A	0,8	16
N153A	2,0	40
S155A	0,6	12
EEE146-148AAA	1,0	20
$\Delta\text{144-153}$	2,3	46

Tabelle 3.2: In 20 μL enthaltene Menge an Virus [μg]

Anhand der in Tabelle 3.2 gezeigten Werte wird deutlich, dass jeweils sehr unterschiedliche Mengen an Virus aufgetragen worden sind, was die Vergleichbarkeit unter den Proben beeinträchtigt. Unabhängig davon ist der WB in Abbildung 3.3 dargestellt.

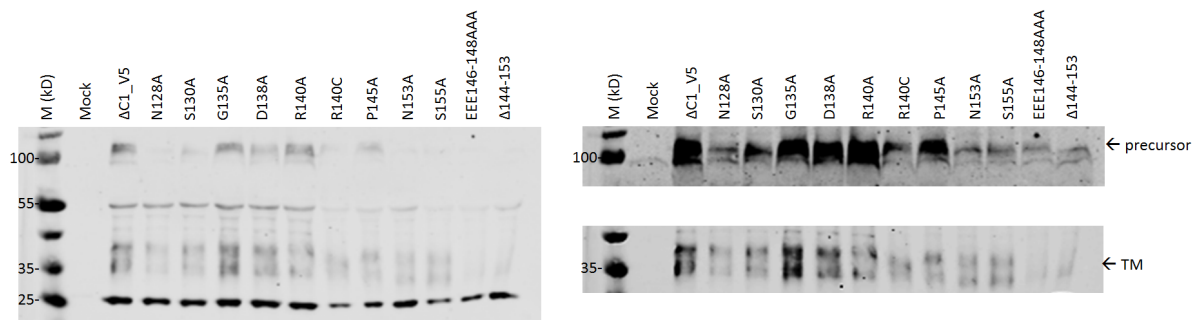


Abbildung 3.3: Western-Blot der HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren mit Luziferase als Reportergen; Auftrag: 20 μL -Protein; verwendeter AK: HERM-1811-5; keine Ladekontrolle vorhanden;
(links) komplette Membran nach Inkubation mit HERM-1811-5-AK;
(rechts) relevante Membranbereiche nach Nachbearbeitung zur besseren Sichtbarmachung der Envelope-Vorläuferprotein (precursor) und TM

Neben den bereits im Zelllysate nachgewiesenen Proteinvorstufen bei 80 kD bzw. 90 kD sind hier auch zwischen 31 kD und 37 kD Banden zu erkennen, welche die prozessierte Form des Envelope Proteins - in diesem Fall die transmembrane Untereinheit - darstellen. Die bei ca. 25 kD und 55 kD liegenden Banden stellen unspezifische und für die Auswertung nicht weiter relevante Banden da. Allerdings konnte auf Grund der unspezifischen Bande bei etwa 25 kD die Beladungs-Kontrolle mittels eines p24-AK nicht durchgeführt werden, da sich das Signal auf der selben Höhe befunden hätte und somit nicht bzw. nur sehr schlecht sichtbar wäre. Da die Signale der unspezifischen Bande so stark sind, wurden die relevanten Bereiche der Membran nochmal einzeln betrachtet (Abbildung 3.3 rechts). Die precursor-Proteine liegen in diesem Blot etwas höher als im Zelllysate zwischen 95-110 kD, zeigen aber zum Teil auch die charakteristische Doppelbande. Generell zeigen sich für $\Delta\text{C1_V5}$, G135A, D138A, R140A und P145A eindeutig die Banden, sowohl für das Vorläufer- als auch das prozessierte TM-Molekül. Die Ausprägung dieser Banden ist so intensiv, dass sie auch auf der nicht bearbeiteten Membran

(Abbildung 3.3 links) zum Teil sogar als Doppelbande sichtbar sind. Die Mutanten N128A, S130A und R140C zeigen deutlich schwächere, auf der Original-Membran kaum noch sichtbare Banden, welche jedoch nach der Bearbeitung der Grafik trotz dessen eindeutig den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden können. Für alle weiteren Mutanten sind die Signale noch schwächer und daher nur bedingt als positiv zu werten.

3.3 Infektionsversuche

Die Auswertung der Infektionsversuche erfolgte zunächst mittels FACS-Analyse der infizierten Zellen. Die einzelnen Histogramme der FACS-Analyse der infizierten Zellen sind im Anhang in Abbildung A.2 gezeigt. Der daraus entnommene prozentuale Anteil erfolgreich infizierter Zellen der einzelnen Viren sowie die an Hand dessen auf $\Delta C1_V5$ normalisierten Infektionsraten sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Es wurde bei Doppelbestimmungen jeweils der Mittelwert ermittelt und auch nur dieser aufgeführt.

Probe	Infektionsrate [%]	Infektionsrate normalisiert auf $\Delta C1_V5$ [%]
Negativ-Kontrolle	0,1	1,0
VSV-G-GFP	3,7	33,9
$\Delta C1_V5$	10,9	100
N128A	1,5	13,3
S130A	6,5	59,8
G135A	3,1	28,4
D138A	0,1	1,2
R140A	0,2	2,2
R140C	0,2	1,6
P145A	0,9	8,6
N153A	0,6	5,2
S155A	1,4	12,7
EEE146-148AAA	0,1	1,0
$\Delta 144-153$	0,1	1,0

Tabelle 3.3: Mittels FACS-Analyse ermittelte Infektionsraten in %, sowie auf $\Delta C1_V5$ normalisierte Werte ebenfalls in %

Bereits an Hand dieser Rohdaten wird deutlich, dass die Anzahl der fluoreszierenden und somit tatsächlich infizierten Zellen extrem gering ist. Selbst nach Infektion mit Viren mit $\Delta C1_V5$ als Env, welche definitiv infektiös sein sollten, fluoreszierten nur etwa 11 % der Zellen. Es konnte also nur in etwa 2.000 von 20.000 gezählten Zellen eine Infektion nachgewiesen werden. Zum besseren Vergleich wurde an Hand der auf $\Delta C1_V5$ normalisierten Werte die Grafik 3.4 erstellt.

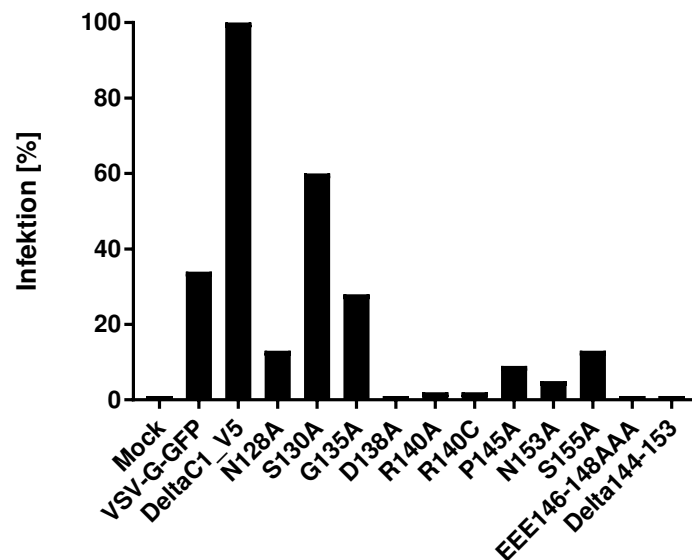


Abbildung 3.4: Prozentuale Infektionsrate der HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren an Hand der FACS-Analyse; Infektionsrate des Wildtyps ($\Delta C1.V5$) \cong 100%; Negativ-Kontrolle: mit Überstand naiver Zellen infizierte Zellen; Positiv-Kontrolle: mit VSV-G-GFP-Viren infizierte Zellen

Bei Betrachtung der Grafik 3.4 wird sichtbar, dass der Wildtyp deutlich stärker infektiös ist als alle verglichenen Mutanten. Hier sticht die Mutante S130A heraus, da hier weiterhin ca. 60% der Infektiösität von $\Delta C1.V5$ erreicht werden. Alle anderen Mutanten liegen unter 15%, die meisten sogar deutlich unter 10%. Auf Grund der insgesamt sehr geringen Infektionsraten (siehe Tabelle 3.3) wurde im Anschluss auf ein alternatives Reporter-System umgestellt, den Luziferase Assay. Die grafische Auswertung dessen ist in Abbildung 3.5 zu sehen, die zugrunde liegenden Rohdaten sind in der Tabelle A.4 im Anhang im einzelnen aufgeführt. Für eine bessere Betrachtung wurde die Lumineszenz mit einer logarithmierten Skala aufgetragen.

Innerhalb der Grafik 3.5 wird deutlich, dass es zwischen den einzelnen Proben einer Mutante nur geringe Abweichungen gibt; dies ist auch an den insgesamt sehr geringen Fehlerbalken zu sehen. Außerdem ist auf den ersten Blick ein eindeutiges Signal mit etwa 10^2 RLU (*relative light unit*) für die Negativ-Kontrollen zu sehen, welches jedoch in der Beurteilung der Proben als „Hintergrundrauschen“ außen vor gelassen wird. Somit sind nur Signale, welche die der Negativ-Kontrollen und den somit gesetzten Grenzwert übersteigen (rote Linie), als positiv zu betrachten.

