

Isolation und Charakterisierung retroviraler Partikel und Proteine zur Untersuchung immunsuppressiver Effekte

Master thesis

Freie Universität Berlin

Im Studiengang "Biology"

Angefertigt am Robert Koch-Institut am Fachgebiet 18

Von Heiko Pietsch

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert

Prof. Dr. Rupert Mutzel

ROBERT KOCH INSTITUT



Freie Universität  Berlin

I. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben. Wörtliche oder sinngemäße Zitate sowie Abbildungen sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

II. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Fachgebiet 18 des Robert Koch-Institutes, Berlin im Rahmen des Masterstudiums „Biology“ an der Freien Universität Berlin. Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während des Studiums unterstützt haben; für die immer angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre am FG18.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Daniel Ivanušić für die Betreuung der Arbeit in allen Bereichen und dabei insbesondere für das Design des pOUT und die Arbeiten am cLSM. Danke, für Deine Unterstützung und dass Du stets Zeit und Geduld für dieses Projekt hattest.

Vielen Dank an Tina Keller für Deine Hilfsbereitschaft im Labor, insbesondere für die Durchführung der IL-10-Analysen.

Herrn Dr. Denner danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, ein äußerst interessantes Gebiet der Virologie kennen zu lernen.

Frau Dr. Wibke Bayer danke ich für die Bereitstellung der Mausfibroblastenzellen und MuLV (Dr. Wibke Bayer, Institute for Virology, Vaccine Development Group, University Hospital Essen, University Duisburg-Essen, 45122 Essen).

Für die Prüfung der Arbeit gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Norbert Bannert vom FG 18 und Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel.

III. Zusammenfassung

Obleich auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin in jüngster Zeit beachtliche Fortschritte erzielt worden sind, ist der Mangel an Organspendern ein fortbestehendes Problem. Im Rahmen der Xenotransplantation können Schweine als Spender zur Transplantation von Zellen oder Organen beim Menschen dienen. Um die Sicherheit der Xenotransplantation zu gewährleisten, ist sowohl die Entwicklung sensitiver Nachweismethoden als auch die Einschätzung des Gefahrenpotentials durch eine Infektion für den Empfänger des Transplantates bedeutend. Zudem sollte im Falle einer humanen Zoonose ein effektiver Impfstoff verfügbar sein. Im Fokus einer möglichen Pathogentransmission stehen dabei insbesondere die porcinen endogenen Retroviren (PERV), welche sich nicht vollständig aus dem Genom der Spendertiere eliminieren lassen. Vorherige Studien zeigten, dass die immunsuppressiven Eigenschaften endogener retroviraler Partikel der *isu*-Domäne des viralen Oberflächenproteins zugeschrieben werden können. Weiterhin ist bekannt, dass eine Immunisierung mit einem *isu*-mutierten Virus zu einer gesteigerten Antikörperproduktion im Wirt führt. Ziel der Arbeit war die Sekretion des viralen Oberflächenproteins p15E-Proteins von PERV sowie eine Charakterisierung der immunsuppressiven Eigenschaften endogener retroviraler Partikel bzw. dessen transmembranen Oberflächenproteins p15E.

Virale Partikel des PERV und MuLV wurden dazu aus dem Überstand infizierter Zellkulturen isoliert. Um eine Gewinnung des Oberflächenproteins von PERV in einem großem Maßstab zu ermöglichen, sollte eine Transfektion eukaryotischer Zellen mit einem Moleklarklon erfolgen. Da die Klonierung der *env*-Sequenz des PERV fehlschlug, wurde das pOUT-Konstrukt erstellt und kommerziell im Auftrag synthetisiert. Dieses Konstrukt codiert das transmembrane Oberflächenprotein p15E von PERV und enthält zudem Sequenzen, die eine starke Expression und Sekretion in eukaryotischen Zellen ermöglichen. Durch die Tags des pOUT wurden ein Nachweis und eine effektive Reinigung des p15E-Proteins ermöglicht.

Der Parameter der Interleukin-10-Freisetzung sollte als Indikator für eine Immunsuppression *in vivo* dienen. Dazu wurden isolierten viralen Partikel und Proteine zu PBMCs gegeben, und die Freisetzung des Interleukin-10 aus diesen Zellen wurde gemessen.

Virale Partikel des MuLV sowie das sekretierte p15E-Protein des PERV, nicht jedoch isolierte virale Partikel des PERV, bewirkten die Freisetzung des IL-10 aus PBMCs. Die Isolate wurden mittels Western Blot- und PCR-Analyse verifiziert. Die Bedeutung der IL-10-Freisetzung *in vitro* konnte nicht abschließend beurteilt werden und es blieb unklar, ob die Induktion des IL-10 als exklusiv relevanter Parameter zur Erfassung der Immunsuppression *in vivo* dienen kann. Mit dem pOUT-Konstrukt steht letztendlich ein effektives System zur Sekretion und Reinigung von Proteinen aus dem Überstand eukaryotischer Zellen zur Verfügung, dessen Aufbau die Sekretion von weiteren Proteinen ermöglicht.

IV. Inhaltsverzeichnis

I.	Eigenständigkeitserklärung.....	II
II.	Danksagung.....	III
III.	Zusammenfassung.....	IV
IV.	Inhaltsverzeichnis.....	V
V.	Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1	Einleitung.....	1
1.1.1	Alternativen zur Allotransplantation sind notwendig.....	1
1.1.2	Schweine sind potentielle Organspender für den Menschen.....	1
1.1.3	Porcine endogene Retroviren sind ein Risiko für die Xenotransplantation.....	1
1.1.4	Organisation des Genoms und Struktur des Virions von PERV und MuLV.....	4
1.1.5	Immunsuppression durch die immunsuppressive Domäne.....	6
1.1.6	Angeborene Immunität.....	7
1.1.7	Erworbene Immunität.....	7
1.1.8	Interleukin-10 ist ein Botenstoff eines Zytokin-Netzwerkes.....	7
1.1.9	Ziele dieser Arbeit.....	8
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Verwendete Geräte.....	10
2.1.2	Verwendete Chemikalien.....	10
2.1.3	Verwendete Reagenzien und Nährmedien.....	11
2.1.4	Verbrauchsmaterialien und kommerzielle Kits.....	11
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	12
2.1.6	Verwendete Oligonukleotide.....	12
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	13
2.2.2	Infektion von eukaryotischen Zellen.....	14
2.2.3	Konzentrierung und Reinigung viraler Partikel.....	14
2.2.4	Herstellung von Zelllysaten zur Analyse von viralen Proteinen.....	14
2.2.5	DNA-Extraktion.....	14
2.2.6	RNA-Extraktion und Reverse Transkription.....	15
2.2.7	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	15
2.2.8	DNA-Sequenzierung.....	15
2.2.9	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	16
2.2.10	Bestimmung des Endotoxin-Gehalts.....	16
2.2.11	Durchführung der IL-10-Analyse.....	16
2.2.12	Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Taq- oder Pfu-Polymerase.....	17

2.2.13	Reinigung der DNA nach der PCR und der Gelelektrophorese	17
2.2.14	Restriktionsverdau der DNA	18
2.2.15	Ligation restringierter DNA-Fragmente.....	18
2.2.16	Transformation von chemokompetenten Zellen	18
2.2.17	Transiente und stabile Transfektion von HEK293T-Zellen	18
2.2.18	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	19
2.2.19	Durchführung der Western Blot-Analyse.....	19
2.2.20	Reinigung des sekretierten PERV-p15E-Proteins	19
2.2.21	Virusnachweis viraler Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung und konfokaler Laser-Mikroskopie (cLSM).....	20
2.2.22	Testung auf <i>Mycoplasma</i>	20
2.2.23	Statistische Auswertung	20
2.2.24	Bioinformatische Analyse	20
2.2.25	Lokales Alignment.....	20
3	Ergebnisse.....	21
3.1	PERV-Präparation zur Untersuchung viraler Partikel mittels IL-10-Analyse.....	21
3.1.1	Herstellung der Markerplasmiden (LTR-PCR)	21
3.1.2	Kultivierung und Selektion PERV-produzierender Zellen.....	23
3.1.3	Isolierung von PERV aus Zellkulturen und Charakterisierung des Virus.....	23
3.1.4	Präparation von PERV-Partikeln im großen Maßstab und Quantifizierung der Partikelzahl.....	25
3.1.5	Analyse zum Nachweis der IL-10 Freisetzung aus PBMCs.....	26
3.2	MuLV-Präparation für den Einsatz in der IL-10-Analyse.....	28
3.2.1	Infektion von MFB-Zellen mit MuLV zur Isolierung viraler Partikel	28
3.2.2	Isolierung von MuLV aus Zellkulturen und Charakterisierung des Virus	28
3.2.3	Nachweis mittels Immunfluoreszenz	31
3.2.4	Testung der Virusisolate auf IL-10-Freisetzung aus PBMCs.....	32
3.3	Klonierung der PERV <i>env</i> -Sequenz.....	33
3.3.1	Klonierung der PERV <i>env</i> -Sequenz in den pTarget-Vektor	33
3.3.2	Klonieren der <i>env</i> -Sequenz aus rezent-infizierten HEK293T-Zellen	38
3.4	Expression des PERV-p15E-Proteins in HEK293T-Zellen.....	42
3.4.1	Design eines synthetischen Konstruktes zur Sekretion des PERV-p15E-Proteins	42
3.4.2	Klonierung der Expressionskassette in den Modellvektor der Fa. ATG:biosynthetics ...	44
3.4.3	Transiente Expression in HEK293T-Zellen, Aufreinigung und Nachweis	44
3.4.4	Test des sekretierten p15E-Proteins auf IL-10-Freisetzung aus PBMCs	45
3.4.5	Stabile Expression in HEK293T-Zellen.....	46
3.4.6	Einführung einer Mutation in das p15E-pOUT	47
4	Diskussion	48
4.1	Infektion humaner Zellen und Isolierung von PERV- und MuLV-Partikel	48

4.2	PERV-spezifische Antikörper zeigen eine Kreuzreaktion gegen MuLV-Proteine	49
4.3	Nachweis und Charakterisierung der PERV-Infektion mittels PCR.....	49
4.4	Nachweis von MuLV mittels Fluoreszenzmikroskopie	50
4.5	Klonierung der PERV <i>env</i> -Sequenz.....	50
4.6	Design des pOUT-Konstruktes zur Produktion von PERV-p15E-Protein	51
4.7	Vorteile der kommerziellen Gensynthese.....	51
4.8	Erfolgreiche Sekretion durch die Wahl eines starken Sekretionssignals.....	52
4.9	Erfolgreiche Sekretion des PERV-p15E-Proteins durch den generierten pOUT-Vektor	52
4.10	Induktion des IL-10 in PBMCs durch MuLV-Isolate und PERV-p15E-Protein, nicht jedoch durch PERV-Isolate.....	53
4.11	Entspricht die IL-10-Induktion einer Immunsuppression <i>in vivo</i> ?.....	54
5	Literatur.....	57

V. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
aa	<i>amino acid</i> (Aminosäuren)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-Terminus
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>env</i>	<i>envelope</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
<i>gag</i>	<i>group-specific antigen</i>
h	<i>hour</i> (Stunde)
HEK293T	<i>human embryonic kidney cells 293T</i>
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Molar

m	milli
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.s.	nicht signifikant
N-	N-Terminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>pol</i>	<i>polymerase</i>
PVDF	Polyvenylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TM	Transmembrandomäne
U	unit
u.a.	unter anderem
V	Volt
w/v	<i>weight per volume</i>
µg	Mikrogramm
z.B.	zum Beispiel

Internationaler Einbuchstabencode für Aminosäuren

Einbuchstabencode	Bezeichnung
A	Alanin
C	Cystein

D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Internationaler Einbuchstabencode für Nukleinsäuren

Einbuchstabencode	Bezeichnung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1 Einleitung

1.1.1 Alternativen zur Allotransplantation sind notwendig

Im Jahr 2010 warteten in den USA rund 100.000 Patienten auf eine Organtransplantation. Demgegenüber stand die Zahl von weniger als 30.000 durchgeführten Transplantationen (Ekser und Cooper 2010). In Deutschland wurden im Jahr 2015 rund 3300 Transplantationen durchgeführt. Zurzeit sind rund 10.000 Patienten auf der Warteliste von Eurotransplant erfasst (Eurotransplant 2016). Aktuell gibt es für die meisten Krankheitsbilder, zu deren Behandlung eine Transplantation notwendig wäre, keine vielversprechenden alternativen Methoden. Beispielsweise kann der Einsatz von Stammzellen zur Regenerierung von Herzmuskelgewebe die Zeit verlängern, bis eine Transplantation notwendig wird (Taylor *et al.* 1998). Die Generierung von vollständigen Organen *in vitro* ist derzeit nicht möglich, obgleich bereits Fortschritte im Bereich des Tissue Engineering erzielt worden sind (Badylak *et al.* 2011; Kofidis *et al.* 2002).

Die Transplantation von Zellen, Geweben oder Organen zwischen Organismen unterschiedlicher Arten wird als Xenotransplantation bezeichnet. Die Xenotransplantation von Tier zu Mensch stellt eine Alternative zur Allotransplantation dar.

1.1.2 Schweine sind potentielle Organspender für den Menschen

Aufgrund ihrer Morphologie und Physiologie sind Schweine besonders geeignete Spender für eine Transplantation von Schweineorganen in den Menschen. Jedoch sind beide Spezies genetisch voneinander verschieden, sodass es nach der Transplantation zu einer akuten Abstoßungsreaktion des Transplantates kommen würde (Mohiuddin 2007). Diese immunologische Barriere entsteht beispielsweise durch das Vorhandensein von Antikörpern im Empfängerorganismus oder die Induktion von Antikörpern durch das Transplantat (Lin *et al.* 1997).

Die Möglichkeit zur genetischen Manipulation ist ein Vorteil beim Einsatz von Schweinen für die Xenotransplantation. Beispielsweise kann durch einen Knock-Out des Galactose- α -1,3-galactosyltransferase-Gens die hyperakute Abstoßungsreaktion verhindert werden (Lai *et al.* 2002). Im Tiermodell zeigte sich eine erhöhte Überlebenszeit der Empfänger im Primatenmodell (Bauer *et al.* 2010). Auch die genetische Manipulation zur Einbringung humaner Glykosylierungsmuster oder die Modifikation von Proteinen des humanen Komplementsystems spielen dabei eine Rolle (Klymiuk *et al.* 2010).

Es bleibt ungeklärt, ob Schweine sich in Bezug auf ein Infektionsrisiko besser als Organspender eignen als Primaten. Die nähere genetische Verwandtschaft des Menschen zu den Primaten könnte einen größeren Wirtszelltropismus für Pathogene dieser Spendertiere in Bezug zum Menschen zur Folge haben (Denner und Tonjes 2012). Durch weitgehendste pathogen-freie Zuchtbedingungen können Infektionen mit den meisten pathogenen Mikroorganismen der Schweine verhindert werden. Eine besondere Bedeutung haben dabei porcine Viren, welche potentiell zwischen Mensch und Schwein übertragen werden können. Dazu zählen beispielsweise das Hepatitis E-Virus oder die porcine Cytomegalieviren (Denner und Tonjes 2012). Um die Sicherheit der Xenotransplantation zu gewährleisten und die Entstehung einer Zoonose wie z.B. beim humanen Immundefizienzvirus (HIV) zu vermeiden, müssen letztendlich spezifische und sensitive Detektionsmethoden etabliert werden.

1.1.3 Porcine endogene Retroviren sind ein Risiko für die Xenotransplantation

Endogene Retroviren stellen ein besonderes Risiko bei der Xenotransplantation dar. Endogene Retroviren haben sich durch die Integration ihrer viralen DNA-Sequenz in das Genom innerhalb der Keimbahn etabliert. Hieraus folgt, dass alle weiteren, mitotisch und meiotisch entstehenden

Zellen das Provirus beinhalten und das Virus innerhalb der Wirtsspezies vertikal übertragen wird (Gifford und Tristem 2003). Das humane Genom enthält zu etwa 8% retrovirale Sequenzen (Lander 2001). Für viele Taxa der Retroviren konnte neben der exogenen Spezies ebenso eine nah-verwandte endogene Art nachgewiesen werden (Kurth und Bannert 2010). Endogene Lentiviren konnten bisher nur in drei Wirtsspezies identifiziert werden (Han und Worobey 2015). Der Transfer der exogenen Retroviren erfolgt per Definition ausschließlich horizontal (Gifford und Tristem 2003).

Viruspartikel der porcinen endogenen Retroviren (PERV) wurden 1970 in Kulturen von Schweine-Nierenzellen erstmalig entdeckt (Breese 1970). Aufgrund ihrer Sequenzhomologie werden PERV unter das Taxon der γ -Retroviren geordnet (**Abbildung 1**). Die meisten endogenen Retroviren, insbesondere die humanen endogenen Retroviren (HERV-K), werden als „genetische Fossilien“ bezeichnet (Herrera *et al.* 2006). In der Sequenz des integrierten Provirus im Wirtsgenom sind häufig Mutationen aufgetreten, so dass keine infektiösen Partikel mehr gebildet werden können. Im Fall des PERV lassen sich aber *in vivo* virale Partikel im Wirt nachweisen, jedoch mit einem geringen Virustiter. Die Expression von PERV ist dabei insbesondere abhängig von der Art des Wirtstieres, des PERV-Subtyps und des untersuchten Organs (Bittmann *et al.* 2012). PERV sind für Schweinen apathogen (Moalic *et al.* 2006). Die Subtypen PERV-A und -B sind im Genom aller Schweine mehrfach integriert. PERV-C dagegen ist nur in manchen Populationen zu finden und zeigt nur eine geringe Virusexpression. PERV-A und -B lassen sich in einem höheren Titer nachweisen (Quereda *et al.* 2012). Im Gegensatz zu PERV-A und -B ist der Subtyp C ecotrop und kann humane Zellen *in vitro* nicht infizieren (Le Tissier *et al.* 1997). Durch Koinfektion und Kultivierung auf einer humanen Zelllinie ließ sich jedoch nach Ko-infektion mit PERV-A und -C eine Rekombinante erzeugen, welche einen erhöhten Virustiter bei Infektion humaner Zelllinien zeigte (Denner *et al.* 2003). Bei dieser Rekombinante handelte es sich um PERV-C, welches die Rezeptorbindedomäne des PERV-A trug. Diese Rekombinante konnte auch in einem Yucatan-Minischwein nachgewiesen werden. Diese Rasse zeichnet sich durch einen überdurchschnittlich hohen Virustiter aller PERV-Subtypen aus, so dass dies vermutlich eine Rekombination zwischen PERV-A und -C begünstigte (Bittmann *et al.* 2012).

Im Gegensatz zu anderen exogenen Pathogenen ist eine Elimination des PERV aus dem Genom des Spendertieres für das Xenotransplantat nicht ohne weiteres möglich (Denner und Tonjes 2012). Es wurden 50 Kopien von replikationskompetenten PERV im Genom von Schweinen identifiziert (Akiyoshi *et al.* 1998). Mit Hilfe von RNAi-Techniken, wie z.B. mittels Short-Hairpin-RNA, konnte die Menge an PERV-Transkripten in transgenen Schweinen signifikant reduziert werden (Bittmann *et al.* 2012). Das Genome-Editing mittels Zinkfinger-Nuklease verursachte *in vitro* eine extrem hohe Zytotoxizität für die Wirtszellen (Semaan *et al.* 2015). Ein vielversprechender Ansatz scheint dagegen die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems zu sein. In PK15-Zellen konnten damit alle integrierten PERV-Proviren eliminiert werden. In einer Kokultur mit HEK293-Zellen zeigten die behandelten PK15-Zellen eine um das 1000-fach geringere Übertragung des PERV auf die humanen Zellen (Yang *et al.* 2015).

Die Entwicklung eines Vakzins ist aus der Sicht der Xenotransplantation nicht sinnvoll, da dieses zu einer Abstoßung des Transplantats durch die Immunantwort des Empfängers führen könnte.

Auch durch eine geeignete Zuchtstrategie ist es möglich, die Anzahl an PERV im Genom der Tiere zu reduzieren (Denner und Tonjes 2012). Eine Verarmung der genetischen Diversität in der Population durch Inzucht hatte dabei keine Auswirkungen auf die Integrationshäufigkeit von PERV im Genom der Schweine (Quereda *et al.* 2012).

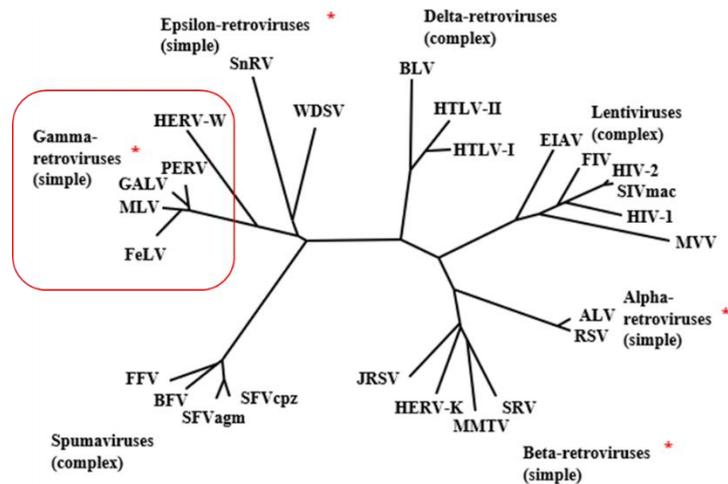


Abbildung 1: Phylogenetische Übersicht der *Retrovirinae*.

Dargestellt ist ein ungewurzelter Stammbaum der *Retrovirinae*. Diese gruppieren sich in die *Orthoretrovirinae* und das Spumavirus-Taxon. Zu den *Orthoretrovirinae* zählen die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren sowie die Lentiviren. Die Gruppe der γ -Retroviren ist im Stammbaum markiert. Eine Unterteilung in „einfache“ und „komplexe“ Retroviren erfolgt aufgrund der Genomstruktur, hat aber keine phylogenetische Relevanz. „Einfache“ Retroviren kodieren die Proteine der *gag*-, *pol*- und *env*-Sequenzen, während komplexe Retroviren zudem für akzessorische und regulatorische Proteine kodieren (Modrow et al. 2010).

Für PERV-A wurden 2003 zwei Proteine als Rezeptoren humaner Zellen identifiziert (Ericsson et al. 2003; Martina et al. 2006). Zudem wurden dazu Homologe in Pavian- und porcinen Zellen beschrieben (Ericsson et al. 2003). Ein sequenzhomologes Protein in Maus zeigte dagegen keine Aktivität (Ericsson et al. 2003). Für das PERV-C wird eine alternative Rezeptorbindung vermutet. Die *proline rich region* des SU von PERV-C unterscheidet sich von der *proline rich region* des PERV-A durch den Austausch zweier Aminosäuren (Argaw und Wilson 2012). Wird die *proline rich region* des PERV-C durch die des PERV-A ersetzt, kann das Virus humane Zellen infizieren. Ein Ligandenbindungstest zwischen dieser PERV-C-Mutante und einem Fusionspeptid aus Antikörper und dem PERV-A-Rezeptor HuPAR-2 konnte keine Affinität der beiden Proteine zueinander nachweisen (Argaw und Wilson 2012). Es konnte bislang keine Übertragung von PERV auf den Menschen nachgewiesen werden. Ebenso konnten bisher noch keine Antikörper gegen PERV bei Personengruppen detektiert werden, welche in einem engen Kontakt zu Schweinen (z.B. Schweinezüchter, Schlachter) stehen. In Tierversuchen konnten Xenotransplantate in Form von Langerhansschen Inselzellen keine PERV auf Ratten übertragen. Auch die Inokulation von Ratten mit PERV-Partikeln verursachte in diesen keine Infektion (Denner et al. 2008). Dagegen beobachteten VAN DER LAAN et al. eine Übertragung des PERV von implantierten Langerhansschen Zellen auf NOD/SCID-Mäuse (van der Laan et al. 2000). Aufgrund einer Mutation besitzt diese Zuchtlinie kein intaktes adaptives Immunsystem. Allerdings konnte in einem Experiment an NOD/SCID-Mäusen als Transplantatempfänger von humanen und porcinen Zellen gezeigt werden, dass eine Infektion der humanen Zellen mit PERV-C aufgrund einer Pseudotypisierung mit MuLV entstanden war (Yang et al. 2004). Für zwei weitere tumor-assoziierte endogene Retroviruspezies konnten in Experimenten an Mäuse nachgewiesen werden, dass die Expression dieser Viren das Tumorwachstum verstärkt. Dabei wurden das neuro-2a-assoziierte Retrovirus oder das melanom-assoziiertes Retrovirus über das Xenotransplantat (Tumorzellen) in den Organismus eingebracht, bzw. über RNAi deren Expression verhindert (Pothlichet et al. 2006) (Mangeney et al. 2005). PERV können humane Zellen *in vitro* infizieren. Dies ist auch durch eine Kokultur von PERV-infizierten porcinen und humanen Zellen möglich und entspricht somit dem Szenario einer Xenotransplantation (Denner et al. 2001). Dennoch sollten weitere Übertragungswege des PERV nicht ausgeschlossen werden, wie z.B. der Genuss von rohem Schweinefleisch.

Eine Xenotransplantation macht eine lebenslange immunsuppressive Behandlung des Empfängers notwendig. Somit ist das Risiko einer Zoonose immens erhöht. Empfänger einer

Xenotransplantation stehen unter stringenter Beobachtung. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass ein möglicher Pathogentransfer über die Speziesgrenzen hinweg zu einer neuartigen, pandemischen Infektionskrankheit, wie beispielsweise beim HIV geschehen, führen könnte. Weiterhin besteht durch die Integration von PERV-Sequenzen in das Genom des Transplantatempfängers die Gefahr von Gendefekten oder Tumorbildung. Zu dem PERV verwandte Retroviren, wie beispielsweise das MuLV, erzeugen in ihren Wirten eine Immundefizienz sowie eine daraus resultierende Tumorbildung (Modrow *et al.* 2010). Interessanterweise wird für die Integration von PERV ein ebenso onkogenes Potential angenommen werden, wie es für eine MuLV-Infektion nachgewiesen ist. Eine Analyse der Integrationsstellen des PERV im humanen Genom zeigte, dass die Integrationsmotive von PERV und MuLV Gemeinsamkeiten aufweisen (Moalic *et al.* 2006).

Es wird vermutet, dass eine Vielzahl exogener Retroviren eine Immunsuppression im Wirt verursachen (Denner 1998). Die Immunsuppression durch das HIV beruht auf einem anderen Mechanismus. Dabei kommt es zu einer Immunaktivierung. Es werden CD4⁺-T-Zellen aktiviert, welche nur eine begrenzte Lebensdauer haben (Boasso und Shearer 2008). Letztendlich führt dies zu einer Reduktion der CD4⁺-Zellen und zu opportunistischen Infektionen (Kurth und Bannert 2010).

1.1.4 Organisation des Genoms und Struktur des Virions von PERV und MuLV

Das Genom des Virions der Retroviren, sowie auch von PERV oder MuLV, besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen (Modrow *et al.* 2010). Da nur einer der beiden Stränge in das Wirtsgenom integriert wird, werden Retroviren als pseudodiploid betrachtet (Flint 2009). Am 5'-Ende findet sich eine CAP-Struktur, am 3'-Ende dagegen eine Polyadenylierungssequenz. PERV und MuLV zeigen die typische Genomstruktur der als „einfach“ klassifizierten Retroviren. Nicht-codierende Sequenzen flankieren die *gag*, *pol* und *env*-Sequenzen. Diese 5' und 3'-nicht-codierenden-Sequenzen bestehen aus einer *unique-5* (U5), *redundant* (R) und *unique-3* (U3) Region und sind wichtig für die Integration ins Wirtsgenom (**Abbildung 2**).

Die Region zwischen der U5- und der *gag*-Sequenz wird als Leader-Region bezeichnet und enthält eine Primerbindestelle (PB), eine Splice-Donor-Stelle (SD) und die Phi-Region. An die PB wird eine zelluläre tRNA-gly gebunden, diese initiiert die reverse Transkription. Diese tRNA wurde vor dem Budding in das Virion aufgenommen (Flint 2009). Die Phi-Region ist ebenfalls ein *cis*-Element und vermittelt die Verpackung der RNA in das Kapsid (Modrow *et al.* 2010). An der nicht-codierenden Region des 3'-Endes findet sich ein Polypurintrakt (PP), welcher für die Reverse Transkription bedeutend ist und als Primerbindestelle während der Genomreplikation funktioniert.

Die Genomorganisation des Virions ist nach abgeschlossener Integration vom Genomaufbau des Provirus verschieden (**Abbildung 2**). Nach der Integration werden die nicht-codierenden 5'- und 3'-Regionen (U5, R, U3) als *long terminal repeats* (LTRs) bezeichnet. Diese *cis*-Elemente dienen als Promoter und Enhancer der viralen Proteine. Dabei sind die LTRs des 5' und 3'-Endes identisch in ihrer Sequenz (Modrow *et al.* 2010). Neben den LTRs konnten bislang keine weiteren internen Promoter im Genom der γ -Retroviren identifiziert werden (Flint 2009).

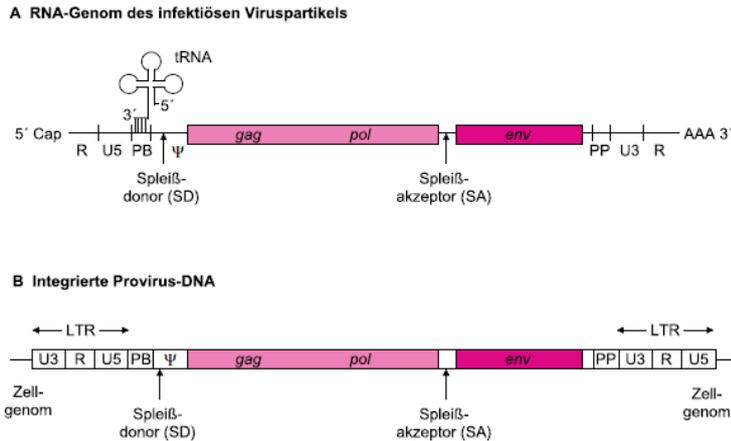


Abbildung 2: Schematische Darstellung des allgemeinen Genomaufbaus der Retroviren.

Abbildung A zeigt den Genomaufbau eines „einfachen“ Retrovirus in Form eines infektiösen Partikels. In Abbildung B ist der Aufbau des Provirus dargestellt. Aus: (Modrow et al. 2010).

Die ungespleißte mRNA dient als Template für die Translation des Gag-Proteins. Durch eine Verschiebung des Leserasters wird das Gag-/Pol-Vorläuferprotein translatiert. Die gespleißte mRNA codiert für das Env-Vorläuferprotein (Modrow *et al.* 2010). Die virale Protease, das Matrix-, Kapsid- und Nucleokapsidprotein werden von der gag-Sequenz codiert. Die pol-Region codiert für die Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Die Hüllproteine werden von der env-Sequenz translatiert.

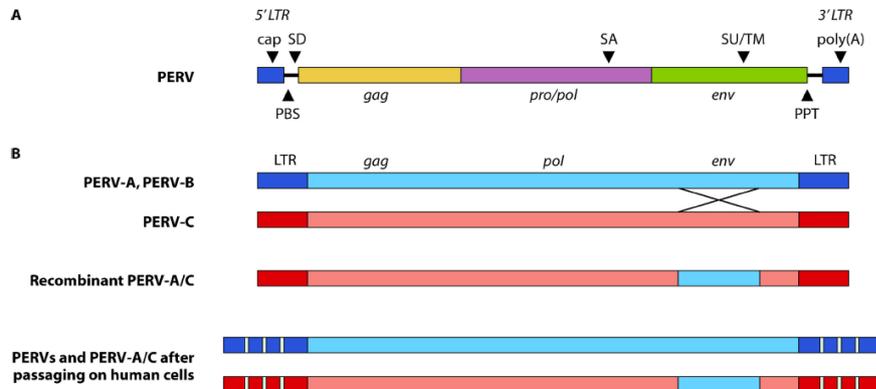


Abbildung 3: Schematische Übersicht der PERV-Subtypen.

Dargestellt ist die allgemeine schematische Genomorganisation des PERV in (A). In Abbildung (B) sind die Subtypen PERV-A, -B und -C sowie die Rekombinante aus PERV-A/-C gezeigt. Zudem ist die Rekombinante nach Passagierung auf humanen Zellen und daraus folgender Multimerisierung von Repeat-Sequenzen in der LTR-Region dargestellt. Aus: (Denner und Tonjes 2012).

Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 100 nm (Flint 2009) (**Abbildung 4**). Im Virion befinden sich, umgeben von den Kapsidproteinen, die virale RNA, die Integrase, Reverse Transkriptase und Protease (Modrow *et al.* 2010). Die Matrixproteine umschließen das Kapsid und stellen den Kontakt zur Hüllmembran her. Die Hüllmembran entstammt der Wirtszelle und ähnelt dieser somit in Lipid- und Proteinstruktur (Modrow *et al.* 2010). Das Trimer, gebildet aus drei Dimeren des gp70 und p15E, ist verantwortlich für die Rezeptorbindung des Virions (Modrow *et al.* 2010). Das gp70 (oder auch *surface unit*, SU), ist über das p15E in der Hüllmembran verankert. Das transmembrane Protein p15E enthält eine Transmembrandomäne (TM). Die Einteilung in die Gruppen PERV-A, -B und -C ist durch Unterschiede in deren env-Sequenz, der Rezeptorbindedomäne (gp70), bedingt (Takeuchi *et al.* 1998). Diese bestimmen

auch das Glykosylierungsmuster des gp70 und somit auch den Wirtszelltropismus der einzelnen Subtypen (Takeuchi *et al.* 1998).