Auch hier zeigt die Mutante S130A eine relativ starke Infektion, welche fast an den Wildtyp heran reicht. Abweichend von dem vorherigen Infektionsversuch weißt auch die Mutante S155A eine sehr hohe Infektionsrate auf, die sogar etwas über der des Wildtyps liegt. Insgesamt zeigten hier mehr Mutanten eine deutlich erfolgreich stattgefundenen Infektion im Vergleich zur FACS-Analyse, bzw. ein positives Ergebnis mit weniger starker Abweichung zu $\Delta C1.V5$. Abgesehen von den bereits erwähnten stark infektiösen Mutanten trifft dies auch auf die Mutanten N128A, G135A, P145A und N153A zu. Die in der FACS-Analyse als nicht oder minimal infektiös identifizierten Mutanten bestätigten sich weitestgehend im Luziferase-Assay. Für R140A zeigte sich im Luziferase-Assay - im Verhältnis zu der im Prinzip nicht vorhandenen Infektion bei der FACS-Analyse - ein eindeutig positives Ergebnis.

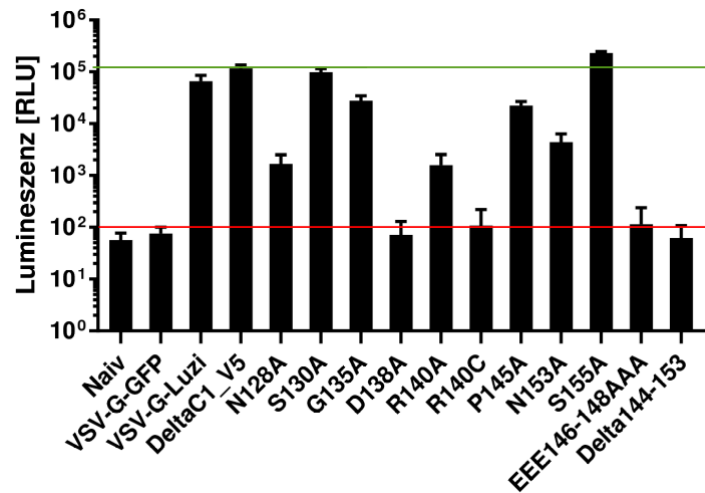


Abbildung 3.5: Infektionsrate der HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren an Hand des Luziferase-Assays angegeben in RLU; dargestellt sind die Mittelwerte mit Fehlerbalken von 12 Proben aus 2 getrennten Versuchen; Delay: 1 s; Messdauer: 2 s; rote Linie: Grenzwert der Negativ-Kontrollen; grüne Linie: Infektionsrate von $\Delta C1.V5$; Negativ-Ko: mit Überstand naiver Zellen / VSV-G-GFP infizierte Zellen; Positiv-Kontrolle: mit VSV-G-Luzi infizierte Zellen

Um beide Methoden innerhalb einer Grafik vergleichen zu können, wurden auch die Lumineszenzwerte des Luziferase-Assays in relative Werte in Prozent umgerechnet und auf den Wildtyp normiert. Des Weiteren wurde die Negativ-Kontrolle mit naiven Zellen hier gleich 0 % gesetzt, um das Hintergrundrauschen des Assays auszugleichen. Die Rohdaten dazu sind im einzelnen in Tabelle A.5 im Anhang zu finden, die sich daraus ergebende Grafik ist in Abbildung 3.6 zu sehen.

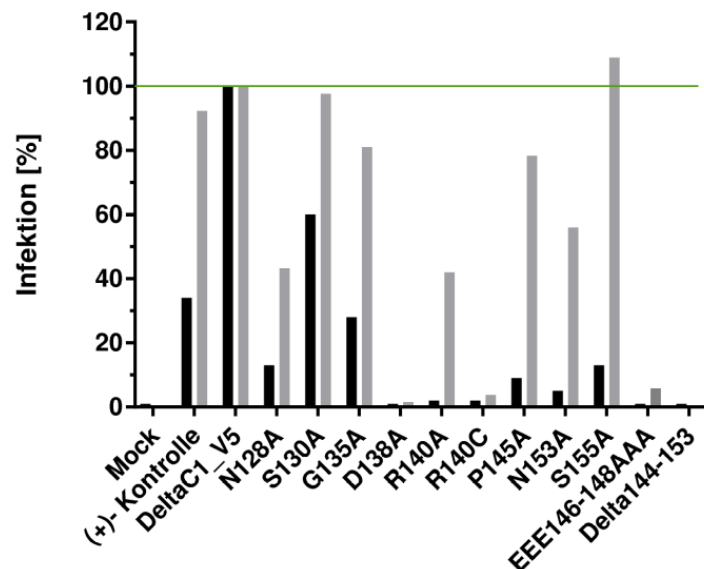


Abbildung 3.6: Vergleich der auf $\Delta C1.V5$ normalisierten prozentualen Infektionsrate der HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren unter Verwendung verschiedener Reportersysteme; schwarz: FACS-Analyse; grau: Luziferase-Assay; Negativ-Ko (Mock): naive Zellen; grüne Linie: 100 %; gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aller durchgeführten Infektionen

Bei Betrachtung der Grafik 3.6 bestätigt sich das bereits vorher beschriebene Bild. Abgesehen von der Mutante R140A sind alle in der FACS-Analyse mehr oder weniger infektiösen Mutanten auch innerhalb des Luziferase-Assays als infektiös nachgewiesen worden. Allerdings unterscheiden sich die Methoden gravierend in der Intensität der positiven Signale. Während sich die positiven Mutanten bei der FACS-Analyse kaum von den Negativ-Kontrollen absetzen, zeigt sich beim Luziferase-Assay ein deutlicher Unterschied zwischen infektiösen und eindeutig nicht infektiösen Partikeln.

4 Diskussion

Zunächst sei ein Blick auf die Proteinexpression in den Producer-Zellen geworfen. Es konnte für alle Mutanten erfolgreich die Expression des Vorläufermoleküls des Envelope nachgewiesen werden. Zwar ist in Abbildung 3.1 die Mutante R140C als negativ gezeigt, dies ist aber wie bereits erwähnt mit dem nicht vorhandenen V5-tag zu erklären. Bei weiteren durchgeführten WBs unter Verwendung eines alternativen Envelope-AK (HERM-1811-5) war, wie in Abbildung 3.2 gezeigt, die Expression auch bei diesem Mutanten deutlich nachweisbar. Die Auftragskontrolle in Abbildung 3.1 war sehr gleichmäßig, sodass die Membran problemlos ausgewertet werden konnte. Die Kontrolle in Abbildung 3.2 zeigte sich dagegen deutlich weniger gleichmäßig. Dies ist entweder durch tatsächlich ungleichmäßiges Auftragen der Proben zustande gekommen oder aber - und auch wahrscheinlicher - ein Artefakt des Blottens. Diese können auftreten, wenn z.B. das „Blotting-Sandwich“ nicht feucht genug oder der Stromfluss ungleichmäßig oder ungenügend ist. Auch Luftblasen oder mangelnder Kontakt zwischen Membran und Gel können ursächlich dafür sein, allerdings ist das hier vermutlich nicht der Grund, da Luftblasen eher als scharf begrenzte Kreise auf der Membran auffallen, wie z.B. auch in Abbildung 3.1 bei Mutante N128A in der obersten Bande zu sehen [24].

Die detektierten Banden mit einer Größe von ca. 80 kD und 90 kD entsprechen den in der Literatur angegebenen Proteingrößen - sowohl des nicht modifizierten, als auch des glycosylierten Vorläufer-Moleküls von Env [18]. In Abbildung 3.1 sind die prozessierten TM-Proteine überhaupt nicht sichtbar, wofür es zweierlei Gründe geben kann: Zum einen ist es möglich, wenn auch unwahrscheinlich, dass der Großteil der produzierten Proteine in die Viruspartikel eingebaut worden und somit nicht mehr in den Zellen vorhanden ist. Zum anderen ist es möglich, dass nur sehr geringe Mengen des Proteins überhaupt bis zum Schluss prozessiert wurden durch Überlastung des rauen endoplasmatischen Reticulums (rER). Dies ist auch ein Phänomen, welches bei humanen Zellen bei regulären Virusinfekten beobachtet wird, wenn das rER mit der Produktion der viralen Proteine überhäuft wird [25].