Das Murine Leukämie Virus (MuLV) ist, ebenso wie PERV, ein γ -Retrovirus und zeigt eine zum PERV analoge Organisation und Aufbau. Es wird vermutet, dass MuLV und PERV einen gemeinsamen Vorfahren haben. Das PERV bildet dabei eine Schwestergruppe zum MuLV (**Abbildung 1**).

Im Gegensatz zu HIV, welches über ein Kerntransportsignal im Matrixprotein p17 verfügt, können γ -Retroviren nur Zellen während der Mitose infizieren, da hierbei die Kernmembran aufgelöst ist (Modrow *et al.* 2010).

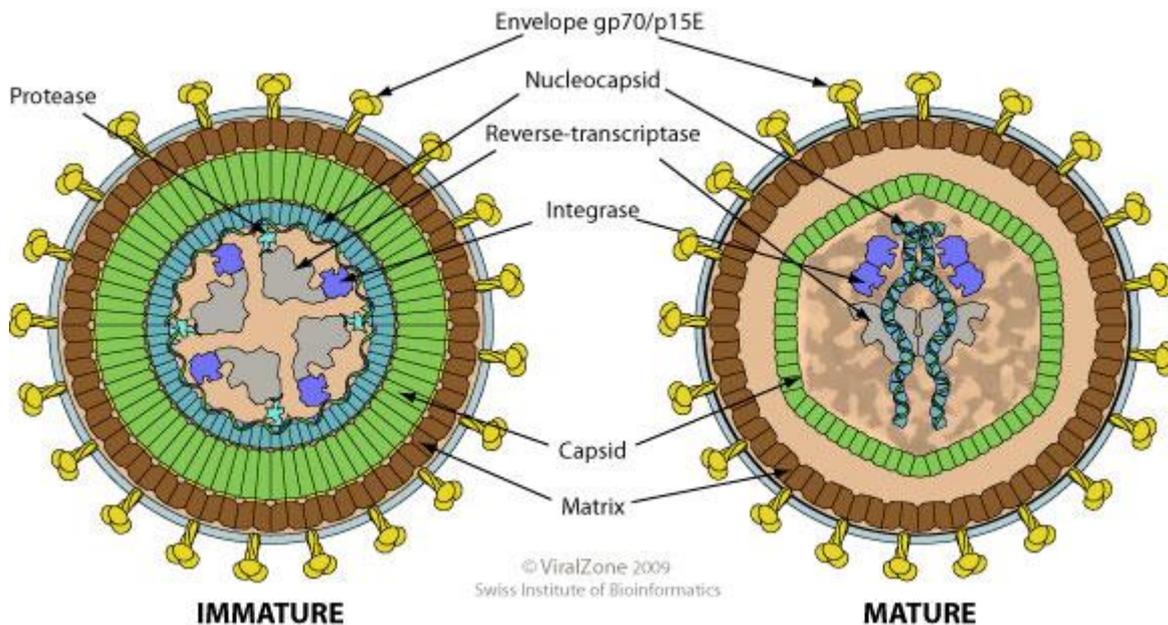


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des unreifen und reifen retroviralen Partikels.

Die Abbildung zeigt den Aufbau eines Virions der γ -Retroviren. Dabei durchläuft das Virion nach dem Budding-Prozess aus der Wirtszelle einen Reifungsprozess, bei welchem es zu einer Strukturänderung der viralen Proteine kommt. Durch die virale Protease wird das Gag-Vorläuferprotein in das p27 (Kapsid-Protein) und das p10, das Nukleinsäure-assoziierte Protein und in das membran-assoziierte Protein gespalten (Denner und Tonjes 2012). Aus: (Bioinformatics" 2016).

1.1.5 Immunsuppression durch die immunsuppressive Domäne

Im Falle einer Übertragung des PERV durch eine Xenotransplantation auf den Menschen sollte ein effektiver Impfstoff verfügbar sein. Im Gegensatz zu HIV-1 ließen sich für γ -Retroviren verschiedener Spezies neutralisierende Antikörper gegen die *membrane proximal external region* induzieren (Denner *et al.* 2012; Fiebig *et al.* 2015). Da die Infektion mit PERV nicht im Tiermodell getestet werden kann, lässt sich die Wirkung der Vakzinierung nur für andere Vertreter der γ -Retroviren, wie z.B. das Feline Leukämie Virus (FeLV), das MuLV oder für das Koala Retrovirus zeigen (Fiebig *et al.* 2015; Reif 1985; Schlecht-Louf *et al.* 2014). Im Falle einer Vakzinierung mit Antikörpern gegen das FeLV wurde nachgewiesen, dass Katzen ein um 50% reduziertes Infektionsrisiko nach Vakzinierung besitzen (Schlecht-Louf *et al.* 2014). Zudem konnte durch Immunisierung mit dem TM- und SU-Protein ein höherer Titer an Antikörpern gegen das PERV in Ziegen erreicht werden, als nach einer Immunisierung unter ausschließlicher Verwendung des TM-Proteins (Denner *et al.* 2012). Auch konnte für das gp41 des HIV-1 gezeigt werden, dass eine Punktmutation in der Core-Region der *isu*-Domäne die immunsuppressiven Eigenschaften des Virus aufhob und die Antikörperproduktion gegen das Virus gesteigert war (Morozov *et al.* 2012).

Die immunsuppressiven Eigenschaften vieler Retroviren werden einem phylogenetisch konservierten Motiv im TM-Protein, der sogenannten immunsuppressiven (*isu*) Domäne zugeschrieben (Denner 1998; Denner und Tonjes 2012). *In vitro* konnte dieser Effekt durch die Freisetzung des Interleukin-10 (IL-10) aus Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) nach Zugabe retroviraler Partikel, rekombinanten TM-Protein oder synthetisch hergestellten *isu*-Peptiden gezeigt werden (Denner und Tonjes 2012). *Isu*-Peptide des HIV-1 oder der Typ C/D-Retroviren inhibieren die Differenzierung von mitogen-stimulierten T-Lymphozyten *in vitro* (Denner *et al.* 1994). Interessanterweise ließen sich die immunsuppressiven Effekte von FeLV durch Mutationen in der *isu*-Sequenz aufheben (Schlecht-Louf *et al.* 2014). Dies konnte auch für eine Punktmutation im TM-Protein von HIV-1 demonstriert werden (Morozov *et al.* 2012).

1.1.6 Angeborene Immunität

Die unspezifische, angeborene Immunität auf zellulärer Ebene beruht auf der Erkennung von Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP). PAMPs sind konservierte Strukturen von Pathogenen, die jedoch nicht im Wirtsorganismus zu finden sind. Dazu zählen insbesondere Zellwände und Zellmembranbestandteile, Hitzestressproteine und virale Nukleinsäuren (Groß 2009). Die Erkennung erfolgt über die Toll-like-Rezeptoren (TLR), welche von antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen) exprimiert werden. Die Abwehr des Pathogens erfolgt über Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen. Auch die Plasmaproteine des Komplementsystems sind Teil der angeborenen Immunantwort. Die Erkennung des PAMPs durch Immunzellen führt zur Bildung von Zytokinen und leitet damit die spezifische Immunabwehr ein (Koolman und Röhm 2009).

1.1.7 Erworbene Immunität

Die T- und B-Lymphozyten sind bedeutend für die adaptive Immunität. Es werden Antikörper und T-Zellen gebildet, die mit ihren Rezeptoren an bestimmten Regionen des Antigens, den sogenannten Epitopen, binden. Sequenzielle Epitope werden dabei von konformationellen Epitopen unterschieden. Für die Erkennung der letztgenannten ist die räumliche Struktur des Proteins, also Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, von Bedeutung (Groß 2009).

Die B-Lymphozyten sind Teil der humoralen Abwehr. Nach Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche wird dieses aufgenommen, proteolytisch abgebaut und über Membranproteine, den sogenannten Major Histocompatibility Complex-(MHC)-II, auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Antigene intrazellulärer Pathogene, wie z.B. Viren, werden über MHC-I von allen kernhaltigen Zellen mit Ausnahme intakter Neurone präsentiert (Groß 2009). T-Helfer-Zellen binden über den T-Zell-Rezeptor am B-Lymphozyt oder anderen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) (Makrophagen, dendritische Zellen). Durch Bindung an die APZ und das Antigen wird die T-Zelle aktiviert und sezerniert Interleukine. Einige B-Zellen reifen zu Gedächtniszellen. Die Präsentation über MHC-I führt zur Bildung von zytotoxischen T-Zellen aus CD8⁺-T-Zellen. Nach Stimulation durch MHC-II-präsentierte Antigene entstehen aus CD4⁺-Zellen T-Helferzellen (T_H) und daraus zytokinabhängig T_H1 oder T_H2-Zellen (Groß 2009). T_H1-Zellen aktivieren Makrophagen. T_H2-Zellen dagegen aktivieren B-Zellen. Es kommt zu einer selektiven klonalen Vermehrung der B-Zellen mit zum Erreger passenden Antigen-Rezeptoren. Nach Reifung zur Plasmazelle sezernieren diese Antikörper (Koolman und Röhm 2009).

1.1.8 Interleukin-10 ist ein Botenstoff eines Zytokin-Netzwerkes

Zytokine sind Botenstoffe die zur interzellulären Kommunikation dienen. Zu dieser Klasse zählen unter anderem Wachstumshormone, Interleukine, Interferone und Chemokine. Die Interleukine vermitteln dabei die Kommunikation zwischen den Leukozyten. Alle bisher entdeckte Interleukine wurden den Gruppen 1 – 32 zugeordnet (Commins *et al.* 2010). Die Signaltransduktion der Zytokine erfolgt über kurze Signalwege, meist über die Aktivierung Tyrosin-Kinase-assoziiierter Rezeptoren, was eine schnelle Antwort ermöglicht (Müller-Esterl 2010).

Das Interleukin-10 (IL-10) wird als ein anti-inflammatorisches Zytokin bezeichnet. Es wird sezerniert, um die Immunreaktion des Körpers nach einer Entzündungsreaktion auf ein Antigen zu reduzieren oder zu beenden (Groß 2009). Aufgrund von Sequenzhomologien wird das IL-10 unter die Gruppe der IL-10-like geordnet, jedoch unterscheidet es sich funktional von den übrigen Mitgliedern der IL-10-Familie (Brocker *et al.* 2010).

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung viraler Partikel und Proteine auf eine Immunsuppression *in vitro* anhand der Freisetzung von IL-10 aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) nach Zugabe viraler Partikel oder Proteinen. Als PBMCs werden alle einkernigen Zellen des Blutes bezeichnet. Das IL-10 ist unter anderem für die Immuntoleranz verantwortlich. Die immunologische Toleranz bezeichnet das Ausbleiben einer Immunantwort gegen körpereigene Bestandteile, welche erst vom Organismus erworben werden muss (Groß 2009). Die IL-10-induzierte Immuntoleranz ist besonders im Darm bedeutend (Schopf *et al.* 2002). Der Knockout des IL-10 in Mäusen verursachte bei diesen eine chronische Entzündung der Schleimhäute von Dick- und Dünndarm, insofern die Mäuse nicht unter pathogen-freien Bedingungen gehalten wurden. Die Enterocolitis wurde demnach durch die nicht-regulierte Immunantwort verursacht (Kühn *et al.*). Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-10- und IL-10-/IL-4-knock-out Mäuse eine erhöhte Letalität aufweisen, wenn sie mit Darmparasiten (*Trichuris*) infiziert werden. Dies konnte ebenso auf eine erhöhte Immunantwort zurückgeführt werden. In IL-10/IL-12-knockout-Mäusen konnte dieser Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden. Die immunsuppressiven Eigenschaften des IL-10 werden also auch in Kombination mit IL-12 bestimmt (Schopf *et al.* 2002).

IL-10 wird von T_H2-Zellen sezerniert. T_H2-Zellen sind CD4⁺-Zellen, die das IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 bilden. Das IL-10 hemmt den T_H1-Signalweg und verstärkt somit die T_H2-Immunantwort. Über den T_H1-Weg wird die zelluläre Immunität gegen intrazelluläre Pathogene induziert. Über den T_H2-Weg werden B-Zellen aktiviert (Groß 2009).

Darüber hinaus beeinflusst IL-10 die Wirkung des Transkriptionsfaktors (TF) NF-κB. In Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen inhibiert IL-10 den NF-κB-TF, in CD8⁺ T-Zellen führt es zu einer Induktion dieses Transkriptionsfaktors (Mocellin *et al.* 2004). Auf CD8⁺ T-Zellen wirkt IL-10 somit aktivierend, indem es ihre Zytotoxizität und Proliferation steigert (Mocellin *et al.* 2004b).

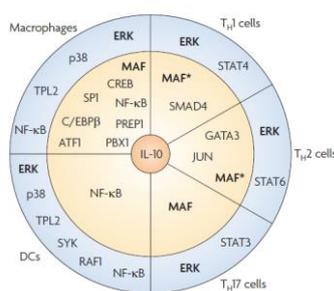


Abbildung 5: Schematische Übersicht der TF bei der IL-10-Regulation.

Die Abbildung zeigt im inneren Kreis die TF, welche in dendritischen Zellen, Makrophagen, T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen die Transkription des IL-10 regulieren. Die Expression des IL-10 wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkription und der Stabilität und Degradation der mRNA durch microRNA beeinflusst. Aus: (Saraiva und O'Garra 2010).

1.1.9 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten die möglichen immunsuppressiven Eigenschaften von PERV- und MuLV-Partikeln sowie eines, in humanen Zellen exprimierten, PERV-p15E-Proteins miteinander verglichen werden (**Abbildung 6**). Es sollte eine Charakterisierung der, aus

Zellkulturüberständen gewonnenen, viralen Partikel erfolgen, und zudem die Kreuzreaktivität PERV-spezifischer Antikörper gegen MuLV untersucht werden. Zur Gewinnung von PERV-p15E wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen sollte eine Untersuchung von bereits vorhandenen Klonen erfolgen, welche die *env*-Sequenz einschließlich des p15E tragen. Diese Klone waren in humanen Zellen jedoch nicht expressionsfähig. Zum anderen sollte die Klonierung der *env*-Sequenz von PERV aus rezent-infizierten humanen Zellen erfolgen. Letztendlich wurde ein synthetisch-hergestelltes Genkonstrukt erworben, welches die p15E-Sequenz des PERV exklusive seiner Transmembrandomäne trug. Es wurden virale Partikel von PERV und MuLV, sowie das von humanen Zellen sekretierte PERV-p15E-Protein auf ihre Eigenschaft zur Freisetzung von Interleukin-10 aus PBMCs untersucht werden.

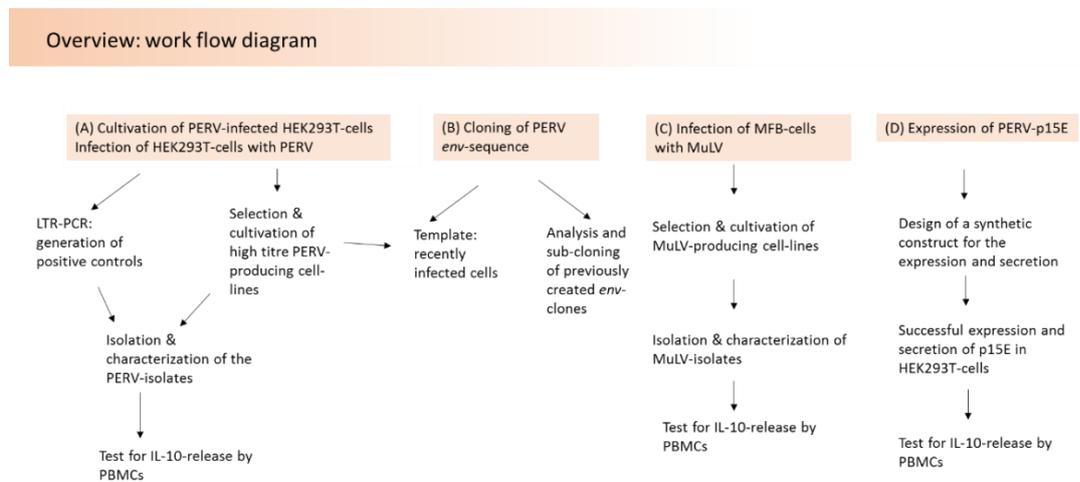


Abbildung 6: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Untersuchung der IL-10 Induktion. Das Projekt ließ sich in vier Bereiche (A-D) gliedern. In den Arbeitsschritten A und C wurden retrovirale Partikel untersucht. In D wurde das PERV p15E-Protein analysiert. Letztendlich dienten alle Experimente der Untersuchung der IL-10 Induktion in PBMCs. (Aus: Abschlussvortrag im Plenum des FG18)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Herkunft
Analysenwaage AC211S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bakterieninkubator Kelvitron	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
BioRad MiniProtean® Tetra Cell	BioRad, München, Deutschland
BioRad power PAC 300	BioRad, München, Deutschland
ChemoCam Imager WB/PCR	INTAS, Göttingen, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop ID03	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mastercycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowellenherd HF 22023	Siemens, München, Deutschland
NanoDrop ND-1000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
PCR-Kammer Mini Sub Cell	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot SD®	BioRad, München, Deutschland
Vortexer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad GFL Typ 1013	Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland
Zellkultur Werkbank HERASafe	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland

2.1.2 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Herkunft
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde, Deutschland
Tween®20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Verwendete Reagenzien und Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller, Herkunft
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar Agar bakteriologisch	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BigDye®	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BSA Fraktion IV	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM-Nährmedium	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
Fötale Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Metafectene®PRO	Biontex, München, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
O' GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Prestained Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Roti® Free Stripping Buffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
SMART® MMLV Reverse Transcriptase	Clontech, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller, Herkunft
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gele	BioRad, München, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Deutschland
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Ibidi 35 mm Grid 500 µ-dish	Ibidi, München, Deutschland
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two	Invitex, Berlin, Deutschland
Invisorb® Spin DNA Extraction Kit	Invitex, Berlin, Deutschland

Pierce ECL Substrat	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Pipettenspitzen, 5-200 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, 50-1000 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5/1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette 2, 5, 10, 25 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Sterilfilter 0,45 µM	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Whatmanpapier	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
PBS	137mM NaCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 2.7mM KCl, 1.8mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2
PBS-T	PBS, 0,1% Tween 20
Anodenpuffer	200mm Tris, pH 8.9
Kathodenpuffer	100mm Tris, 100mm Tricin, 0.1% SDS, pH 8.25
Coomassie Färbelösung	0.25% Brilliant blue 250 G, 10% Glacial acetic acid, 45% Methanol
Entfärbelösung	10% Essigsäure, 45% Methanol
NP-40, Nonidet P-40, Lysepuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Transferpuffer	50mm Tris, 40mm Glycin, 20% Methanol, 0.03% SDS

2.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
PERV-LTR_34 (12)	AAAGGATGAAAATGCAACCTAACC
PERV-LTR_26 (13)	ACGCACAAGACAAAGACACACGGAA
LTR_Repeat_up (96)	TCTTGGTGACAACATGTCTC
LTR_Repeat_down (97)	AGTGTGGAGTCGGGACAGCT
env_complete_fw	TGTTCTCTAGGCTCAAGGCG
env_complete_rv	CTAATCTTAGAACTGGGAAGGCT
PERV_envA_for	TGGAAAGATTGGCAACAGCG

PERV_envA_rev	AGTGATGTTAGGCTCAGTGG
p15E_fw	GCTGTAATGCTCGGATTGGG
p15E_rv	GGACTGCACTCACTCGTTCT
p15E env_full_for	TTTTTGCTAGCGCCACCATGCATCCCACGT
p15E env_full_REV	TTTTTGCGGCCGCTCATGATCTGGACTGCA
p15E env_oTM_env_REV	TTTTTGCGGCCGCTGTTGAACCATCCTTCA
T7-promoter_fw	TAATACGACTCACTATAGGG
pTarget_Seq	TTACGCCAAGTTATTTAGGTGACA
PERVmut1for	GCCTGTCAGAAGTCGTTGCGCAGAATCGCCGCGGAC
PERVmut1rev	GTCCGCGGCGATTCTGCGCAACGACTTCTGACAGGC
Env_incl_p15E Reverse	TTCTAATCTTAGAACTGGGAAGG
F-MuLV_sense	AAGTCTCCCCCGCCTCTA
F-MuLV_antisense	AGTGCCTGGTAAGCTCCCTGT
F-MuLV_sonde	ACTCCCACATTGATTTCCCCGTCC

2.2 Methoden

Arbeiten der Zellkultur wurden in Laboren des L3**-Sicherheitsstandards durchgeführt, alle weiteren Arbeiten erfolgten unter S1-Bedingungen.

2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter Sicherheitswerkbänken der Klasse II durchgeführt. Adhäsive HEK293T-Zellen wurden in DMEM (10% FKS, L-Glutamin, HEPES, 5% Penicillin Streptomycin, hoher Glukosegehalt) im Brutschrank bei konstanten Bedingungen (37°C 5% CO₂ 95% relative Luftfeuchte) kultiviert. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurde die Zellkultur im Verhältnis 1:5 in eine frische Zellkulturflasche übertragen oder die Verdünnung an den jeweiligen Versuch angepasst. Hierzu wurden die Zellen zweimalig mit PBS überspült. Anschließend konnten sie durch Trypsin-EDTA, einer Protease, welche nach kurzer Inkubation bei 37°C die Zell-Zell-Kontakte und die Zellkontakte zur Flaschenoberfläche spaltet, in frischem Medium vereinzelt und resuspendiert werden.

Zur Kryokonservierung eukaryotischer Zellen wurden ca. 10⁶ Zellen in 1 ml FKS (10% DMSO) resuspendiert, in einer Gefrierhilfe bei -80°C für 24 h gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff endgelagert.

Für die Kultivierung von murinen Fibroblasten-Zellen (MFB) wurde RPMI-1640 (10% FKS, L-Glutamin, HEPES, 5% Penicillin Streptomycin, hoher Glukosegehalt) verwendet und diese analog zu den HEK293T-Zellen kultiviert. MFB-Zellen (*Mus dunni*-Zellen) und infektiöse Zellkulturüberstände des MuLV-B wurden von Frau Dr. Wibke Bayer aus der Arbeitsgruppe DITTMER zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinien wurden stets nach drei Tagen im Verhältnis 1:30 passagiert.

2.2.2 Infektion von eukaryotischen Zellen

Zur Gewinnung von PERV-Partikeln wurden die Zelllinie HEK293T (*human embryonic kidney 293T*) verwendet. Diese Zelllinie ist permissiv für eine Infektion mit PERV (Czuderna *et al.* 2000). Die Infektion von HEK293T-Zellen erfolgte in 6-Well-Kulturschalen bei unterschiedlicher Konfluenz (mindestens 50% Konfluenz) mittels Zugabe gereinigter viraler PERV-Partikel oder sterilfiltrierter (0,45 µm Porengröße) Zellkulturüberstände. Zudem wurde eine Spin-Occulation zur Steigerung der Infektion angewandt. Hierfür wurden Zellen nach Zugabe infektiösen Materials bei 1500 x g für 40 min bei RT zentrifugiert.

Zur Gewinnung von MuLV-Partikeln wurde eine adhäsive murine Fibroblasten-Zelllinie der Maus (MFB), die sogenannten *Mus dunni*-Zellen, verwendet. Für die Infektion der MFB-Zelllinie wurden die Zellen in 25cm²-Zellkulturflaschen in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesät und in diesen durch Zugabe von infektiösen Kulturüberständen mit MuLV-B infiziert. Nach 24 h wurden das Medium ersetzt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Konzentration viraler Partikel aus dem Zellkulturüberstand von MuLV-B lag bei $2,8 \cdot 10^4$ FFU/ml. Daraus konnte die Multiplicity of Infection (MOI) bestimmt werden, welche zur Infektion der Zellen variiert wurde. Die MOI ist durch das Verhältnis aus der Anzahl infektiöser Partikel zur Anzahl an Zellen definiert (Zhu 2005).

2.2.3 Konzentrierung und Reinigung viraler Partikel

Der Überstand der Zellkultur wurde in Falcon-50 ml-Röhrchen überführt und bei RT für 10 min bei 1200 x g zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres Falcon-50 ml-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 4000 x g für 10 min wird der Überstand mittels 0,45 µm-Filter sterilfiltriert. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend bei -80°C gelagert bzw. durch Ultrazentrifugation konzentriert.

Die Ultrazentrifugation erfolgte in zwei Schritten. Der Überstand wurde zunächst bei 4°C für 28.000 rpm (Beckmann-Coulter Optima) für 100 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in endotoxin-freiem PBS resuspendiert, so dass eine Konzentrierung um das 100-fache erreicht wurde. Das Isolat wurde bei -80°C gelagert bzw. durch einen weiteren Zentrifugationsschritt gereinigt. Hierzu wurde das Isolat durch 4,5 ml einer 20%igen Sucrose-Lösung (20% w/v Sucrose in PBS) bei 35.000 rpm (Beckmann-Coulter Optima) für 90 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend in endotoxin-freiem PBS auf eine 2000-fache Konzentration resuspendiert. Während der Resuspension wurden die Proben auf Eis gekühlt. Das Isolat viraler Partikel wurde bei -80°C gelagert bzw. für weitere Versuche eingesetzt.

2.2.4 Herstellung von Zelllysaten zur Analyse von viralen Proteinen

Aus der Zellkultur wurden nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS rund 10^6 Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Diese wurden in 1 ml PBS resuspendiert. Es erfolgte eine Reinigung der Zellen durch dreimalige Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min und anschließende Resuspension in PBS. Nach Resuspension in 100 µl NP-40-Lysepuffer, Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden dieser kurzzeitig bei -20°C oder bei -80°C über einen längeren Zeitraum gelagert.

Es wurde auch eine Probenvorbereitung mittels Laemmli-Puffer durchgeführt. Dazu wurden ca. 10^6 Zellen mit 100 µl Laemmli-Puffer und 25 U an Benzonase, einer Endonuklease, für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben.

2.2.5 DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Zur Gewinnung von Zellen wurden diese aus der Zellkultur nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS mit Hilfe eines Zellschabers geerntet (rund 10^6 Zellen). Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert. Es erfolgte eine Reinigung der Zellen durch dreimalige Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min und anschließender Resuspension in PBS. Der

Überstand wurde verworfen und die DNA wurde nach Herstellerangaben mittels QIAamp® DNA Mini-Kit aus den Zellen extrahiert. Die Zellen wurden hierzu in 200 µl PBS resuspendiert und mit 20 µl Proteinase K behandelt; alle weiteren Schritte wurde nach dem Protokoll „Blood or Body Fluid Spin Protocol“ durchgeführt.

2.2.6 RNA-Extraktion und Reverse Transkription

Mit Hilfe des QIAGEN RNeasy® Mini Kits wurde nach Herstellerangaben eine RNA-Extraktion aus den gereinigten und konzentrierten viralen Partikeln durchgeführt (2.2.3). Dazu wurde das Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology“ angewendet. Die Menge des Lyse-Puffers (QIAGEN RLT) wurde auf 350 µl je Ansatz erhöht. Eine Homogenisierung der Probe wurde durch Verwendung des Vortex-Gerätes erreicht. Für die Transkription der RNA in cDNA wurde das SMART® MMLV Reverse Transcriptase-Kit nach Herstellerangaben sowie spezifische Primer verwendet.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 bestimmt ($\lambda = 260 \text{ nm}$). Das Verhältnis der Adsorptionen von ultraviolettem Licht der Wellenlängen durch die Probe bei 260 nm und 280 nm sollte bei 1,8 liegen. Geringere Werte zeigen eine Kontamination der DNA mit Proteinen an (Mülhardt 2009a).

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Didesoxy-Kettenterminationsmethode nach SANGER. Für die Sequenzierung wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR zur Gewinnung der Fragmente wurde, wie unter **Tabelle 1** und **Tabelle 2** angegeben, durchgeführt. Die Kapillarelektrophorese wurde durch das hausinterne Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts durchgeführt.

Tabelle 1: Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR

Reagenz	Volumen in µl	
BigDye	1	
Puffer 6x	2	
Primer (10 µM)	0,5	
DNA	100-200bp PCR-Produkt:	200-500bp PCR-Produkt:
	1-3	3-10
H ₂ O	auf 10	

Tabelle 2: Temperaturprofil des Sequenzierungs-PCR

Denaturierung	Annealing	Elongation
25 Zyklen		
96°C	55°C	60°C
10 s	5 s	4 min

2.2.9 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Unter Verwendung von Resistenzmarkern wurden transformierte *Escherichia coli* auf LB-Agarplatten oder in flüssigem LB-Medium bei 37°C kultiviert. Die Selektionsantibiotika wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml (Ampicillin) oder 50 µg/ml (Kanamycin) verwendet. Zur Herstellung einer Glycerinkultur zur Kryokonservierung wurden 250 µl einer Übernachts-Flüssigkultur mit 500 µl Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

Die Isolation mittels kommerzieller Mini- (Stratec Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit; QIAprep Spin Miniprep Kit) oder Maxiprep-Kits (QIAGEN EndoFree Plasmid Kit) erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen und über Zentrifugation an einer Matrix aus Silicagel gebunden, gereinigt und anschließend in bidestilliertem Wasser eluiert.

2.2.10 Bestimmung des Endotoxin-Gehalts

Der Endotoxingehalt der Proben wurde mittels EndoLISA Kit nach Herstellerangaben gemessen. Dazu wurde eine Verdünnung eines LPS-Standards von 50-0,05 EU/ml und der Proben in Binding-Puffer auf eine mit rekombinanten Phagenprotein beschichtete 96-Well-Platte aufgetragen. Nach Inkubation für 2 h erfolgte eine Waschung der immobilisierten Endotoxine. Durch Zugabe eines fluorogenen Substrates und Faktor C erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte am ELISA-Lesegerät. Aus der Messung der optischen Dichte erfolgte eine Quantifizierung des Endotoxingehaltes in den Proben.

2.2.11 Durchführung der IL-10-Analyse

Es wurde die IL-10-Freisetzung aus PBMCs gemessen. PBMCs wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Blutproben unterschiedlicher Spender gewonnen. Dazu wurden 15 ml Histopaque® Medium in Leucosep-Röhrchen bei 2400 x g für 1 min zentrifugiert. Das Blut wurde hinzugegeben und bei 2000 x g für 15 min zentrifugiert. Beim sogenannten „Buffy Coat“ handelt es sich dabei um die Grenzschicht zwischen dem Blutplasma und den Erythrozyten. Ein Volumen von 10 ml der angereicherten PBMCs wurde in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen transferiert. Nach Waschung der Zellen mit PBS wurden diese für 10 min bei 1200 x g zentrifugiert und das Pellet in 0,86% Ammoniumsulfat resuspendiert. Die Lyse der restlichen Erythrozyten wurde durch eine Inkubation bei 37°C für 2 h erreicht. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei 1200 x g konzentriert und in RPMI-1640 Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung und Auszählung in einer Neubauer *improved*-Zählkammer ermittelt.

Da virale Partikel zur Aggregation neigen, wurden diese vor Versuchsbeginn durch Frier-Tau-Zyklen mittels Gefrierschrank (-20°C) und Wasserbad (37°C) mit achtmaliger Wiederholung vereinzelt und dabei auch die Kapsidstruktur aufgebrochen.

Die Analyse der IL-10-Freisetzung wurde mit Hilfe des Kits BD OptEIA™ Set Human IL-10 nach Herstellerangaben durchgeführt. 96-Well-Platten werden mit einem Antikörper gegen das IL-10 beschichtet, über Nacht inkubiert und anschließend gewaschen und blockiert. Das IL-10 aus der Probe bindet an diesen, nach einem Waschschrift wird ein Biotin-gekoppelter Detektionsantikörper zugegeben. HRP-gekoppeltes Streptavidin bindet an das Biotin. Die HRP katalysiert die Umsetzung ihres zugegebenen Substrates, wobei dies durch Adsorption bei 450 nm am ELISA-Lesegerät bestimmt und mit einem Standard an IL-10 bekannter Konzentration verglichen werden kann.

Es wurden je Well 40.000 PBMCs eingesetzt. Optional erfolgte eine Inhibition des TLR-4-Signalsweges durch das TAK-242. Dazu wurde eine Inkubation der Zellen mit dieser Substanz

für 15 min bei RT durchgeführt. TAK-242 wurde in einer Endkonzentration von 5 µM verwendet.

2.2.12 Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Taq- oder Pfu-Polymerase

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um spezifisch DNA-Sequenzen enzymatisch *in vitro* zu amplifizieren und somit genügend Kopien eines DNA-Fragmentes für einen Nachweis zu generieren. Dabei wird im ersten Zyklus doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert. Anschließend können sich die Primer an die zu amplifizierende Sequenz anlagern (Annealing). Daher muss die Sequenz der rund 20-30bp-langen Primer komplementär zu den 3'- und 5'-Enden der Zielsequenz sein. In der Phase der Elongation erfolgt die Synthese des Zweitstranges durch den Einbau freier Nucleotide durch eine Polymerase. In jedem Zyklus wird somit die Anzahl an Transkripten der Zielsequenz verdoppelt. Um diesen Prozess automatisiert und in aufeinanderfolgenden Zyklen in einem Thermocycler wiederholen zu können, werden hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet, wie z.B. Taq- oder Pfu-Polymerasen. Diese wurden in thermophilen Organismen (*Thermus aquaticus* bzw. *Pyrococcus furiosus*) entdeckt, sie sind jedoch für ihren Einsatz in der Molekularbiologie modifiziert worden. Da die exponentielle Amplifikation in der konventionellen PCR meist eine reale Effizienz von 70-80% hat, lässt sich kein Rückschluss auf die Menge an Ausgangsnucleinsäure, in diesem Fall ein Maß für die Viruslast, in der Probe ziehen. Die PCR-Methode ist sehr sensitiv, theoretisch genügt eine einzige DNA-Sequenz, welche als Matrize (Template) dienen kann.