Auf den in Abbildung 3.1 sowie in im Anhang in Abbildung A.1 gezeigten WBs waren die TM im Bereich zwischen 27 und 38 kD zum Teil nachweisbar [18]. Allerdings stammten diese Lysate von anderen Virusproduktionen. Nach Rücksprache mit Dr. Norbert Bannert (Robert-Koch-Institut (RKI)) ist es ein bekanntes Phänomen, dass die Prozessierung der Protein auch innerhalb einer Zelllinie sich von Versuch zu Versuch unterscheiden kann. Mögliche Faktoren für die unterschiedliche Prozessierung der Proteine könnten z.B. Zellzahl bzw. Vitalität der 293T-Zellen sein. Normalerweise sollte jeweils die gleiche Menge Zellen pro Transfektion verwendet werden, was nicht zu 100% gewährleistet werden kann. Es wird zwar theoretisch die gleiche Menge Zellen ausgesät - wobei es auch hierbei bereits zu Schwankungen kommen kann - aber die anschließende Teilung kann nicht gesteuert werden, sodass immer Varianzen auftreten. Weiterhin befinden sich unter den ausgesäten Zellen immer auch weniger vitale und tote Zellen, welche die Zellzahl verfälschen bzw. reduzieren können. Generell spielt das Alter der verwendeten Zellen bzw. die vorangegangene Kultivierungsdauer eine große Rolle. Je länger die Zellen in Kultur sind, desto weniger vital sind sie. Werden also für die verschiedenen Versuche Zellen unterschiedlicher Passagen-Anzahl verwendet, kann auch dies einen Einfluss auf die Protein-Expression haben.

Des Weiteren ist interessant zu sehen, dass das vollkommene Fehlen der TM nur bei den Producer-Zellen für die Luziferase-Viren auftrat. Es wäre also interessant zu betrachten, ob möglicherweise auch das Reporter-Plasmid auf Grund seiner Komplexität einen Einfluss auf die gesamte Protein-Expression hat.

Die zum Teil stärkere Expression der Proteine bei mutierten Plasmiden lies sich mehrfach nachweisen und entspricht auch den für einige Mutanten bereits vorab durchgeführten Experimenten der Arbeitsgruppe von Dr. Bannert (Daten nicht gezeigt). Da die in Abbildung 3.1 und 3.2 gezeigten Ergebnisse miteinander übereinstimmen und sich auch, wie in Abbildung A.1 zu sehen, reproduzieren ließen, ist davon auszugehen, dass die Proteinexpression tatsächlich durch einige Mutationen verstärkt wird. Allerdings hat die unterschiedliche Expression der Proteine keinen Einfluss auf weitere Experimente und stellt so eher einen Kontrollparameter dar. Da in allen Fällen das Vorläufer-Protein gebildet wird, ist nachgewiesen, dass die Transfektion des Zielplasmids erfolgreich war und potentiell auch Viren produziert worden sind.

Der Nachweis dessen erfolgte zunächst durch den p24-ELISA, bei welchem das Gag-Protein des HIV detektiert wird. Grundsätzlich konnten alle Viren erfolgreich produziert werden, allerdings in unterschiedlichen Konzentrationen. Die deutlich größeren Abweichungen innerhalb der Produktion der GFP-Viren lässt sich vermutlich durch nicht optimales Handling erklären, da es sich hier um die erste Virusproduktion handelt und somit die Durchführung des Experimentes nicht so geübt war. Bei der Produktion der Luziferase-Viren ist das Bild deutlich ausgeglichener, was diese Hypothese unterstützt. Um dies abschließend zu beurteilen, wäre es aber nötig noch mehrmals Virusproduktionen mit den unterschiedlichen Reporter-Systemen durchzuführen. Da aber die Viren für die jeweiligen Infektionsversuche zwangsläufig auf die gleiche Konzentration normalisiert werden müssen um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, haben die unterschiedlichen Konzentrationen nur in geringem Maße Einfluss auf das folgende Vorgehen. Wichtig war es hier vor allem generell ein positives Ergebnis zu erhalten, um die Versuche fortführen zu können. Insofern wurde also die Virusproduktion erfolgreich durchgeführt, sodass die Infektionsversuche angeschlossen werden konnten.

Vorab musste allerdings noch überprüft werden, ob die produzierten Viren auch das zu untersuchende Envelope-Protein tragen. Dazu wurde erneut eine SDS-PAGE mit folgendem WB durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu waren leider nicht eindeutig zu interpretieren, dementsprechend müsste dieser Versuch definitiv nochmals wiederholt werden. Trotz dessen kann die ein oder andere Erkenntnis aus der Abbildung 3.3 und der dazu gehörigen Tabelle 3.2 gewonnen werden: Zum einen konnte für alle produzierten Viren mehr oder weniger gut das Vorläufer-Protein von Env sowie die prozessierten TM-Proteine nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die Proteine hier nachweisbar waren, beweist, dass die Proteine trotz der vorhandenen Mutationen korrekt gefaltet wurden, da sie sonst bereits in der Zelle abgebaut worden wären und somit nicht in das Virus hätten eingebaut werden können [26]. Die Banden im Bereich zwischen 31 kD und 37 kD befinden sich auf quasi identischer Höhe wie bei einigen Zellysaten in Abbildung 3.2 und ebenfalls im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte [18]. Die Vorläufer-Proteine sind etwa 5-10 kD größer als in den Zellysaten. Dies könnte möglicherweise durch unterschiedliche Glycosylierungs-Stadien bedingt sein, da es sich bei der N-Glycosylierung um einen komplexen Vorgang handelt, bei welchem es mehrfach zu einem Auf- und Abbau der Zuckerreste kommt [9]. Des Weiteren zeigten sich zwei unspezifische Banden bei etwa 25 kD und 55 kD. Da es sich bei den Banden um unspezifisch gebundene Signale handelt, wird durch das relativ gleichmäßige Signal in allen aufgetragenen Proben unterstützt. Dies bedeutet, dass - obwohl völlig verschiedene Mengen an Virus aufgetragen wurden - der hier markierte Bestandteil der Proben in allen Proben gleichermaßen unabhängig von der Viruskonzentration vorhanden ist. Bei den unspezifischen Banden könnte es sich um die leichten (25 kD) bzw.

schweren Ketten (55 kD) von Antikörpern aus dem verwendeten Nährmedium bzw. dem zugefügten fetalen Kälberserum (FKS) handeln [27] [28]. Um dies zu vermeiden wäre es sinnvoll, die Ränder der Ultrazentrifugations-Röhrchen nach dem Abkippen des Überstandes vorsichtig mit einem fussselfreien Papiertuch zu reinigen und das Viruspellet statt im Rücklauf in einem entsprechenden Puffer zu resuspendieren. Somit wäre es möglich, die Verunreinigung der Proben mit Serumbestandteilen oder anderen Inhaltsstoffen der Nährmedien zu unterbinden bzw. zumindest zu reduzieren.

An Hand des WB wird deutlich, dass einige mit in relativ geringer Menge aufgetragenem Virus trotz dessen eindeutige Banden aufwiesen, was drauf schließen lässt, dass diese Viruspartikel das Envelope insgesamt sehr gut inkorporiert haben. Besonders fällt dies bei der Mutante P145A auf, welche mit nur 16 µg aufgetragenem Virus mit eines der stärksten Signale aufweist. Dem entgegen weisen die Mutanten Δ 144-153 mit der etwa dreifachen und N153A mit der zweieinhalb-fachen Menge an aufgetragenem Virus nahezu gar kein Ergebnis auf. Ähnlich ist es für die Mutante R140C. Trotz dessen, dass nur 12 µg Virus aufgetragen worden sind, zeigten sich die Banden im Verhältnis dazu relativ deutlich. Obwohl hier ganz klar geschlussfolgert werden kann, dass die Mutanten P145A und R140C besser in die Viruspartikel eingebaut werden als Δ 144-153 und N153A, wird insgesamt deutlich sichtbar, dass diejenigen Proben bei welchen die größte Menge an Virus aufgetragen wurde - nämlich Δ C1_V5, G135A, D138A und R140A - auch die ausgeprägtesten Banden aufweisen. Auf Grund dessen kann hier im Prinzip nur von einem qualitativen, aber lediglich sehr begrenzt von einem quantitativen Nachweis gesprochen werden.

Der letzte und letztendlich entscheidende Versuch war die Infektion von SKmel28-Zellen mit den produzierten Virus-Partikeln. Zunächst ein kurzer Blick auf die Kontrollen: Im Fall der FACS-Analyse führten die Negativ-Kontrollen zu keinerlei Infektion der Zellen. Bei Betrachtung des Luziferase-Assay konnte eine geringe Lumineszenz (10^2 RLU) nachgewiesen werden. Da sich aber alle Negativ-Kontrollen im selben Rahmen bewegten und bekannt infektiöse Partikel wie der VSV-G-Luzi-Virus - welcher auch als Positiv-Kontrolle mitgeführt wurde - sich deutlich davon unterschieden, konnte dieses Signal innerhalb der Auswertung als Grenzwert für eine Infektion festgelegt werden. Die Positiv-Kontrollen zeigten für beide Reportersysteme, trotz jeweils deutlich geringer Infektion, wie erwartet eindeutig positive Ergebnisse. Die im Prinzip auch als Positiv-Kontrolle bzw. Vergleichsprobe verwendeten Δ C1_V5-Viren führten zu mittels beiden Reportersystemen nachweisbaren Infektionen der SKmel28-Zellen. Wie bereits ausgeführt, dienten die Ergebnisse dessen als Referenzpunkt für den Vergleich mit den Ergebnissen der mutierten Viren. Insgesamt sind die Ergebnisse des Luziferase-Assays in diesem Fall aussagekräftiger als die der FACS-Analyse. In der Theorie stellt die FACS-Analyse das spezifischere System dar; da aber bei der Durchführung dieses Experimentes mehrere Fehler gemacht worden sind, sind dessen Ergebnisse nur als Anhaltspunkt zu nehmen. Die Resultate des Luziferase-Assays sind zudem auch deshalb valider, weil hier 12 Infektionen in zwei Versuchsdurchläufen miteinander verglichen werden, statt wie bei der FACS-Analyse nur ein oder zwei Proben. Auf Grund dessen werden die folgenden Interpretationen im Wesentlichen auf Basis der Ergebnisse des Luziferase-Assays getätigt, wenn nicht im einzelnen anders erwähnt.