Die PCR wurde mit Hilfe kommerzieller Kits nach Herstellerangaben durchgeführt (**Tabelle 3**). Es wurden hierzu die Kits AmpliTaq Gold®, GoTaq® Green Master Mix oder Pfu-Ultra® eingesetzt. Standardmäßig wurde ein PCR-Ansatz mit 50 µl Gesamtvolumen verwendet. Die Annealingtemperatur der Primer wurde in einem Bereich von 5-10°C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur (T_M) variiert. Die No-Template-Control (NTC) enthielt den vollständigen Reaktionsansatz mit Ausnahme einer Probe. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch eine Agarosegelelektrophorese (1-2%ige Agarosekonzentration, 1x TAE-Puffer). Da die DNA aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen ist, wandert diese nach dem Anlegen einer Spannung zur Kathode. Durch die Wechselwirkung mit der Gelmatrix werden dabei größere DNA-Fragmente stärker zurückgehalten. Dennoch ist die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten auch von deren Sekundärstruktur abhängig, was z.B. bei zirkulären Fragmenten zu beobachten ist. Der zugegebene, nach UV-Anregung fluoreszierende, Farbstoff GelRed™ bindet an die DNA-Fragmente und ermöglichte die Detektion durch einen UV-Transilluminator.

Tabelle 3: Bedingungen der Standard-PCR

Vorgang	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	55°C	60 s
Elongation	72°C	1 min / 1 kbp
Finale Elongation	72°C	4 min

2.2.13 Reinigung der DNA nach der PCR und der Gelelektrophorese

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten nach Auftrennung durch ein präparatives Gel (1% Agarose) wurden diese unter UV-Licht sichtbar gemacht und einzelne Banden mit Hilfe eines

Skalpells ausgeschnitten. Die UV-Exposition wurde auf ein Minimum begrenzt, um Schäden an der DNA zu vermeiden (Mülhardt 2009b). Die DNA im extrahierten Gelstück wurde mit Hilfe des Invitex MSB® Spin PCRapace nach Herstellerangaben und einem Elutionsvolumen von 20 µl nach einer Inkubation von 5 min durchgeführt.

2.2.14 Restriktionsverdau der DNA

Der Restriktionsverdau der DNA wurde mit Enzymen des Herstellers New England Biolabs nach Herstellerangaben durchgeführt. In einem 50 µL-Ansatz wurde standardmäßig 3-4 µg DNA mit 1 µl Restriktionsenzym bei 37°C für mindestens 1 h verdaut. Anschließend erfolgte eine Analyse der Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese.

2.2.15 Ligation restringierter DNA-Fragmente

Die Menge an DNA von Insert und Vektor für eine Ligation in einen Vektor wurde mit Hilfe des Ligation-Calculators (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) berechnet. Das Insert wurde dabei in dreifacher Konzentration des Vektors eingesetzt. Die Berechnung der absoluten Menge an DNA ist abhängig von der Fragmentgröße. Die Ligation wurde mit Hilfe des T4 DNA Ligase-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die Vektoren pTargetT™, pCR®-XL-TOPO und pA4E211-FlexTEC tANCHORbase-mCherry (ATG:biosynthetics) verwendet.

2.2.16 Transformation von chemokompetenten Zellen

Die Vektoren wurden in kommerzielle chemokompetente DH5α- (Invitrogen) oder JM109-Zellen (Promega) transformiert und dadurch amplifiziert. Die Durchführung erfolgte stets nach Herstellerangaben. Dazu wurden Bakterien und Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert und nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42°C für 1 h bei 37°C in SOC-Medium resuspendiert. Anschließend erfolgten nach Ausplattierung die Selektion mittels antibiotikaversetzter LB-Platten und die Anzucht der Klone in antibiotikaversetztem LB-Medium. Gewonnene Klone wurden nach DNA-Extraktion (2.2.9) und Restriktionsverdau (2.2.14) auf das Vorhandensein des Inserts im Plasmid geprüft.

2.2.17 Transiente und stabile Transfektion von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70% kultiviert. Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion. Dazu wurde das kommerzielle Reagenz Metafectene®PRO (Biontex) eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurde die Mischung aus Transfektionsreagenz und Plasmid-DNA tropfenweise unter schüttelnder Bewegung zu den Zellen gegeben und diese anschließend inkubiert. Die Versuchskontrolle bestand, abhängig vom jeweiligen Versuch, aus nicht-transfizierten HEK293T-Zellen oder aus HEK293T-Zellen, welche mit einem Leervektor transformiert wurden.

Zur stabilen Transfektion wurden HEK293T-Zellen transfiziert und über mehrere Passagen in antibiotikaversetztem Medium kultiviert. Die Transfektion erfolgte in 6-Well-Platten, anschließend wurden die Zellen in 150 cm²-Flaschen kultiviert. Zur Selektion von stabil transfizierten HEK293T-Zellen mit dem pOUT-Vektor wurde das Selektionsantibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 4 µg/ml eingesetzt. Der pOUT-Vektor kodiert für ein Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum. Sobald der Zellrasen nach Transfektion eine Konfluenz von 80% - 90% erreicht hatte, wurde zur Selektion das Antibiotikum Puromycin zugegeben. Diese Konzentration des Puromycin war für die nicht-transfizierten Zellen toxisch. Mit dem Absterben aller nicht-transfizierten Zellen bei gleichzeitiger Vitalität im Transfektionsansatz war die Effektivität des Antibiotikums bestätigt. Die transfizierten Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen in Puromycin-versetztem Medium kultiviert, um Zellen zu selektieren, welche das Konstrukt in ihr Genom integriert hatten.

2.2.18 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die negativ-geladene SDS-Moleküle lagern sich am Protein an und überdecken die Eigenladung des Proteins. Somit erfolgte nach einer Denaturierung des Proteins bei 95°C für 5 min eine größenabhängige Trennung des Proteins durch die Wanderung durch das Polyacrylamidgels nach Anlegen einer elektrischen Spannung. Es wurden „ready to use“ Gele der Firma BioRad (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels), sowie selbst hergestellte Gele verwendet. Zudem wurde ein Proteinreferenzmarker aufgetragen, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine zu abzuschätzen.

2.2.19 Durchführung der Western Blot-Analyse

Nach Separation der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte ein Transfer der Proben auf eine Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran im Semidry-Blot-Verfahren um eine Untersuchung mittels spezifischer Antikörper zu ermöglichen. Die PVDF-Membran wurde durch Inkubation in Methanol für 1 min aktiviert. Das Blotpapier, die Membran und das SDS-Gel wurden in Transferpuffer äquilibriert. In einer Semidry-Blotting-Kammer bei 15 V Gleichspannung erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran. Nach Transfer konnten Proteine unspezifisch durch eine Färbung mit Ponceau-Red-Farbstoff detektiert werden. Auch die Färbung des Gels mittels Coomassie-Färbung war möglich, da der Proteintransfer auf die jeweilige Membran nicht quantitativ erfolgte.

Eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die jeweilige Membran wurde durch Blockierung der Membran in Blockierungspuffer (PBS mit Milchpulver 6% w/v) bei RT für 2 h oder über Nacht bei 4°C verhindert. Der Primärantikörper wurde in PBS mit Milchpulver 6% w/v verdünnt und die Membran für 1 h bei RT mit der Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T und PBS für jeweils 5 min bei RT auf einem Schüttler erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers analog zum Primärantikörper oder die Waschung und Detektion mit ECL. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*) (HRP) konjugiert. Nach Waschung der Membran, wie beschrieben, wurde die Chemolumineszenz mittels Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) sowie einer INTAS Chemocam detektiert.

Die reversibel gebundenen Primär- und Sekundärantikörper an dem membrangebundenen Protein wurden durch Inkubation der Membran mit Roti®-Free Stripping-Puffer nach Herstellerangaben von der Membran gelöst. Diese Membran konnte erneut mit Antikörpern inkubiert werden, um die gebundenen Proteine an unterschiedlichen Epitopen zu detektieren.

2.2.20 Reinigung des sekretierten PERV-p15E-Proteins

Drei Tage nach Transfektion mit dem pOUT-Vektor wurde das p15E-Protein des PERV aus dem Zellkulturüberstand gereinigt und konzentriert. Für die Konzentrierung und anschließendem Nachweis mittels Western Blot-Analyse wurden magnetische HIS-beads (Dynabeads®) nach Herstellerangaben eingesetzt, an welche das Protein aufgrund seines HIS-Tags binden und anschließend von diesen eluiert werden konnte.

Parallel wurde ein kommerziell erhältliches molekulares Sieb (Vivaspin, Sartorius) verwendet. Der Zellkulturüberstand wird dazu in eine Kammer des Siebes gefüllt und zentrifugiert. Das Prinzip beruht darauf, dass lediglich Proteine und Moleküle einer bestimmten Größe das Sieb passieren können, und diese werden in einer zusätzlichen Kammer gesammelt. Alle übrigen Bestandteile des Überstandes werden zurückgehalten und verworfen.

2.2.21 Virusnachweis viraler Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung und konfokaler Laser-Mikroskopie (cLSM)

Nach dem Aussähen infizierter MFB-Zellen (2.2.2) in Ibidi-Zellkulturplatten μ dish 35mm Grid-500 (2.2.1) wurden diese mit PBS einmal gewaschen und dann in 2%igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS dreimalig gewaschen. Nach Zugabe der Primärantikörperlösung (Ziege Anti-PERV-Gag, kreuzreaktiv mit MuLV-Gag) in einer Verdünnung von 1:100, 1:200 und 1:500 in Blockierlösung und Inkubation für 1 h bei RT erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS-T 0,1% für 5 min. Der Alexa 488-konjugierte anti-Ziege Sekundärantikörper wurde 1:250 oder 1:500 in Blockierlösung zugegeben und 45 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS-T 0,1% für 5 min und eine Resuspension der Zellen in PBS. Die Proben konnten anschließend am Zeiss cLSM 780 analysiert werden.

Durch Markierung mit anti-Ziege Fluorophor-konjugierten (Alexa 488) Antikörpern konnten spezifische Proteine in den Proben nach Anregung der Fluorophore und Aufnahme des emittierten Signals mittels konfokaler Laser-Mikroskopie (cLSM) sichtbar gemacht werden.

2.2.22 Testung auf *Mycoplasma*

Alle verwendeten Zelllinien wurden auf eine mögliche Kontamination mit *Mycoplasma* getestet. Dazu wurde das kommerzielle erhältliche MycoSensor PCR Assay Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es erfolgte eine PCR-basierte Testung von Zellkulturüberständen mit Hilfe generischer Primer für verschiedene *Mycoplasma*-Spezies. Die Testung der Zelllinie war vor dem Anlegen einer Kryokultur obligatorisch.

2.2.23 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software MaxStat lite. Es wurde der t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte angewendet sowie die ANOVA für den Vergleich der Mittelwerte aus mehr als zwei Stichproben. Das Signifikanzniveau für erhaltene p-Werte wurde als signifikant $p < 0,05$ (*), bzw. für $p < 0,005$ als sehr signifikant (**) festgelegt.

2.2.24 Bioinformatische Analyse

Die Überprüfung der Sequenzintegrität und die Bildung eines Sequenzcontigs aus den Daten der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Software DNASTAR Lasergene Core Suite (<http://www.dnastar.com>).

Zur Erstellung eines Alignment der Sequenzdaten wurde die Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA Vers.5 und Vers.6) (<http://www.megasoftware.net>) verwendet (Tamura *et al.* 2011). MEGA5/6 enthält bereits den MUSCLE- sowie den ClustalW-Algorithmus. In MUSCLE wurde der Parameter „Gap Open“ auf -400 gesetzt (Edgar 2004).

Die grafische Aufbereitung und Auswertung von Sequenzen und Alignment erfolgte ebenso mittels BioEdit Vers. 7.2.5 (Hall 1999). Mit Hilfe von SnapGene® und SnapGene® viewer wurden Primer zur Klonierung und Mutagenese sowie virtuelle Restriktionsanalysen und eine grafische Darstellung der Sequenzen erstellt.

2.2.25 Lokales Alignment

Durch eine Analyse mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool *nucleotide* (BLASTn; Einstellung: MegaBLAST) auf der Website des National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden die erhaltenen Nukleotidsequenzen verifiziert. Die Nukleotidsequenzen werden dabei paarweise mit bekannten Sequenzen aus Gendatenbanken verglichen (Alignment) und die Übereinstimmung zu diesen Sequenzen in einer Punktzahl (*score*) bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 PERV-Präparation zur Untersuchung viraler Partikel mittels IL-10-Analyse

3.1.1 Herstellung der Markerplasmide (LTR-PCR)

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Herstellung von Positivkontrollen, welche zur Charakterisierung der Repeat-Sequenzen der LTR-Regionen des Provirus der PERV-Präparationen mittels PCR zu eingesetzt werden sollten. Die Plasmide, welche die 3°- und 5°-LTR-Regionen des PERV enthielten, wurden in chemokompetente Zellen (DH5 α -Zellen) transformiert, in *E.coli* angezogen und mittels Miniprep-Kit isoliert. Das Insert wurde anhand eines Restriktionsverdaus und PCR nachgewiesen und per DNA-Sequenzierung nach SANGER bestätigt (2.2.8). Diese Proben dienten als Positivkontrolle für alle weiteren durchgeführten PERV-PCRs. In Glycerinkulturen angelegte Bakterien, welche mit Plasmiden transformiert sind, die 3°- und 5°-LTR-Sequenzen enthalten, konnten nach mehrmaligen Ansetzen nicht in LB- oder SOC-Medium angezogen werden.

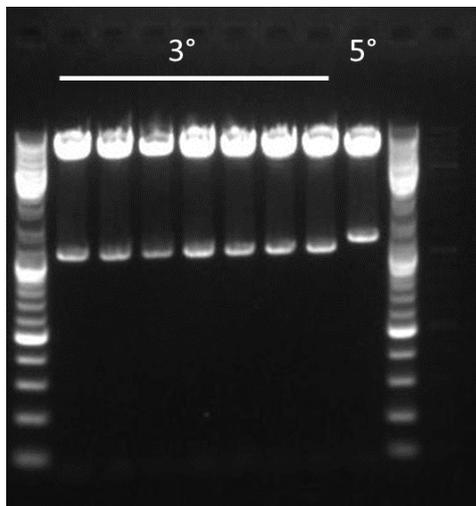


Abbildung 7: Restriktionsverdau der generierten LTR-Klone nach DNA-Extraktion.

Zur Detektion von Klonen, welche das Insert enthalten, wurde die Plasmid-DNA aus den Klonen mit *EcoRI* verdaut und mittels eines 1%igen Agarosegels separiert. Die Abbildung zeigt 7 Klone, welche den 3°-Repeat der LTR beinhalten und einen Klon mit einem 5°-Repeat in der der LTR. In den äußeren Bahnen wurde jeweils der Größenstandard aufgetragen. Es wurden für jeden Verdau 1 μ g an DNA eingesetzt.

Mittels Restriktionsverdaues konnte überprüft werden, dass der pCRTM-XL-TOPO® Vektor in der Klonierung eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt).

Anhand eines Alignment der Sequenzdaten mit Hilfe der Software MEGA5 und des implementierten MUSCLE-Algorithmus konnte die Identität der amplifizierten LTR-Regionen ermittelt werden (**Abbildung 8**) (Edgar 2004; Tamura *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass sich 3°- und 5°-Repeat durch das Vorhandensein zweier weiterer 37 bp-Repeats (gelbe Markierung) unterschieden. Die LTR-Sequenzen der PERV-A und -B zeigten zudem eine höhere Übereinstimmung in ihrer Nukleotidsequenz zueinander als zur PERV-C Sequenz. Die Gewinnung von Positivkontrollen für die Durchführung der PCR-Analyse der LTR-Region des PERV und deren Überprüfung mittels Sequenzierung war erfolgreich.