Nun sollen die Mutanten im Einzelnen genauer Betrachtet werden: Zunächst wird die Mutante R140C betrachtet. Diese hat eine besondere Bedeutung, da sie im Prinzip eine natürliche Mutante darstellt. Das bedeutet, dass der im humanen Genom befindliche Provirus an Position 140 des *env* eigentlich das Codon für die Aminosäure Cystein (C) besitzt. Im Zuge der Rekonstruktion des Envelope wurde diese Mutation rückgängig gemacht, weshalb alle anderen Mutanten und auch Δ C1_V5 an dieser Position jetzt ein Arginin (R) besitzen. R140C wurde

von Hanke *et al.* [18] als eine von zwei „knock-out“ Mutationen innerhalb des Env identifiziert. Dies bedeutet, dass diese Mutationen ursächlich sind für den Funktionsverlust des Envelope und somit die Funktionalität durch die Rückmutation wieder hergestellt werden konnte. Auf Grund dessen ist die Mutante R140C neben den regulären Kontrollen auch eine Art Negativ-Kontrolle, da bereits bekannt ist, dass einem Virus mit dieser Mutation keine Infektion von Zellen mehr möglich ist [18]. Dementsprechend, sind die Ergebnisse sowohl der FACS-Analyse, als auch des Luziferase-Assays wie erwartet negativ und somit plausibel.

Um genauer zu verstehen, warum es zum „knock-out“ durch eine Mutation an dieser Position gekommen ist, wurde diese Aminosäure noch ein weiteres mal verändert. Diesmal wurde ein Alanin (A) eingefügt. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist führte die Mutation R140A nur zu einem mittelmäßigen Funktionsverlust des Env. Die Infektionsrate ist zwar auf etwa 50 % verringert, aber noch weit von einem „knock-out“ entfernt. Deshalb kann geschlossen werden, dass eine Mutation an dieser Stelle nicht zwingend zu einem Funktionsverlust führt. Die Frage der Beeinträchtigung schient hier eher dadurch zu beantworten zu sein, welche Aminosäure statt dem ursprünglichen Arginin vorhanden ist. Eine mögliche Erklärung wäre in den Eigenschaften der Aminosäuren zu suchen. Zum einen wäre da die Ladung. Während Arginin positiv geladen ist, sind Cystein und Alanin ungeladene Aminosäuren. Ob der Ladungszustand tatsächlich einen Einfluss darauf hat, ließe sich möglicherweise besser beurteilen, wenn man noch weitere Mutanten mit anderen Aminosäuren generieren würde. Wenn zum Beispiel die Infektion durch den Einbau einer negativ geladenen Asparaginsäure ebenfalls zu einem „knock-out“ führt, würde es dafür sprechen, dass die positive Ladung an dieser Position essentiell ist für die Funktionalität. Eine weitere Option wäre der Einbau einer anderen positiv geladenen Aminosäure, wie z.B. Histidin (H), welches man auch in den zur Findung der RBS als Vergleich herangezogenen Sequenzen von MMTV und JSRV findet.

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Molekülgröße. Während Alanin und Cystein äußerst kleine Aminosäuren darstellen, ist Arginin deutlich größer. Da der Einbau von Cystein und Alanin zu unterschiedlichen Ergebnissen führte, wäre es wichtig ebenfalls zu betrachten, worin sich diese beiden Aminosäuren unterscheiden. In diesem Fall ist das ausschließlich die Polarität: Während Cystein polar ist, ist Alanin unpolar. Allerdings ist auch Arginin eine polare Aminosäure, womit nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Polarität grundlegend für den Funktionsverlust ist. Allerdings gilt es zu beachten, dass Cystein durch seine Thiolgruppe in der Lage ist, Disulfidbrücken mit anderen Cysteinen zu bilden. Diese Disulfidbrücken können zu einer veränderten Proteinfaltung und somit wiederum zum Funktionsverlust führen. Die komplette Envelope-Sequenz weist noch mehr als 10 weitere Cysteine auf, mit welchen es zu entsprechenden falschen Bindungen kommen könnte. Allerdings scheint die dadurch entstehende Fehlfaltung nicht so gravierend zu sein, dass das Envelope überhaupt nicht mehr gebildet wird. Neben einer potentiellen veränderten Faltung führt die Ausbildung von Disulfidbrücken zu Veränderungen der Eigenschaften von Cystein. Die Aminosäure bleibt zwar weiter ungeladen und hydrophob aber durch die Bindung ändert sich ihre Polarität von polar zu unpolar [16].

Im Laufe der Versuche konnte außerdem eine weitere „knock-out“-Mutante ermittelt werden, die Mutante D138A. Bei der Asparaginsäure (D) an Position 138 handelt es sich um eine auch in MMTV und JSRV konservierte AS im Bereich der RBS. Für die Mutante D138A konnte trotz suboptimaler Versuchsdurchführung das Envelope-Protein eindeutig innerhalb der Viruspartikel nachgewiesen werden. Um so interessanter ist es, dass die produzierten Viren mit dieser Mutation keinerlei Infektion mehr hervorriefen. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Aminosäure an genau dieser Position essentiell ist für die Funktionalität des Envelope.

Es gab noch zwei weitere Mutanten, bei denen keine bzw. nur eine minimale Infektion festgestellt wurde. Die Mutanten Δ 144-153 und EEE146-148AAA zeigten - wie auch R140C und D138A - keine nachweisbare Infektiosität mehr. Der Unterschied im Vergleich zu den beiden

zuletzt genannten Mutanten ist jedoch, dass diese auch schon beim Nachweis von Env innerhalb der Viruspartikel kaum nachweisbare Signale lieferten. Auch handelt es sich in beiden Fällen nicht nur um Punktmutationen, sondern zum einen um eine Deletion von neun AS zum anderen um einen Austausch von drei aufeinander folgende saure AS. Diese Mutationen können einen deutlich größeren Einfluss auf die Faltung eines Proteins haben als einzelne Punktmutationen. Im Fall der Deletion wurden bei der Mutante $\Delta 144-153$ genau die neun Aminosäuren entfernt, welche auch bei der bekannten RBS von MMTV nicht vorhanden sind. Diese Verkürzung der putativen RBS um fast die Hälfte der Aminosäuren hat einen gravierenden Effekt. Die Proteine werden zwar grundsätzlich noch expremiert, wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist aber die Inkorporation in den Virus scheint nur in sehr geringem Maße stattzufinden; was wie bereits erwähnt eine Folge der fehlerhaften Faltung des Proteins sein kann. Allerdings ist der Nachweis des Envelope innerhalb des Virus nicht eindeutig beurteilbar gewesen, weshalb hier nicht zweifelsohne gesagt werden kann, ob die nicht stattfindende Infektion durch das komplette Fehlen von Env bedingt ist oder aber durch ein zwar vorhandenes, aber funktionsunfähiges Env wie bei R140C und D138A.

Ähnliche ist es auch für EEE146-148AAA. Hier können exakt die gleichen Schlussfolgerungen gemacht werden wie für $\Delta 144-153$, da auch hier der Nachweis des Env in den Viruspartikeln nicht eindeutig zu interpretieren war. Die drei hintereinander folgenden Glutaminsäuren (E) ergeben gemeinsam mit dem davor befindlichen Prolin (P) und dem nachfolgenden Glycin (G) einen hydrophilen Bereich. Hydrophile Bereiche befinden sich für gewöhnlich an der Außenseite von Proteinen und schützen so die innen liegenden hydrophoben Aminosäuren. Darüber hinaus sind sie notwendig für die Ausprägung der Hydrathülle, welche das Protein umgibt [17]. Fehlt wie in Mutante EEE146-148AAA nun ein Teil dieses hydrophilen Bereiches, so kann es zum Funktionsverlust des Proteins kommen, da die hydrophoben Aminosäuren im Inneren nicht geschützt sind. JSRV weist ebenfalls eine Abfolge von hydrophilen Aminosäuren auf, was dafür spricht, dass dieser Bereich möglicherweise relevant sein könnte. Allerdings ist im MMTV-Env an dieser Stelle kein hydrophiler Bereich vorhanden. Insgesamt kann also nur gesagt werden, dass die Zerstörung dieses Bereiches auch eine Zerstörung der Funktionalität des Proteins zur Folge hat bzw. möglicherweise die vollständige Prozessierung schon vorher verhindert.

Außerdem wurde auch das an Position 145 und somit unmittelbar vor der Glutaminsäure-Abfolge befindliche Prolin (P) mutiert. Der Grund diese Mutante zu generieren war jedoch weniger dessen Lage als der Tatsache geschuldet, dass diese Aminosäure an dieser Position ebenfalls in MMTV und JSRV zu finden ist. Ganz im Gegenteil zu EEE146-148AAA zeigt diese Mutante nur geringe Einbußen in seiner Funktionalität. Die Infektionsrate lag immer noch bei etwa 80 % im Verhältnis zu $\Delta C1_V5$. Bei den beiden ausgetauschten Aminosäuren handelt es sich um sehr kleine, ungeladene und unpolare Aminosäuren, welche sich im Wesentlichen nur durch ihre Hydrophobizität unterscheiden [16]. Möglicherweise ist die große Ähnlichkeit der Aminosäuren ein Grund für den geringen Einfluss auf die Infektionsrate der Viren. Gegebenenfalls hätte hier der Austausch gegen eine sich deutlich von Prolin unterscheidende AS einen weitreichenderen Effekt.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Mutante G135A. Auch hier handelt es sich um eine Mutation an einer stark konservierten Position. Die Infektiosität ist hier ebenfalls nur gering, nämlich auf ca. 80 %, abgesunken. Das in der Sequenz eigentlich vorhandene Glycin (G) ist - so wie Prolin und das eingefügte Alanin - klein, unpolar und ungeladen, aber wie Prolin hydrophil im Vergleich zu Alanin [16]. Dementsprechend wäre es auch hier sinnvoll eine oder mehrere weitere Mutanten zu erzeugen mit Aminosäuren mit spezifischen Eigenschaften die entsprechend konträr zu Glycin sind, um somit dessen „Aufgabe“ innerhalb des Proteins besser beschreiben zu können.

Des Weiteren wurden vier Mutanten in den beiden auch in MMTV und JSRV konservierten Glycosylierungspunkten vor bzw. innerhalb der putativen RBS generiert und untersucht: Hierbei handelt es sich um die Mutanten N128A, S130A, N153A und S155A. Im direkten Vergleich ist zu sehen, dass alle vier Mutanten noch infektiös waren, allerdings wiesen die beiden Mutanten, bei welchen das Serin (S) ausgetauscht worden ist, eine höhere Infektionrate auf als die Mutanten mit dem entfernten Asparagin (N). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass zum einen durch die Veränderung der spezifischen Glycosylierungspunkte eine Infektion nicht zwingend ausgeschlossen ist. Zum anderen wird deutlich, dass hier scheinbar die Veränderung der Aminosäure Asparagin der maßgebliche Faktor für die Verringerung der Infektiösität des Virus ist, da die Mutanten S130A und S155A durch die fehlende Verzuckerung nur minimal bzw. gar nicht in ihrer Funktionalität und somit Infektiösität beeinträchtigt sind. Ganz im Gegenteil, für die S155A scheint es sogar, als würden die fehlenden Zucker dessen Infektiösität sogar noch verbessern. Dies gilt es allerdings noch durch weitere Infektionsversuche zu bestätigen, da die Infektionsrate in den durchgeführten Versuchen die von $\Delta C1.V5$ nur um ca. 10 % übersteigt.

5 Fazit

Abschließend kann festgehalten werden, dass mit allen Virusmutanten sowie dem Wildtyp erfolgreich mehrere Infektionsversuche durchgeführt werden konnten und somit der Einfluss der unterschiedlichen Mutationen auf die Infektiosität beurteilt werden konnte.

Wie erwartet waren einige der Mutanten nicht mehr bzw. nur noch in sehr geringem Maße in der Lage SKmel28-Zellen zu infizieren. Dies betraf die Mutanten D138A, EEE146-148AAA, R140C und Δ 144-153. Abgesehen von S130A und S155A wiesen auch alle anderen Mutanten wenigstens eine Verminderung der Infektiosität auf. Dies bestätigt die Wichtigkeit des untersuchten Bereiches der Surface Unit für die Infektiosität der Viruspartikel und somit auch die Annahme, dass es sich hier tatsächlich um die Rezeptor-Bindungs-Stelle von HERV-K handelt. Besonders bemerkenswert war dabei die Feststellung, dass eine nicht vorhandene Glycosylierung in diesem Bereich der SU offenbar nicht zwangsläufig zu einer Verringerung der Infektiosität führt, sondern tatsächlich eher die Veränderung der zur Glycosylierung notwendigen Aminosäure ausschlaggebend ist. So zeigten die nicht glycosylierten Mutanten S130A und S155A eine ähnlich hohe Infektiosität wie der Wildtyp, während die Mutanten N128A und N153A (ebenfalls mit fehlender Glycosylierung) in ihrer Funktionalität deutlich eingeschränkt waren.

Die Inkorporation der Envelope-Proteine in die produzierten Viren lies sich im Prinzip nur qualitativ aber nicht quantitativ bestimmen, der Nachweis der Protein-Expression innerhalb der Producer-Zelllinie 293T konnte jedoch erfolgreich erbracht werden. Um eine endgültige Aussage über die putative RBS machen zu können, müssten sämtliche Versuche noch mehrmals wiederholt werden, um die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu verifizieren und weniger gute Ergebnisse wie den Nachweis des Envelopes innerhalb der Viruspartikel zu verbessern. Dies würde eine bessere Beurteilung der Auswirkungen auf die putative RBS von HERV-K113 gewährleisten und somit im besten Fall einen validen Nachweis dessen Richtigkeit erbringen.

6 Ausblick

Neben den bereits genannten generell nötigen Wiederholungen aller Versuche gibt es noch Möglichkeiten die durchgeführten Versuche zu optimieren, sowie einige weitere Experimente, welche den Nachweis der putativen RBS unterstützen könnten.

Da sich das Envelope innerhalb der Viruspartikel bis jetzt nur schlecht nachweisen lässt, wäre es möglicherweise sinnvoll bei weiteren Schwierigkeiten eine Elektronenmikroskopie der einzelnen Virusmutanten durchzuführen und die Envelope-Proteine optisch zu detektieren. Dies wurde bereits von Hohn *et al.* im Rahmen anderer Forschung erfolgreich durchgeführt [29].

Insgesamt wäre es sinnvoll die Infektion mit GFP als Reporter-System zu optimieren, da diese Methode spezifischer ist als der Luziferase-Assay, da hier definitiv ausschließlich erfolgreich infizierte Zellen Fluoreszenz aufweisen und kein Hintergrundrauschen entsteht. Weiterhin lässt sich bei dieser Methode der Versuchsverlauf besser beobachten, da jederzeit mittels eines Fluoreszenzmikroskopes die Fluoreszenz kontrolliert und somit bereits nach 24 h beurteilt werden kann, ob die Transfektion / Infektion erfolgreich war. Bei nicht erfolgreicher Transfektion/ Infektion könnte dies so schneller bemerkt und der Versuch neu angesetzt werden; dies führt unter anderem auch zu einer großen Zeitersparnis.

Auch wäre es sinnvoll ein 3D-Modell des Envelope-Proteins bzw. zumindest der SU - sowohl von $\Delta C1_V5$ als auch von den Mutationen - anzufertigen bzw. anfertigen zu lassen, da es interessant wäre zu sehen, inwiefern die Mutationen und vor allem die Glycosylierungen und auch die Veränderung der negativen Aminosäureabfolge „EEE“ die Faltung des Proteins beeinflussen und somit auch Auswirkungen auf seine Funktionalität haben. Als Grundlage könnte hier möglicherweise das bereits existierende Modell der SU von MMTV verwendet werden [15].

Um ein besseres Verständnis für die Wichtigkeit der einzelnen AS innerhalb der putativen RBS zu bekommen, wäre es für einige Aminosäuren - wie in der Diskussion ja bereits erwähnt - interessant, weitere Mutanten zu generieren.

Des Weiteren könnten - obwohl dies zum Teil schon unter anderem von Zhang *et al.* [15] gemacht worden ist - analog zu den $\Delta C1_V5$ -Mutanten auch noch RBS-Mutanten des MMTV generiert und die Auswirkungen auf dessen Infektiosität betrachtet werden. Dies könnte vor allem interessant sein bei Betrachtung der Glycosylierungs-Stellen, da hier ja zu sehen war, dass die fehlende Glycosylierung an sich nicht unbedingt zwingend Einbußen in der Funktionalität des Virus provoziert. Es wäre also interessant zu sehen, ob dies auch auf die RBS von MMTV zutrifft. Ist dies der Fall, würde es die Hypothese der postulierten RBS unterstützen.