3_LTR_8.seq	AGCTCTAAATGCCCTCGAATTCAGACCCCTGTTCCCTATAGGTAAGAT	[50]
5_LTR.seq	AGCTCTAAATGCCCTCGAATTCAGACCCCTGTTCCCTATAGGTAAGAT	[50]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	AGCTCTAAATGCCCTCGAATTCAGACCCCTGTTCCCTATAGGTAAGAT	[50]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	AATGAAAGGATGAAATGCAACCTAACCCCTCCGAAACCAGGAAAGTTAA	[50]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	AATGAAAGGATGAAATGCAACCTAACCCCTCCGAAACCAGGAAAGTTAA	[50]
3_LTR_8.seq	CATACTTTTTGCTGTTTTAGGGCTTGGTCTGCTGTACAAAACCTTTG	[100]
5_LTR.seq	CATACTTTTTGCTGTTTTAGGGCTTGGTCTGCTGTACAAAACCTTTG	[100]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	CATACTTTTTGCTGTTTTAGGGCTTGGTCTGCTGTACAAAACCTTTG	[100]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TGAAAAAGCTCTAAATGCCCCGAATTCAGACCCCTGCTGGCTGCCAGTAA	[100]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TGAAAAAGCTCTAAATGCCCCGAATTCAGACCCCTGCTGGCTGCCAGTAA	[100]
3_LTR_8.seq	TGGAAGGGGAAAAAACAGGGCCCTGAGTATGTGCCCTATGCTTGAAACTT	[150]
5_LTR.seq	TGGAAGGGGAAAAAACAGGGCCCTGAGTATGTGCCCTATGCTTGAAACTT	[150]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	TGGAAGGGGAAAAAACAGGGCCCTGAGTATGTGCCCTATGCTTGAAACTT	[150]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	A.....	[150]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	A.....	[150]
3_LTR_8.seq	CTTGAAACTGCTCCTAACTGCTTGTGGCTTCTGTAAACCTGGTTGCAT	[200]
5_LTR.seq	CTTGAAACTGCTCCTAACTGCTTGTGGCTTCTGTAAACCTGGTTGCAT	[200]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	CTTGAAACTGCTCCTAACTGCTTGTGGCTTCTGTAAACCTGGTTGCAT	[200]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1TAGGTAGAAAGTCAACTGCTTCTTA	[200]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1TAGGTAGAAAGTCAACTGCTTCTTA	[200]
3_LTR_8.seq	AAGATATAAAGAGGAGGAGTCAATTGCCAACGGACCCCAAGTAAAGATCGG	[250]
5_LTR.seq	AAGATATAAAGAGGAGGAGTCAATTGCCAACGGACCCCAAGTAAAGATCGG	[250]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	AAGATATAAAGAGGAGGAGTCAATTGCCAACGGACCCCAAGTAAAGATCGG	[250]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TTGTTCCAGGGCTGCTATCCTGGCTAAGTAAAGATAACAGGAAATGAGT	[250]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TTGTTCCAGGGCTGCTATCCTGGCTAAGTAAAGATAACAGGAAATGAGT	[250]
3_LTR_8.seq	GTGTACACAAAATGTTGAAACACATATCTTGGTGAACAATGTCTCC	[300]
5_LTR.seq	GTGTACACAAAATGTTGAAACACATATCTTGGTGAACAATGTCTCC	[300]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	GTGTACACAAAATGTTGAAACACATATCTTGGTGAACAATGTCTCC	[300]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TGACTATCCTGTTATCTGGATTCTGTAATAAAGTACTGGACCATAGAA	[300]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TGACTATCCTGTTATCTGGATTCTGTAATAAAGTACTGGACCATAGAA	[300]
3_LTR_8.seq	CACCCGAAACATGCGCAATGTGTAACCTTAAACAAATTTAAATTAAT	[350]
5_LTR.seq	CACCCGAAACATGCGCAATGTGTAACCTTAAACAAATTTAAATTAAT	[350]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	CACCCGAAACATGCGCAATGTGTAACCTTAAACAAATTTAAATTAAT	[350]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	ATTGATTAACATGACAGCCCTAGTGACCTATCTCAACTGCAATCTGTC	[350]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	ATTGATTAACATGACAGCCCTAGTGACCTATCTCAACTGCAATCTGTC	[350]
3_LTR_8.seq	GGTCCAGGAGCGGGCTCTCGAAGTTTTAAATGACTGGTTTGAATA	[400]
5_LTR.seq	GGTCCAGGAGCGGGCTCTCGAAGTTTTAAATGACTGGTTTGAATA	[400]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	GGTCCAGGAGCGGGCTCTCGAAGTTTTAAATGACTGGTTTGAATA	[400]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	ACTTGCAGGAGCCACGCAAGTGGGGAAGCTCCGGAGC.....TA	[400]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	ACTTGCAGGAGCCACGCAAGTGGGGAAGCTCCGGAGC.....TA	[400]
3_LTR_8.seq	TTTTGAATGATGGTTTGTAAAGCGGGGCTTTG.....	[450]
5_LTR.seq	TTTTGAATGATGGTTTGTAAAGCGGGGCTTTG.....	[450]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	TTTTGAATGATGGTTTGTAAAGCGGGGCTTTG.....	[450]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TTTTAAATGATGGTCCAGGAGCGGGCTCTCGAATTTTTAAATGA	[450]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TTTTAAATGATGGTCCAGGAGCGGGCTCTCGAATTTTTAAATGA	[450]
3_LTR_8.seq	TTGGTTGTAAAGCGGGGCTTTA.....	[500]
5_LTR.seq	TTGGTTGTAAAGCGGGGCTTTA.....	[500]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	TTGGTTGTAAAGCGGGGCTTTA.....	[500]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TTGGTTGTAAAGCGGGGCTTTA.....	[500]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TTGGTTGTAAAGCGGGGCTTTA.....	[500]
3_LTR_8.seq	AGCCGCGGCTTTGG.....	[550]
5_LTR.seq	AGCCGCGGCTTTGG.....	[550]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	AGCCGCGGCTTTGG.....	[550]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	AGCGCGGGCTCTCGAATTTTTAAATGATGGTTTGTAGCCACAGGCT	[550]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	AGCGCGGGCTCTCGAATTTTTAAATGATGGTTTGTAGCCACAGGCT	[550]
3_LTR_8.seq	TGTATTTTGAATGATGGTTTGTAAAGCGGGGCTTTG.....	[600]
5_LTR.seq	TGTATTTTGAATGATGGTTTGTAAAGCGGGGCTTTG.....	[600]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	TGTATTTTGAATGATGGTTTGTAAAGCGGGGCTTTG.....	[600]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TG.....	[600]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TG.....	[600]
3_LTR_8.seq	ATAAAAAGCTGTCCGACTCCACACTCGGGGCGCCGCACTCTACCC	[650]
5_LTR.seq	ATAAAAAGCTGTCCGACTCCACACTCGGGGCGCCGCACTCTACCC	[650]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	ATAAAAAGCTGTCCGACTCCACACTCGGGGCGCCGCACTCTACCC	[650]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	ATAAAAAGCTGTCCGACTCCACACTCGGGGCGCCGCACTCTACCC	[650]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	ATAAAAAGCTGTCCGACTCCACACTCGGGGCGCCGCACTCTACCC	[650]
3_LTR_8.seq	TGCGTGTTGACGACTGTGGGCCCAAGCGCGCTTGGAAATAAAAATCCTCT	[700]
5_LTR.seq	TGCGTGTTGACGACTGTGGGCCCAAGCGCGCTTGGAAATAAAAATCCTCT	[700]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	TGCGTGTTGACGACTGTGGGCCCAAGCGCGCTTGGAAATAAAAATCCTCT	[700]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TGCGTGTTGACGACTGTGGGCCCAAGCGCGCTTGGAAATAAAAATCCTCT	[700]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TGCGTGTTGACGACTGTGGGCCCAAGCGCGCTTGGAAATAAAAATCCTCT	[700]
3_LTR_8.seq	TGCTGTTTGCATCAAGACCGCTTCTGAGTGATTAAAGGGGAGTCCGCT	[750]
5_LTR.seq	TGCTGTTTGCATCAAGACCGCTTCTGAGTGATTAAAGGGGAGTCCGCT	[750]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	TGCTGTTTGCATCAAGACCGCTTCTGAGTGATTAAAGGGGAGTCCGCT	[750]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TGCTGTTTGCATCAAGACCGCTTCTGAGTGATTAAAGGGGAGTCCGCT	[750]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TGCTGTTTGCATCAAGACCGCTTCTGAGTGATTAAAGGGGAGTCCGCT	[750]
3_LTR_8.seq	TTTCCGAGCCTGGAGGTTCTTTTGGCTAGTCTTACATTTGGGGGCTGCT	[800]
5_LTR.seq	TTTCCGAGCCTGGAGGTTCTTTTGGCTAGTCTTACATTTGGGGGCTGCT	[800]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	TTTCCGAGCCTGGAGGTTCTTTTGGCTAGTCTTACATTTGGGGGCTGCT	[800]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	CTTCCGAGCCGGAGCGAGGGGGATTGTTCTTTTACTGGCCTTTTCATT	[800]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	CTTCCGAGCCGGAGCGAGGGGGATTGTTCTTTTACTGGCCTTTTCATT	[800]
3_LTR_8.seq	CGGGATCTGTGCGGGCCACCCTAACACCCGAGAACCGACTTGGAGGTA	[850]
5_LTR.seq	CGGGATCTGTGCGGGCCACCCTAACACCCGAGAACCGACTTGGAGGTA	[850]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	CGGGATCTGTGCGGGCCACCCTAACACCCGAGAACCGACTTGGAGGTA	[850]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1AGGGGGA	[850]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1AGGGGGA	[850]
3_LTR_8.seq	AAAGGATCCTCTTTTAAAGCTGTATGCAATGACCGCCGGCGTCTCTGTT	[900]
5_LTR.seq	AAAGGATCCTCTTTTAAAGCTGTATGCAATGACCGCCGGCGTCTCTGTT	[900]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	AAAGGATCCTCTTTTAAAGCTGTATGCAATGACCGCCGGCGTCTCTGTT	[900]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	TTGTTCTTTTACTGGCCTTTTCATT	[900]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	TTGTTCTTTTACTGGCCTTTTCATT	[900]
3_LTR_8.seq	CTGAGTGTCTGTTTTCACTGGTGGCGGCTTTGGTTTGCAGCTGTCTCT	[950]
5_LTR.seq	CTGAGTGTCTGTTTTCACTGGTGGCGGCTTTGGTTTGCAGCTGTCTCT	[950]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	CTGAGTGTCTGTTTTCACTGGTGGCGGCTTTGGTTTGCAGCTGTCTCT	[950]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	[950]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	[950]
3_LTR_8.seq	CAGACCATAAGGACTGGGGGACTGTGATCAGCAGACGTGCTAGGAGGATC	[1000]
5_LTR.seq	CAGACCATAAGGACTGGGGGACTGTGATCAGCAGACGTGCTAGGAGGATC	[1000]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	CAGACCATAAGGACTGGGGGACTGTGATCAGCAGACGTGCTAGGAGGATC	[1000]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	[1000]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	[1000]
3_LTR_8.seq	ACAGGCTGCCACCTGGGGGACGCCCGGGAGGTGGGGAGGCCAGGGAC	[1050]
5_LTR.seq	ACAGGCTGCCACCTGGGGGACGCCCGGGAGGTGGGGAGGCCAGGGAC	[1050]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	ACAGGCTGCCACCTGGGGGACGCCCGGGAGGTGGGGAGGCCAGGGAC	[1050]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	[1050]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	[1050]
3_LTR_8.seq	GCCTGGTGGCTCTCTCTGCTGCTGAGGACCGAGTTCTGTTGTTGAA	[1100]
5_LTR.seq	GCCTGGTGGCTCTCTCTGCTGCTGAGGACCGAGTTCTGTTGTTGAA	[1100]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	GCCTGGTGGCTCTCTCTGCTGCTGAGGACCGAGTTCTGTTGTTGAA	[1100]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	[1100]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	[1100]
3_LTR_8.seq	CGAAAAGCTTCCCTCCGCGCCCTCCGACTCTTTTGCCTGCTTGTGAA	[1150]
5_LTR.seq	CGAAAAGCTTCCCTCCGCGCCCTCCGACTCTTTTGCCTGCTTGTGAA	[1150]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	CGAAAAGCTTCCCTCCGCGCCCTCCGACTCTTTTGCCTGCTTGTGAA	[1150]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	[1150]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	[1150]
3_LTR_8.seq	GACGCGGACGGGTCCGCTGTGTCTGA	[1200]
5_LTR.seq	GACGCGGACGGGTCCGCTGTGTCTGA	[1200]
Karlas 2010_AY953542 LTR-C	GACGCGGACGGGTCCGCTGTGTCTGA	[1200]
LTR-A_2002_Wilson_AF546883.1	[1200]
LTR-B_2002_Wilson_AF546884.1	[1200]
37bp	TTTTTGAATGATGGTTTGTAAAGCGGGGCTTTG	
21bp	CCAGGAGCGGGCTCTCGA	
24bp	AGTTTTAAATGACTGGTTTGA	
18bp	TTTTTAAATGATGGT	
	PervA and B	TTTTTAAATGATGGT
	PervC	TTTTTAAATGATGGT

Abbildung 8: Sequenzanalyse der PERV-LTR mit 3°- und 5°- Repeat sowie Referenzsequenzen.

Die Abbildung zeigt das Alignment der Sequenzdaten der LTR-Region von PERV mit einem 3°- und 5°-Repeat. Es wurden zudem Referenzsequenzen für die PERV-Subtypen A, B und C in die Analyse aufgenommen. Das Alignment wurde in MEGA5 mit Hilfe des MUSCLE-Algorithmus erstellt und modifiziert (Edgar 2004; Tamura et al. 2011). Die verschiedenen Repeat-Motive innerhalb der LTR-Region sind farblich gekennzeichnet. In das Alignment eingefügte Gaps sind durch eine horizontale Linie (-) gekennzeichnet.

3.1.2 Kultivierung und Selektion PERV-produzierender Zellen

Des Weiteren sollte eine PERV-infizierte Zelllinie identifiziert werden, welche virale Partikel in einer ausreichenden Menge produziert. Es sollte genug Virusmaterial für die IL-10-Analyse präpariert werden. Zur Auswahl von chronisch infizierten PERV-Zelllinien wurden fünf unterschiedliche kryokonservierte Aliquots aufgetaut und in der Zellkultur über mehrere Passagen kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wurden auf eine Mycoplasmenkontamination hin überprüft. Alle getesteten Zellkulturen wurden negativ für Mycoplasmen getestet (**Abbildung 9**).

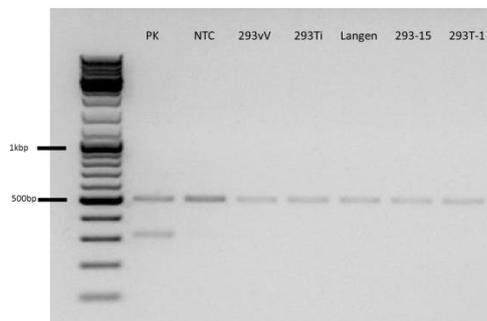


Abbildung 9: Detektion von *Mycoplasma* mittels PCR.

Der Überstand von fünf Zellkulturen wurde mittels PCR mit *Mycoplasma*-spezifischen Primern auf eine Kontamination hin überprüft. Die Abbildung zeigt die Auftrennung des PCR-Produktes durch ein 1,5%iges Agarosegel. Es wurden die PCR der Positivkontrolle (PK), der No-template-control (NTC) sowie der Zellkulturüberstände aufgetragen.

Der gesamte Überstand einer 300cm²-Zellkulturflasche wurde durch Filtrierung und Ultrazentrifugation über einen Saccharoselösung (2.2.3) gereinigt. Die im Überstand enthaltenen Partikel sind demnach 2000-fach konzentriert worden. Die Menge an p27 wurde mittels Western Blot-Analyse mit spezifischem Antikörper gegen das p27-Protein des PERV detektiert (2.2.19). Dadurch konnte indirekt die Menge viraler Partikel abgeschätzt werden. Nur eine der untersuchten infizierten Zellkulturen (Ansatz: 293vV) zeigte eine zufriedenstellende Virusexpression und wurde für weitergehende Versuche eingesetzt und zur Aufbewahrung in Aliquots kryokonserviert (Daten nicht gezeigt) (2.2.1). Zudem wurde die Integration des PERV-Provirus mittels PCR-Analyse anhand der *env*-Sequenz nachgewiesen (2.2.12) (**Abbildung 10**).

3.1.3 Isolierung von PERV aus Zellkulturen und Charakterisierung des Virus

Nach der Selektion PERV-produzierender Zellen erfolgte eine Charakterisierung des Virus, um für die anschließende IL-10-Analyse die Identität der Isolate zu bestätigen. Dazu wurde die virale Sequenz des Provirus anhand der PCR nachgewiesen (2.2.12). Zudem wurde die Produktion viraler Proteine durch die Western Blot-Analysen detektiert (2.2.19). Zwei der fünf PERV-infizierten Zelllinien wurden mittels PCR-Analyse untersucht (Ansätze: 293vV und 293Ti). Es wurde eine DNA-Extraktion aus Zellen durchgeführt und *env*- oder LTR-spezifische Primer verwendet, um die Integration des Provirus nachzuweisen (**Abbildung 10**). Beide Ansätze zeigten eine Bande auf Höhe der Positivkontrolle für das *env*-Gen. Für die LTR-Region konnte keine exklusive Bande nachgewiesen werden, sondern ca. sechs nahe beieinanderliegende Banden. Diese lagen in einem Bereich von 150-350 bp und zeigten Unterschiede in ihrer Intensität, welche jedoch stets geringer war als die Intensität der Positivkontrollen. Die kürzesten Banden verliefen auf Höhe der 3°-LTR-Positivkontrolle bei 170 bp. Die jeweils prominenteste Bande weist in beiden Infektionsansätzen eine

unterschiedliche Größe auf (ca. 250 bp für 293VV und 270 bp für 293Ti). Um zu überprüfen, ob die Einzelbanden das Ergebnis einer unspezifischen Amplifikation sind, wurde die Schmelztemperatur der Primer kontrolliert und die PCR mit einer höheren Annealing-Temperatur wiederholt, welche 1°C unter der primerspezifischen Schmelztemperatur lag (**Abbildung 11**) (2.2.12).