Literatur

- [1] S. Modrow u. a. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2010. ISBN: 9783827422415.
- [2] Robin A. Weiss. „The discovery of endogenous retroviruses“. In: *Retrovirology* 3.1 (Okt. 2006), S. 67. ISSN: 1742-4690. DOI: [10.1186/1742-4690-3-67](https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-67). URL: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-67>.
- [3] H.W. Doerr und W.H. Gerlich. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. Thieme, 2010. ISBN: 9783131139627.
- [4] R Callahan u. a. „Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79.18 (1982), S. 5503–5507.
- [5] Norbert Bannert und Reinhard Kurth. „The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families“. In: *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7 (2006), S. 149–173.
- [6] Katrin Reus u. a. „HERV-K (OLD): ancestor sequences of the human endogenous retrovirus family HERV-K (HML-2)“. In: *Journal of virology* 75.19 (2001), S. 8917–8926.
- [7] David L Moyes u. a. „The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease“. In: *Genomics* 86.3 (2005), S. 337–341.
- [8] Geoffrey Turner u. a. „Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans“. In: *Current Biology* 11.19 (2001), S. 1531–1535.
- [9] F. Horn. *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Thieme, 2009. ISBN: 9783131308849.
- [10] Kirsten Hanke. „Funktionelle Charakterisierung der HERV-K Proteine Env und Rec“. Diss. Freie Universität Berlin, 2010.
- [11] Kristina Büscher u. a. „Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines“. In: *Melanoma research* 16.3 (2006), S. 223–234.
- [12] J. Murken. *Humangenetik*. Thieme, 2006. ISBN: 9783131392978.
- [13] Marie-Josée Nadeau, Mamneet Manghera und Renée N Douville. „Inside the Envelope: Endogenous Retrovirus-K Env as a Biomarker and Therapeutic Target“. In: *Frontiers in microbiology* 6 (2015), S. 1244.
- [14] DF York u. a. „Nucleotide sequence of the jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats.“ In: *Journal of virology* 66.8 (1992), S. 4930–4939.
- [15] Yuanming Zhang u. a. „Identification of the receptor binding domain of the mouse mammary tumor virus envelope protein“. In: *Journal of virology* 77.19 (2003), S. 10468–10478.
- [16] William Ramsay Taylor. „The classification of amino acid conservation“. In: *Journal of theoretical Biology* 119.2 (1986), S. 205–218.

- [17] *Lexikon der Biologie - Proteine*. Spektrum, Akad. Verlag, 1999. URL: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteine/54137> (besucht am 02/2018).
- [18] Kirsten Hanke u. a. „Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain“. In: *Journal of virology* 83.24 (2009), S. 12790–12800.
- [19] W.J. Thieman, M.A. Palladino und N.W. Hopf. *Biotechnologie*. Bio - Biologie. Pearson Deutschland, 2007. ISBN: 9783827372369.
- [20] Brigitte E Sanders-Beer u. a. „Characterization of a monoclonal anti-capsid antibody that cross-reacts with three major primate lentivirus lineages“. In: *Virology* 422.2 (2012), S. 402–412.
- [21] *Luciferase Assay System*. Promega Corporation, 2015. URL: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/luciferase-assay-system-protocol.pdf?la=de-de> (besucht am 02/2018).
- [22] *Qubit[®] Protein Assay Kits. For use with the Qubit[®] Fluorometer (all models)*. Thermo Fisher Scientific, 2015. URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_Protein_Assay_UG.pdf (besucht am 01/2018).
- [23] Dr. Istvan Lazar. *GelAnalyzer*. 2010. URL: <http://www.gelanalyzer.com/> (besucht am 13. 10. 2017).
- [24] Aldrin V. Gomes. *WESTERN BLOTTING TIPS AND TROUBLESHOOTING GUIDE*. 2009. URL: https://medschool.vanderbilt.edu/cdb-core-lab/files/cdb-core-lab/public_files/083013_WESTERN%5C%20BLOTTING%5C%20TIPS%5C%20AND%5C%20TROUBLESHOOTING%5C%20GUIDE.pdf (besucht am 18. 02. 2018).
- [25] Jennifer A Isler, Alison H Skalet und James C Alwine. „Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response“. In: *Journal of virology* 79.11 (2005), S. 6890–6899.
- [26] H. Will. *Molekularbiologie kurz und bündig*. Springer Berlin Heidelberg, 2014. ISBN: 9783642551109.
- [27] K. Vogt u. a. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, 2013. ISBN: 9783662086292.
- [28] P Rauch u. a. „Assayoptimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden“. In: *Laborwelt* 4 (2005), S. 33–39.
- [29] Oliver Hohn u. a. „CMV-promoter driven codon-optimized expression alters the assembly type and morphology of a reconstituted HERV-K (HML-2)“. In: *Viruses* 6.11 (2014), S. 4332–4345.

Anhang A

Probe	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	
	Zellysat 1	Zellysat 2
(-)-Ko	1,96	-
$\Delta\text{C1_V5}$	1,98	1,98
N128A	1,97	1,97
S130A	1,98	1,98
G135A	1,98	1,98
D138A	1,99	1,97
R140A	1,97	1,98
R140C	1,98	1,97
P145A	1,98	1,97
N153A	1,98	1,97
S155A	1,98	1,97
EEE146-148AAA	1,98	1,97
$\Delta\text{144-153}$	1,98	1,98

Tabelle A.1: Gesamtprotein in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ der Zellysate nach Transfektion und Produktion von HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren; Zelllinie: 293T; Zellysat 1: GFP-Virusproduktion; Zellysat 2: Luziferase-Virusproduktion; (-)-Kontrolle: untransfizierte Zellen

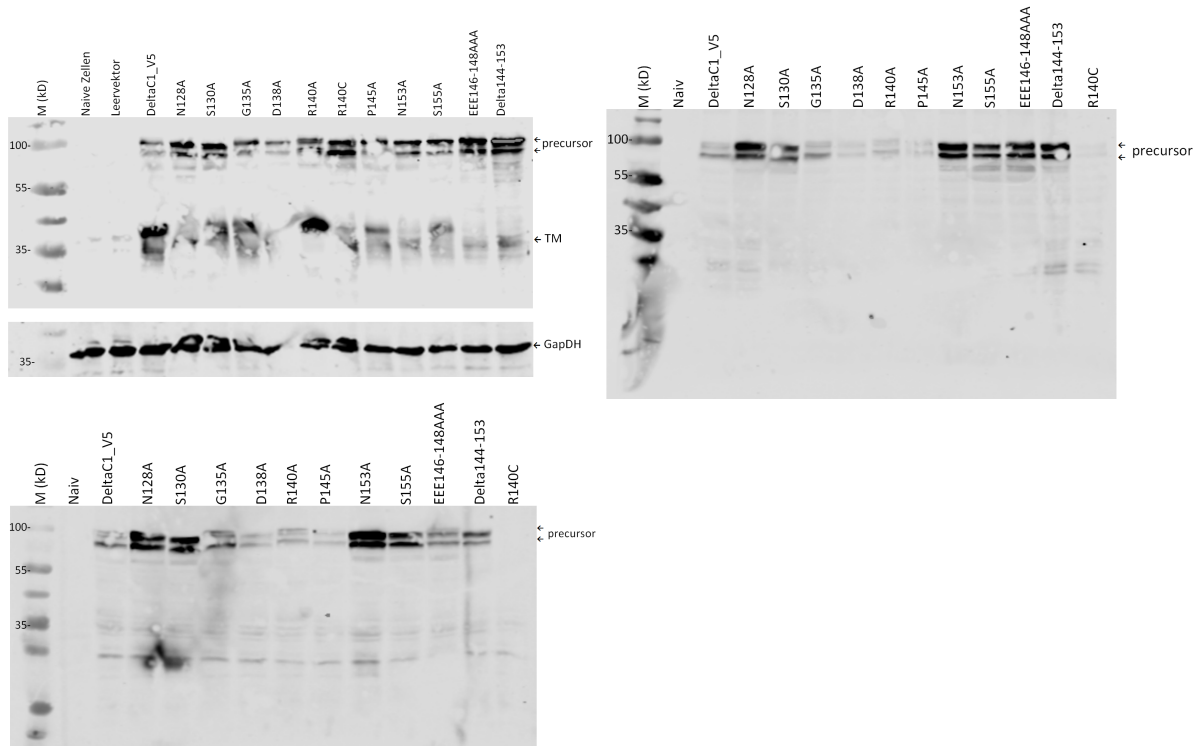


Abbildung A.1: WB der verschiedenen Zellysate nach Transfektion/ Virusproduktion von/in 293T-Zellen;
 (oben links) Zellysate nach Transfektion, Auftrag: 20 µg-Protein, AK Vorläufer (precursor)/ TM: HERM1811-5; Ladekontrolle: α-GapDH-AK;
 (oben rechts) Zellysate nach Produktion von HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren mit Luziferase als Reportergen; Auftrag: 16 µg-Protein, AK Vorläufer (precursor): α-V5, keine Ladekontrolle durchgeführt;
 (unten links) Zellysate nach Produktion von HIV-HERV-Pseudotypisierten Viren mit Luziferase als Reportergen; Auftrag: 20 µg-Protein, AK Vorläufer (precursor): α-V5, keine Ladekontrolle durchgeführt