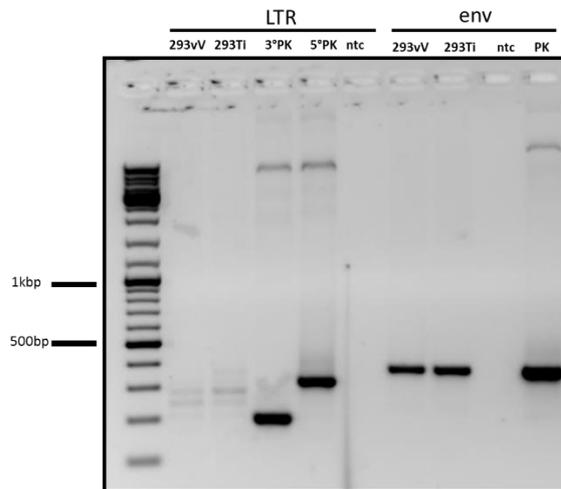


Abbildung 10: Charakterisierung der proviralen Elemente PERV-produzierender Zellen mittels PCR-Analyse.

Die Abbildung zeigt die Auftrennung von jeweils 10µL an PCR-Produkten mittels eines 1,5%igen Agarosegels. Es wurden nach einer DNA-Extraktion aus zwei PERV-infizierten Zellkulturen (**293vV** und **293Ti**) PCRs mit LTR- und *env*-spezifischen Primern durchgeführt. In der LTR-PCR wurden die Positivkontrollen der 3- und 5-Repeats (**3°**, **5°**) aufgetragen. (**ntc**) zeigt die No-template-control der PCR.

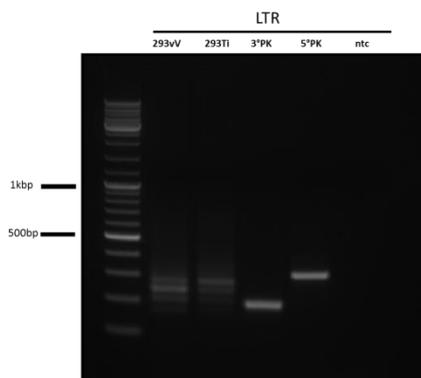


Abbildung 11: Charakterisierung der proviralen LTR-Sequenzen von PERV-produzierenden Zellen mittels PCR-Analyse.

Die Annealing-Temperatur der PCR wurde auf 1°C unterhalb der primerspezifischen Schmelztemperatur erhöht. (**ntc**) zeigt die No-template-control der PCR. **3°** und **5°** stellen die Positivkontrollen für die Repeats der LTR-Region dar.

Die Identität der einzelnen Fragmente der LTR-Region konnte nicht näher bestimmt werden. Hierzu müsste die DNA jeder Bande separat aus der Gelmatrix isoliert, kloniert und sequenziert werden.

Durch eine Ultrazentrifugation des Überstandes jeder Zelllinie einer 150 cm²-Flasche wurden virale Partikel konzentriert und gereinigt. Mittels Western Blot-Analyse konnte anhand spezifischer Antisera gegen das gp70, das Kapsidprotein p27 und gegen das Transmembranhüllprotein p15E von PERV die Bildung viraler Partikel nachgewiesen werden (**Abbildung 12**, **Abbildung 13**). Die PERV-Isolate unterschieden sich in ihrer Bandenintensität voneinander. Nach Verwendung des Gag-spezifischen Antikörpers (Ziege, Anti-Gag-PERV) wurden in Isolat 3 die höchste, in Isolat 2 die geringste Intensität beobachtet (**Abbildung 12 B**).

Für das gp70 wurden Banden bei 70 kDa detektiert (**Abbildung 12 A**). Für das p27-Gag-Protein wurde zudem das Vorläuferprotein bei 60 kDa detektiert. Diese Bande zeigte in allen Isolaten eine höhere Intensität als die p27-spezifische Bande. In Isolat 3 ließen sich hier weitere schwache Banden beobachten, welche zwischen den beiden spezifischen lagen (**Abbildung 12 B**). Die Bande des p15E-Proteins war in allen Isolaten stark ausgeprägt und zeigte eine diffuse Doppelbande (**Abbildung 12 C**). Mittels PCR konnte die Integration des PERV-Provirus in die produzierende Zelllinie nachgewiesen werden. Anhand der Western Blot-Analyse konnte demonstriert werden, dass alle hergestellten Isolate PERV-Proteine enthalten.

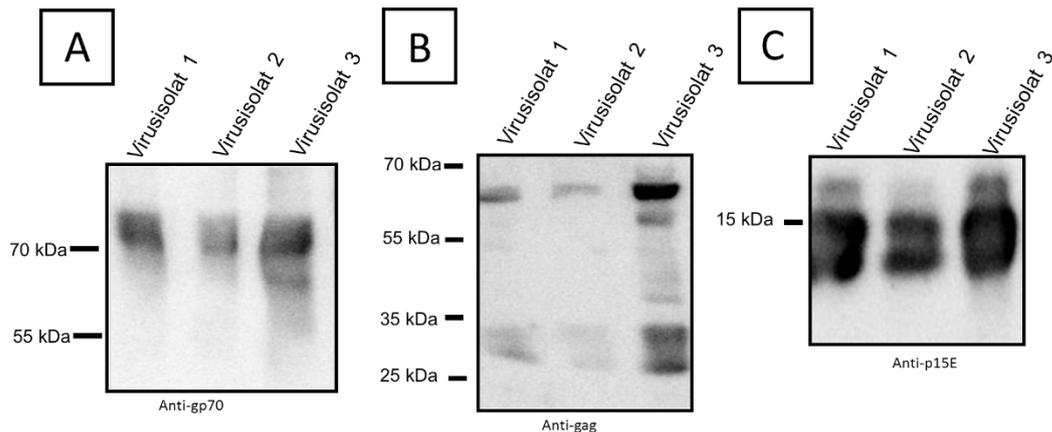


Abbildung 12: Charakterisierung der PERV-Isolate mittels Western Blot-Analyse.

Es wurden jeweils 10 µl der hergestellten PERV-Isolate auf das SDS-Gel aufgetragen. (A) Die Membran wurde mit Ziege Anti-gp70-Serum (Ziege 734) in einer Verdünnung von 1:500 bzw. (B) mit Ziege Anti-p27-Serum (Ziege 30) in einer Verdünnung von 1:100 oder mit (C) Ziege Anti-p15E-Serum (Ziege346) in einer Verdünnung von 1:300 inkubiert. Der HRP-konjugierte anti-Ziege Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet und die gebundenen Sekundärantikörper mittels ECL detektiert.

3.1.4 Präparation von PERV-Partikeln im großen Maßstab und Quantifizierung der Partikelzahl

PERV-Partikel produzierende Zellen wurden in 300 cm²-Flaschen mit jeweils 50 ml Nährmedium kultiviert. Durch Filtration und Zentrifugation konnten aus insgesamt 6 L Überstand eine 2000-fache Konzentrierung an PERV-Partikeln erreicht werden. Mittels Ponceau-Färbung konnte die Bandenintensität mit einer BSA-Verdünnungsreihe verglichen werden und somit die Anzahl an Viruspartikeln der Präparation abgeschätzt werden (**Abbildung 13**). Anschließend wurde die Identität der Bande anhand einer Western Blot-Analyse überprüft. Es wurde eine Bande auf der Höhe des Kapsid-Proteins bei ca. 27 kDa nach Ponceau-Färbung der Membran beobachtet (**Abbildung 13 A**). Die Bande wurde durch Anti-p27-Serum im Western Blot verifiziert (**Abbildung 13 B**). Im Gegensatz zu ihrer Bandenintensität nach Ponceau-Färbung (**Abbildung 13 A**) unterschieden sich beide p27-Banden in der Western Blot-Analyse in ihrer Intensität kaum voneinander (**Abbildung 13 B**).

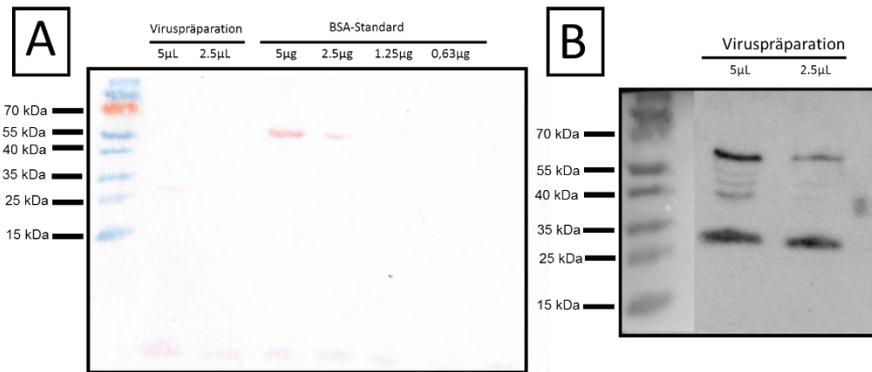


Abbildung 13: Nachweis und Quantifizierung der PERV-Präparationen mittels SDS-Gel- und Western Blot-Analyse.

(A) zeigt die Membran nach Ponceau-Färbung, in (B) ist nach Inkubation der Membran mit Anti-Gag-Serum und ECL-Detektion zudem eine Bande für das 60 kDa Vorläuferprotein zu erkennen.

Es konnten nach dem Transfer aus dem SDS-Gel mit Hilfe einer Coomassie-Färbung Proteine unspezifisch angefärbt und sichtbar gemacht werden, da diese nicht vollständig auf die Membran übertragen worden waren (**Abbildung 14**). Auch hier konnte durch einen Vergleich mit der Lysozym-Bande bekannter Konzentration die Proteinmenge geschätzt werden. Es wurde eine Menge von 200 ng/µl für das p15E-Protein und somit 13 ng/µl des PERV-Gag-Proteins geschätzt. Mittels Western-Blot Analyse wurden die Banden durch die Bindung des Anti-p27- und Anti-p15E-Antikörpers verifiziert (**Abbildung 12**).

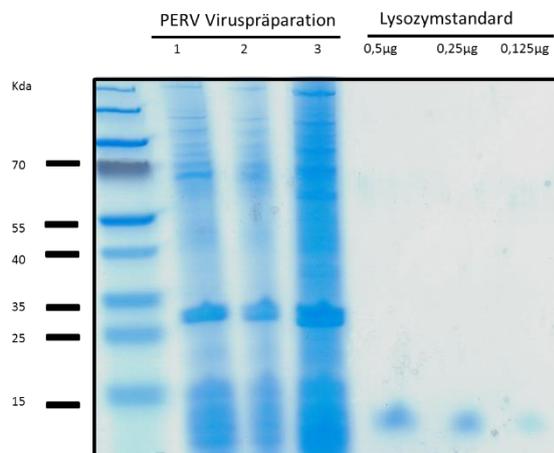


Abbildung 14: Quantifizierung viraler Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung.

Es wurden jeweils 20 µl der drei PERV-Viruspräparationen aufgetragen. Der Lysozymstandard zeigte eine Bande unterhalb der Höhe von 15 kDa. Diese war in ihrer Intensität konzentrationsabhängig.

3.1.5 Analyse zum Nachweis der IL-10 Freisetzung aus PBMCs

Bevor eine Testung der PERV-Isolate in der IL-10-Analyse erfolgte, war eine Überprüfung der Isolate auf eine mögliche Kontamination mit Endotoxin notwendig. Eine Endotoxinkontamination kann eine Freisetzung von IL-10 aus PBMCs bewirken und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen. In der Endotoxin- und IL-10-Analyse wurden mit jeweils 25 µl je Reaktion die gleichen maximalen Mengen an Virusmaterial eingesetzt, um die Aussagekraft der Daten in der IL-10-Analyse zu steigern. Die Endotoxin-Analyse wurde mittels EndoLISA-Testsystem durchgeführt (2.2.10). Da bekannt ist, dass gereinigte virale Partikel zur Aggregation neigen, wurden diese vor der Testung durch achtmaliges Frier-Tauen vereinzelt (2.2.11). Anhand der Endotoxin-Analyse konnte eine Kontamination der Proben mit Endotoxin in einer der drei Präparationen nachgewiesen werden. Die PERV-III-Präparation zeigte eine nicht-signifikante Endotoxinkontamination, die im Mittel über 0,5 EU/ml liegt. Diese

Präparation wurde dennoch nicht für eine IL-10-Analyse eingesetzt (**Abbildung 15**). Der Endotoxingehalt der Negativkontrolle (PBS *endofree*) lag unterhalb der LPS-Kontrolle mit 0,05 EU/ml, welche auch das Detektionslimit des Testsystems gemäß der Herstellerangaben darstellte.

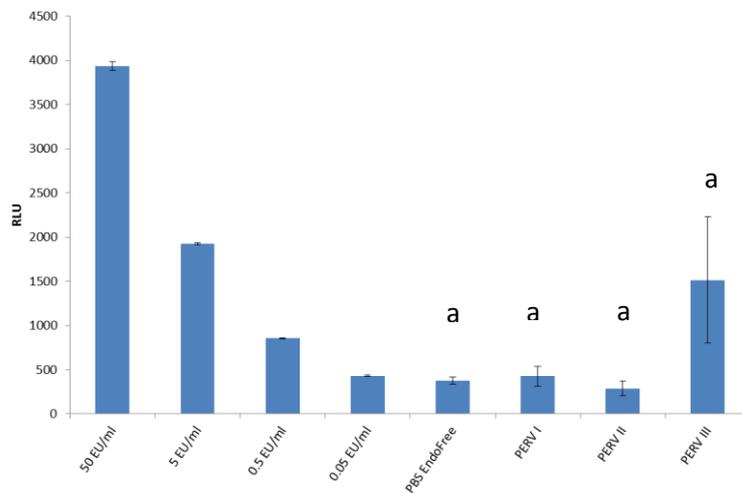


Abbildung 15: Analyse des Endotoxin-Gehalts der PERV-Präparationen.

LPS in unterschiedlichen Konzentrationen oder jeweils 25 µl an PERV-Isolate wurden gegen die relative Fluoreszenz in [RFU] aufgetragen. Die Präparationen **PERV-I** und **PERV-II** zeigten keine Kontamination durch Endotoxin und wurden für die IL-10-Analyse eingesetzt. **PERV-III**-Präparation zeigte eine Endotoxinkontamination. In dieser Messung war eine hohe Standardabweichung zu verzeichnen, so dass eine mögliche Kontamination in Bezug zur Kontrolle nicht signifikant (n.s.) war. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus einer zweifach-Bestimmung. Zwischen der Kontrolle (**PBS endofree**) und Isolat I, Isolat II und Isolat III besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,2047$; $p=0,3732$; $p=0,1077$) (zweiseitiger t-Test) (a=n.s.).

In der IL-10-Analyse wurden Messungen mit 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg und 0,63 µg an Virusmaterial, gemessen am p15E-Protein des PERV, durchgeführt (**Abbildung 16**). In der höchsten Konzentrationsstufe wurden somit $3,6 \cdot 10^9$ Partikel zu 40.000 PBMCs gegeben. Die Positivkontrollen des LPS zeigen eine konzentrationsabhängige Induktion. Für die höchste PERV-Konzentration konnte eine Freisetzung von 32 pg/ml an IL-10 gemessen werden. Die übrigen Versuche mit geringeren Konzentration an PERV-Präparationen zeigten eine Induktion im Bereich von 32 – 8 pg/ml. Die Zugabe gereinigter und konzentrierter PERV-Partikel führte in diesem Versuch zu einer geringen Freisetzung des Interleukin-10 aus PBMCs.

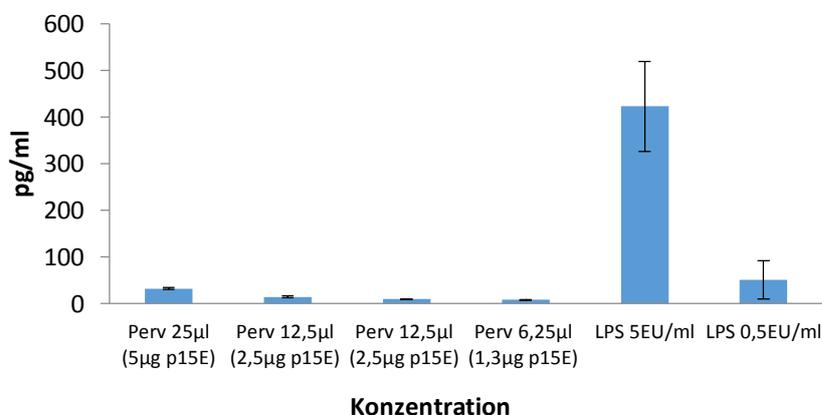


Abbildung 16: IL-10 Freisetzung aus PBMCs nach Inkubation mit PERV-Partikeln.

Es wurde ein Pool aus den PERV-Isolation I und II hergestellt. 25 µl, 12,5 µl und 6,25 µl PERV wurden je Well gegen die Konzentration des IL-10 in [pg/ml] aufgetragen. Zudem wurden die Positivkontrollen des LPS mit 5 EU/ml und 0,5 EU/ml aufgetragen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus einer 8-fach-Bestimmung.