Platte 1											
Standard		$\Delta C1_V5$		N128A		S130A		G135A		Standard	
1,074	1,111	1,124	1,106	1,092	1,085	1,120	1,118	1,142	1,135	1,079	1,065
0,922	0,908	1,046	1,045	0,874	0,861	0,958	0,952	1,048	1,058	0,896	0,903
0,725	0,654	0,876	0,911	0,561	0,557	0,721	0,739	0,909	0,903	0,707	0,683
0,524	0,453	0,693	0,694	0,281	0,303	0,454	0,442	0,657	0,682	0,481	0,465
0,354	0,360	0,561	0,558	0,207	0,211	0,311	0,080	0,557	0,539	0,323	0,317
0,202	0,191	0,308	0,334	0,095	0,101	0,185	0,187	0,353	0,406	0,199	0,182
0,055	0,144	0,238	0,220	0,059	0,056	0,100	0,126	0,225	0,251	0,103	0,097
Negativ-Kontrolle											
0,009	0,010	0,008	0,006	0,009	0,007	0,002	0,002	0,003	0,011	0,012	0,008

Platte 2											
Standard		D138A		R140A		R140C		P145A		Standard	
0,961	0,954	1,028	1,044	1,043	1,059	0,943	0,931	0,948	0,955	1,025	0,837
0,798	0,804	0,928	0,969	0,960	0,962	0,539	0,552	0,599	0,612	0,864	0,899
0,658	0,638	0,828	0,825	0,802	0,805	0,302	0,304	0,321	0,334	0,677	0,617
0,427	0,432	0,620	0,542	0,536	0,619	0,133	0,156	0,179	0,194	0,402	0,479
0,271	0,257	0,435	0,441	0,418	0,445	0,091	0,091	0,091	0,091	0,320	0,300
0,163	0,144	0,307	0,279	0,249	0,286	0,048	0,049	0,058	0,049	0,174	0,174
0,117	0,128	0,249	0,239	0,267	0,206	0,033	0,028	0,041	0,026	0,111	0,085
Negativ-Kontrolle											
0,004	0,007	0,009	0,003	0,004	0,004	0,000	0,002	0,012	0,004	0,007	0,004

Platte 3											
Standard		N153A		S155A		EEE146-148AAA		$\Delta 144-153$		Standard	
0,813	0,782	0,786	0,798	0,692	0,687	0,733	0,748	0,842	0,862	0,838	0,869
0,714	0,689	0,646	0,646	0,427	0,414	0,430	0,428	0,718	0,736	0,743	0,792
0,564	0,485	0,473	0,438	0,201	0,206	0,209	0,236	0,491	0,490	0,593	0,588
0,380	0,326	0,281	0,286	0,120	0,115	0,138	0,085	0,278	0,341	0,367	0,390
0,250	0,221	0,157	0,170	0,053	0,065	0,069	0,049	0,224	0,208	0,259	0,298
0,143	0,152	0,105	0,108	0,026	0,030	0,036	0,029	0,132	0,115	0,159	0,172
0,081	0,108	0,070	0,058	0,015	0,014	0,018	0,025	0,071	0,072	0,068	0,089
Negativ-Kontrolle											
0,012	0,009	0,013	0,017	0,007	0,007	0,004	0,003	0,004	0,007	0,008	0,005

Tabelle A.2: Gemessene Absorbtion_{492/620nm} des p24-ELISA der GFP-Viren zur Detektion der Viruskonzentration nach UZ; letzte Reihe jeweils unbeladene Negativ-Kontrollen; grau hinterlegt: linearer Bereich des Standards sowie Messwerte der Proben im linearen Bereich, Platte 2 zeigte rechts/links-shift auf der Platte, Standards wurden deshalb getrennt voneinander ausgewertet und die Konzentration der Proben mit dem jeweils näher gelegenen Standard berechnet; Platte 1 und 3 zeigten keinen shift

Platte 1											
Standard		$\Delta C1_V5$		N128A		S130A		G135A		Standard	
0,713	0,722	0,775	0,763	0,733	0,736	0,744	0,743	0,722	0,691	0,623	0,614
0,592	0,587	0,732	0,705	0,629	0,668	0,701	0,721	0,700	0,689	0,513	0,543
0,408	0,412	0,662	0,630	0,525	0,474	0,571	0,598	0,565	0,555	0,365	0,390
0,243	0,269	0,515	0,469	0,333	0,301	0,409	0,402	0,358	0,375	0,219	0,229
0,117	0,138	0,366	0,346	0,185	0,162	0,235	0,248	0,196	0,207	0,099	0,128
0,065	0,062	0,204	0,188	0,084	0,105	0,116	0,115	0,110	0,101	0,052	0,060
0,032	0,032	0,093	0,100	0,038	0,045	0,054	0,057	0,053	0,044	0,021	0,033
Negativ-Kontrolle											
0,004	0,012	0,020	0,009	0,009	0,005	0,004	0,003	0,006	0,002	0,004	0,004
Platte 2											
Standard		D138A		R140A		R140C		P145A		Standard	
0,652	0,668	0,713	0,718	0,712	0,718	0,702	0,705	0,701	0,705	0,652	0,652
0,536	0,538	0,678	0,665	0,681	0,683	0,652	0,635	0,652	0,655	0,543	0,531
0,348	0,390	0,565	0,540	0,583	0,567	0,488	0,497	0,526	0,554	0,322	0,356
0,245	0,232	0,420	0,415	0,458	0,424	0,336	0,331	0,370	0,392	0,200	0,217
0,110	0,097	0,221	0,217	0,295	0,291	0,134	0,167	0,208	0,183	0,089	0,096
0,052	0,047	0,104	0,114	0,155	0,149	0,092	0,091	0,113	0,120	0,057	0,055
0,023	0,022	0,047	0,044	0,063	0,080	0,046	0,044	0,058	0,057	0,025	0,030
Negativ-Kontrolle											
0,005	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,005	0,005	0,005	0,008	0,005	0,005
Platte 3											
Standard		N153A		S155A		EEE146-148AAA		$\Delta 144-153$		Standard	
0,677	0,706	0,719	0,753	0,712	0,719	0,712	0,715	0,693	0,691	0,645	0,567
0,554	0,569	0,709	0,704	0,609	0,626	0,559	0,564	0,615	0,623	0,512	0,465
0,406	0,402	0,587	0,592	0,395	0,409	0,291	0,317	0,396	0,422	0,355	0,334
0,198	0,225	0,441	0,413	0,239	0,229	0,154	0,151	0,225	0,229	0,186	0,185
0,095	0,109	0,249	0,250	0,106	0,120	0,066	0,075	0,117	0,119	0,097	0,078
0,046	0,047	0,131	0,123	0,054	0,051	0,029	0,027	0,046	0,053	0,048	0,039
0,021	0,017	0,054	0,053	0,029	0,022	0,015	0,009	0,031	0,022	0,028	0,023
Negativ-Kontrolle											
0,006	0,009	0,010	0,008	0,009	0,007	0,005	0,009	0,005	0,008	0,003	0,007

Tabelle A.3: Gemessene Absorption_{492/620nm} des p24-ELISA der Luziferase-Viren zur Detektion der Viruskonzentration nach UZ; letzte Reihe jeweils unbeladene Negativ-Kontrollen; grau hinterlegt: linearer Bereich des Standards sowie Messwerte der Proben im linearen Bereich

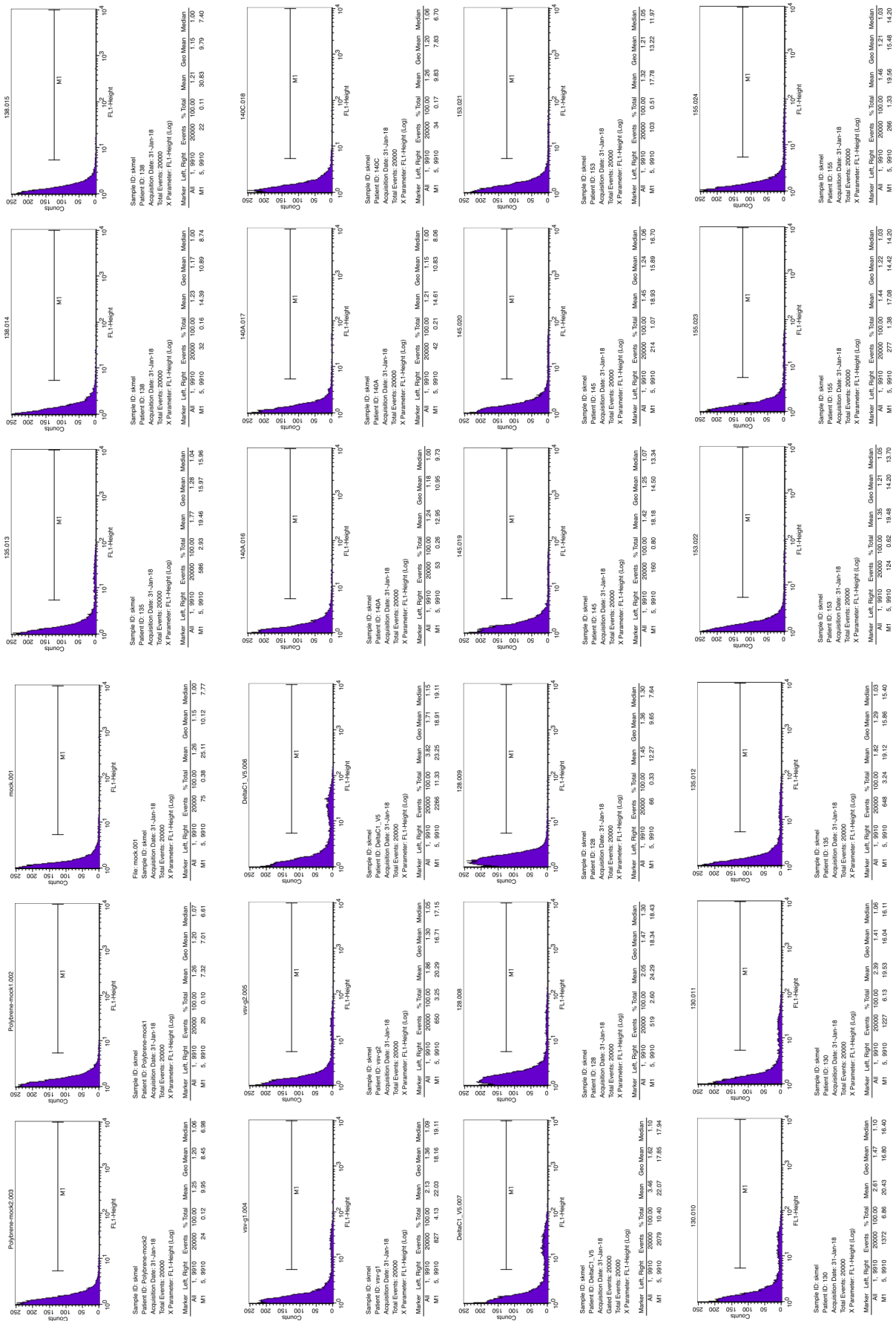


Abbildung A.2: Mittels FACS-Analyse erstellte Histogramme, Auftrag Zellzahl gegen Fluoreszenz, M1 = GFP positive Zellen

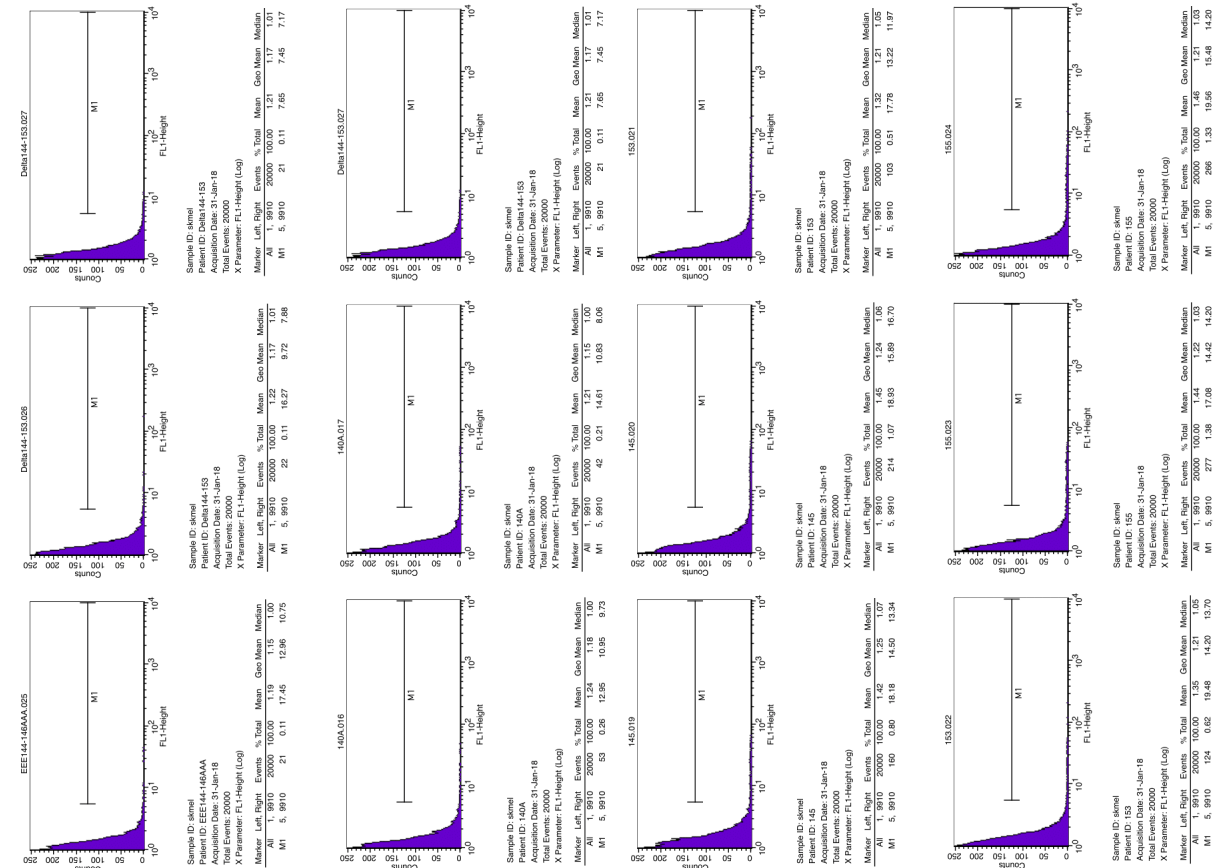


Abbildung A.3: Mittels FACS-Analyse erstellte Histogramme, Auftrag Zellzahl gegen Fluoreszenz, M1 = GFP positive Zellen

Naiv	VSV-G-GFP	VSV-G-Luzi	$\Delta C1_V5$	N128A	S130A	G135A	D138A	R140A	R140C	P145A	N153A	S155A	EEE146-148AAA	$\Delta 144-153$
60	70	60030	131390	2400	90850	16710	60	1500	40	22690	4330	209200	60	40
70	80	65960	95110	1750	69260	16060	70	1740	300	16400	6570	261270	100	110
80	110	53440	108450	710	102330	25980	60	1470	60	14980	4670	218790	110	70
80	90	55010	140140	870	58920	22180	80	550	60	20130	6620	224830	130	60
40	50	43140	108480	520	92480	24860	30	1840	60	16120	2760	208170	30	40
30	60	61880	126980	360	103720	27020	40	1200	40	23080	6600	212760	40	40
30	50	59380	103720	2060	96960	31260	60	3780	30	27580	5160	214635	50	20
60	50	58280	90620	820	121020	33960	390	740	40	22730	4400	215625	200	40
80	60	86920	103640	2120	114040	31000	40	3040	30	23420	1760	242760	770	340
30	60	58980	114080	800	112080	33040	60	1760	50	27630	6200	257505	80	60
50	90	66400	128620	3320	104540	30060	50	640	410	21850	1680	237870	70	40
70	130	120460	149620	2720	108120	38760	50	700	440	29420	1860	245805	60	30

Tabelle A.4: Lumineszenz-Werte [RLU] des Luziferase-Assays 72h nach Infektion (Infektion: 10 ng Virus (UZ)); Negativ-Ko: Naiv, VSV-G-GFP; Positiv-Ko: VSV-G-Luzi (Infektion: 0,01 ng Virus (UZ))

	RLU	log RLU	Infektionsrate [%]	Infektionsrate normalisiert auf $\Delta C1_V5$ [%]
Negativ-Kontrolle	60	1,7	51,6	0,0
VSV-G-GFP	70	1,9	55,5	3,9
VSV-G-Luzi	60030	4,8	143,9	92,3
$\Delta C1_V5$	131390	5,1	151,6	100,0
N128A	2400	3,2	94,9	43,2
S130A	90850	5,0	149,3	97,6
G135A	16710	4,4	32,6	81,0
D138A	60	1,8	53,3	1,6
R140A	1500	3,1	93,6	42,0
R140C	40	1,8	55,4	3,8
P145A	22690	4,3	129,9	78,3
N153A	4330	3,6	107,6	55,9
S155A	209200	5,4	160,5	108,9
EEE146-148AAA	60	1,9	57,7	6,0
$\Delta 144-153$	40	1,7	51,2	-0,4

Tabelle A.5: Infektionsrate in % ermittelt aus den logarithmierten Rohdaten des Luziferase-Assays 72h post Infektion Tab.: A.4; Infektionsrate normiert auf Wildtyp; 100% = 116738 RLU (MW_{RLU} $\Delta C1_V5$); 0% = 60 RLU (MW_{RLU} Naiv); Negativ-Ko: Naive/ mit VSV-G-GFP infizierte Zellen; Positiv-Ko: mit VSV-G-Luzi infizierte Zellen, angegeben sind jeweils die Mittelwerte aller 12 durchgeführten Infektionsversuche