3.2 MuLV-Präparation für den Einsatz in der IL-10-Analyse

3.2.1 Infektion von MFB-Zellen mit MuLV zur Isolierung viraler Partikel

Isolierte Virionen des MuLV sollten in einer IL-10-Analyse untersucht werden. Zur Isolierung von MuLV-Partikeln wurde eine Infektion von Mausfibroblasten (MFB) mit MuLV-B durchgeführt und der Überstand der seriellen Subkultur konzentriert. Zur Infektion wurden unterschiedliche Ansätze in 75 cm²-Zellkulturflaschen hergestellt (2.2.2). Um die Bedingungen zu optimieren, wurden die Zelldichte sowie der Virustiter und somit die *multiplicity of infection* (MOI) variiert. Es wurden Zelldichten von 100 % ($2,8 \cdot 10^6$ Zellen), 75 % ($2,1 \cdot 10^6$ Zellen) und 50 % ($1,4 \cdot 10^6$ Zellen) in 25 cm²-Flaschen eingesät. Die Infektionen erfolgten mit 50 µl, 100 µl oder 200 µl pro Flasche. Der eingesetzte Virusstock hatte einen Titer von $2,8 \cdot 10^4$ FFU/ml (*fluorescent focus forming units*). Die höchste eingesetzte Konzentration viraler Partikel lag damit bei $2,4 \cdot 10^3$ FFU/ml. Dies entsprach einer MOI im Bereich von 0,02 (200 µl; 50 %) bis 0,0025 (50 µl; 100 %) (2.2.2). Die Ansätze wurden über drei Passagen kultiviert. Im Lichtmikroskop ließen sich rund 24 Stunden nach Infektion zytotoxische Effekte beobachten. Es konnte aus Zelllysat MuLV-DNA aus einem Abschnitt der *env*-Sequenz per PCR nachgewiesen werden. Alle Ansätze zeigten eine Infektion der MFB mit MuLV. Anhand der PCR und der Western-Blot-Analyse konnte keine Unterschiede zwischen den Infektionsansätzen in Bezug auf die Menge an produzierten viralen Partikel festgestellt werden (**Abbildung 17**, **Abbildung 18**, **Abbildung 19**, **Abbildung 20**, **Abbildung 21**). Die Durchführung einer quantitativen DNA-Bestimmung der Provirusintegration mittels Real-time PCR war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Isolierung von MuLV aus Zellkulturen und Charakterisierung des Virus

In der Western Blot-Analyse unter Verwendung des PERV Anti-Gag-Serums zeigten sich sowohl in der Kontrolle als auch in allen MuLV-infizierten Zelllinien ein ähnliches Bandenmuster (**Abbildung 17**). Auf Höhe von 55 kDa waren in den infizierten Ansätzen zwei Banden zu sehen, welche in der Kontrolle mit nicht-infizierten Zellen nicht beobachtet werden konnten (**Abbildung 17**). Der Versuch wurde wiederholt (**Abbildung 18**).

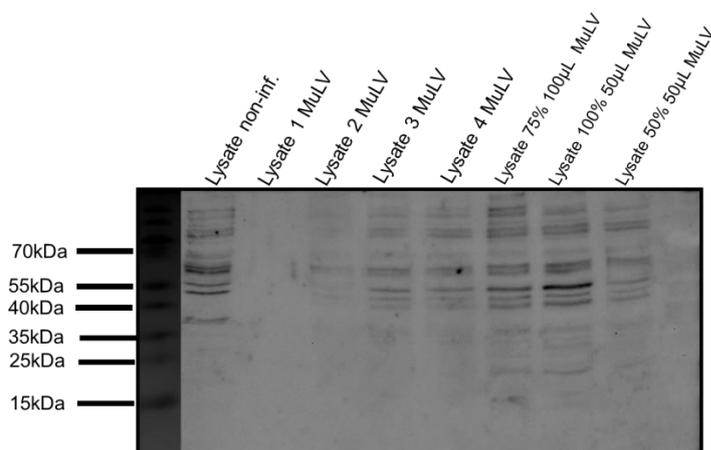


Abbildung 17: Nachweis des MuLV in MFB-Zelllysaten mittels Western Blot-Analyse.

Es wurden jeweils 15 µl Zelllysat jeder infizierten Zelllinie aufgetragen. Es wurde zudem das Lysat nicht-infizierter Zellen aufgetragen (**Lysate non-inf.**). Die Probenbezeichnung verwies auf die verwendete Menge an Zellen in [%] und die Menge an Virus in [µl] zum Zeitpunkt der Infektion. Aus 10^6 Zellen wurde 1 ml an Lysat hergestellt. Die Western-Blot Analyse wurde mit Ziegenserum (Ziege 30) gegen das PERV-Gag in einer Konzentration von 1:100 durchgeführt. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (anti-Ziege) wurde 1:2000 verwendet und mit Hilfe von ECL sichtbar gemacht.

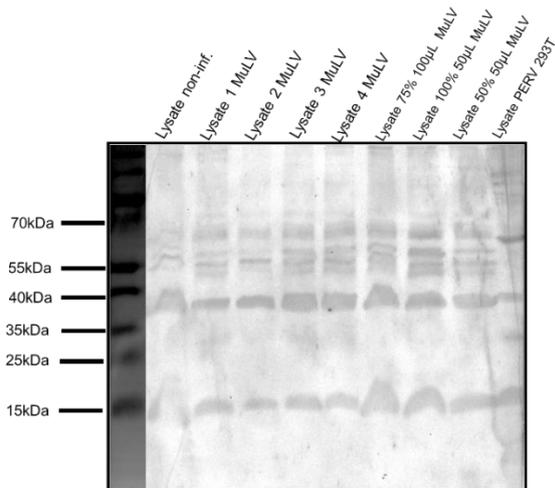


Abbildung 18: Nachweis von MuLV in MFB-Zellysaten mittels Western Blot-Analyse.

Es wurden jeweils 30 µl Lysat jeder Präparation aufgetragen. Es wurden zudem das Lysat nicht-infizierter MFB-Zellen aufgetragen (**Lysate non-inf.**), als auch das Lysat PERV-infizierter 293T-Zellen (**Lysate PERV 293T**). Die Probenbezeichnung verwies auf die verwendete Menge an Zellen in [%] und die Menge an Virus in [µl] zum Zeitpunkt der Infektion. Aus 10^6 Zellen wurde 1 ml an Lysat hergestellt. Der Western Blot wurde mit Ziegen Serum (Ziege 30) 1:100 gegen das PERV-Gag-Protein und mit HRP-gekoppeltem Anti-Ziege-Antikörper 1:2000 inkubiert und dieser mit Hilfe von ECL sichtbar gemacht.

In der Wiederholung der Western Blot-Analyse (**Abbildung 18**) konnte in der Positivkontrolle, dem Lysat PERV-infizierter HEK293T-Zellen, eine Bande auf Höhe von ca. 27 kDa nachgewiesen werden, was der Größe des PERV-Gag-Proteins entspricht. Das MuLV-spezifische Gag-Protein auf Höhe von 30 kDa konnte nicht nachgewiesen werden. Wie auch in der vorherigen Western Blot-Analyse (**Abbildung 17**) zeigten sich in den MFB-Lysaten unspezifische Banden. Die Lysate MuLV-infizierter Zellen zeigten im Gegensatz zur nicht-infizierten Kontrolle mehrere Banden im Bereich von 40-55 kDa. Die Membran dieses Western-Blots wurde in Stripping-Puffer reaktiviert und anschließend in Ziegen Serum gegen das PERV-p15E-Protein (Ziege 346) und gp70 (Ziege 734) des PERV inkubiert (**Abbildung 19**).

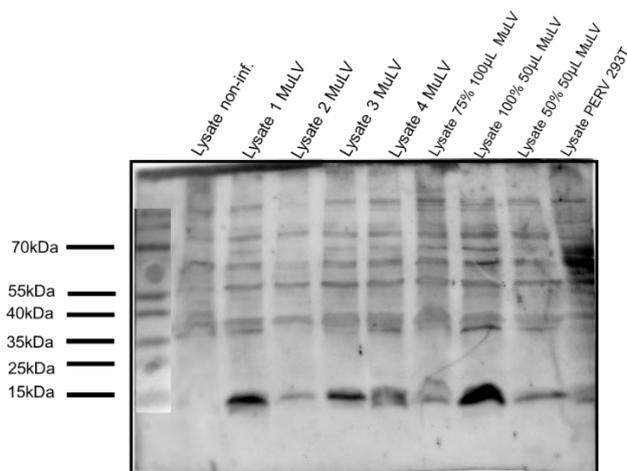


Abbildung 19: Nachweis des MuLV in MFB-Zellysaten mittels Western Blot-Analyse und PERV-Kontrolle.

Es wurden jeweils 30 µL Lysat jeder Präparation aufgetragen. Die Probenbezeichnung verwies auf die verwendete Menge an Zellen in [%] und die Menge an Virus in [µl] zum Zeitpunkt der Infektion. Es wurden zudem das Lysat nicht-infizierter MFB-Zellen aufgetragen (**Lysate non-inf.**), als auch das Lysat PERV-infizierter 293T-Zellen (**Lysate PERV 293T**). Der Western Blot wurde mit Ziegen Serum (Ziege 346) 1:300 gegen das PERV-p15E, Ziegen Serum (Ziege 734) 1:500 gegen das PERV-gp70 und mit HRP-gekoppeltem Anti-Ziege-Antikörper 1:2000 inkubiert und dieser mit Hilfe von ECL sichtbar gemacht.

Hier konnte gezeigt werden, dass der PERV-p15E-Antikörper kreuzreaktiv mit dem p15E-Protein des MuLV ist. In allen Infektionsansätzen, nicht jedoch in der Negativkontrolle (nicht-infizierter Zellen) konnte eine deutliche Bande auf der Höhe von 15 kDa beobachtet werden.

Da alle MFB-Zellkulturen nach Infektion mit MuLV zytotoxische Effekte, wie beispielsweise eine Lyse der Zellen zeigten, konnte eine Kontamination der Kulturen nicht ausgeschlossen werden. Die Infektion von MFB-Zellen mit MuLV wurde wiederholt (**Abbildung 20**).

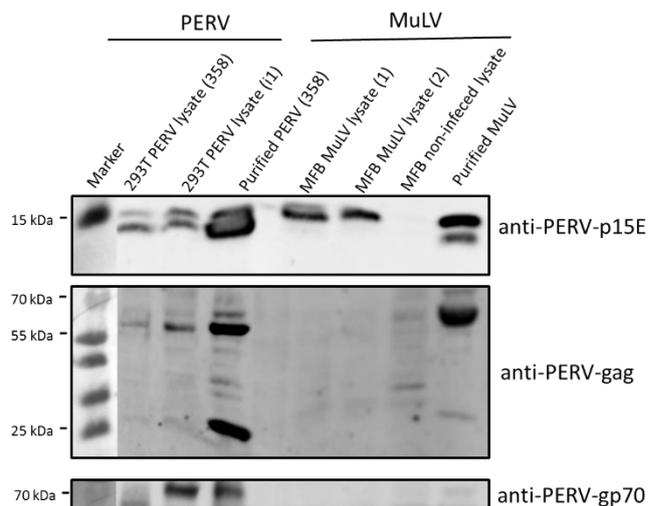


Abbildung 20: Nachweis und Vergleich von PERV und MuLV mittels Western Blot-Analyse.

Die Abbildung zeigt den Western Blot-Nachweis von PERV-Proteinen gewonnen aus HEK293T- und MuLV-Proteinen aus MFB-Zellen nach erneuter Infektion. Aus 10^6 Zellen wurde 1 ml an Lysat hergestellt. Die Ziegenserum gegen die PERV-Proteine wurden in folgenden Konzentration eingesetzt: Anti-PERV-p15E-Serum: 1:300, Anti-PERV-Gag-Serum: 1:100 und Anti-PERV-gp70-Serum 1:500. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 verwendet und anschließend mit ECL detektiert.

Auch in diesen Infektionsansätzen zeigte sich, dass das Ziegenserum gegen das PERV-p15E-Protein kreuzreaktiv mit dem entsprechen Antigen des MuLV ist. Es konnten spezifische Banden in den Lysaten aller PERV- und MuLV-infizierten Zellen detektiert werden. Die Banden lagen auf Höhe von 15 kDa. In den PERV-infizierten HEK293T-Zelllysaten, in gereinigten PERV- und MuLV-Isolaten ließen sich nahe-beieinanderliegende Doppelbanden beobachten. In MuLV-infizierten MFB-Zellen zeigte sich dagegen ausschließlich eine einzelne Bande bei 15 kDa. Die Doppelbande der MuLV-Präparation hatte ein geringeres Molekulargewicht als die Doppelbanden der PERV-Ansätze. Nicht-infizierte MFB-Zellen zeigten kein Signal. Nach Inkubation mit PERV-Anti-Gag-Serum konnten für die konzentrierte PERV-Präparation deutliche Banden auf Höhe von 25 kDa und über der 55 kDa-Bande des Markers beobachtet werden. Eine weitere Bande bei 60 kDa hatte eine geringere Intensität. In den beiden PERV-infizierten HEK293T-Lysaten konnte ausschließlich die Bande auf Höhe von 55 kDa detektiert werden. In den MFB-Lysaten waren keine Banden nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde für die konzentrierte MuLV-Präparation eine Bande über der 55 kDa-Marke detektiert. Eine weitere Bande mit geringer Intensität zeigte sich hier auch bei 30 kDa. Nach Verwendung des Ziegenserums gegen das PERV-gp70-Protein konnten in den PERV-Lysaten und der PERV-Isolation eine Bande bei 70 kDa beobachtet werden. In den Lysaten aller MuLV-infizierten MFB-Zellen, in der MuLV-Isolation und in den nicht-infizierten MFB-Zellen konnten keine Banden detektiert werden.

Das PERV-spezifische Serum gegen das p15E-Protein ist somit kreuzreaktiv mit dem p15E-Protein des MuLV, wohingegen das PERV-Anti-gp70-Serum nicht das entsprechende MuLV-Antigen bindet. Das PERV-Anti-Gag-Serum bindet insbesondere an das 60 kDa-

Vorläuferprotein des Kapsids von MuLV aus Virusisolaten, in MuLV-infizierten Zelllysaten war jedoch kein Signal zu beobachten.

Die Infektion mit MuLV konnte zudem durch eine PCR-Analyse nachgewiesen werden. Die Primer amplifizierten dazu einen 120 bp-großen Abschnitt der *env*-Sequenz des Provirus. Für nicht-infizierte MFB-Zellen wurden unspezifische Banden beobachtet. Alle Infektionsansätze wurden positiv auf die Integration getestet (**Abbildung 21**).

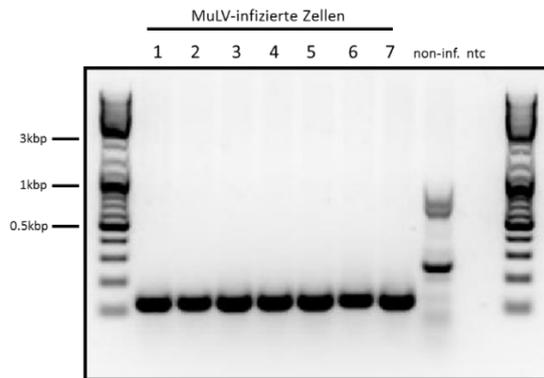


Abbildung 21: Nachweis der MuLV-Infektion mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese.

Es wurde eine PCR mit MuLV-*env*-spezifischen Primern nach einer Extraktion von DNA aus infizierten Zellen (1-7) durchgeführt. Es wurde die DNA nicht-infizierter Zellen (**non-inf.**) untersucht, sowie eine No-template-control (**ntc**) aufgetragen.

3.2.3 Nachweis mittels Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte die Infektion von MFB-Zellen mit MuLV anhand der Bildung des MuLV-Gag-Proteins nachgewiesen werden. Dazu wurden in einem ersten Experiment MFB-Zellen in Ibidi-Schalen kultiviert und anschließend infiziert (2.2.21). Dieser Versuchsansatz wurde verworfen, da die Zellen nach Infektion innerhalb von 48 Stunden abstarben. Zuvor infizierte Zellen wurden in Ibidi-Zellkulturschalen eingesät, dort fixiert und ein PERV-spezifisches Serum gegen das Kapsid-Protein zugegeben. Dieses soll kreuzreaktiv mit dem p30 des MuLV sein. Durch indirekte Immunfluoreszenz konnte mittels Confocal Laser Scanning Microscopy (cLSM) nach Bindung des Alexa-488 konjugierten Zweitantikörpers ein Unterschied in der Fluoreszenzintensität bei infizierten Zellen im Gegensatz zur Kontrolle nicht-infizierter Zellen beobachtet werden (**Abbildung 22**) (2.2.21). Dies zeigte sich jedoch nur bei wenigen Zellen. Das Fluoreszenzsignal ist dominant auf der Zelloberfläche infizierter MFB-Zellen lokalisiert.

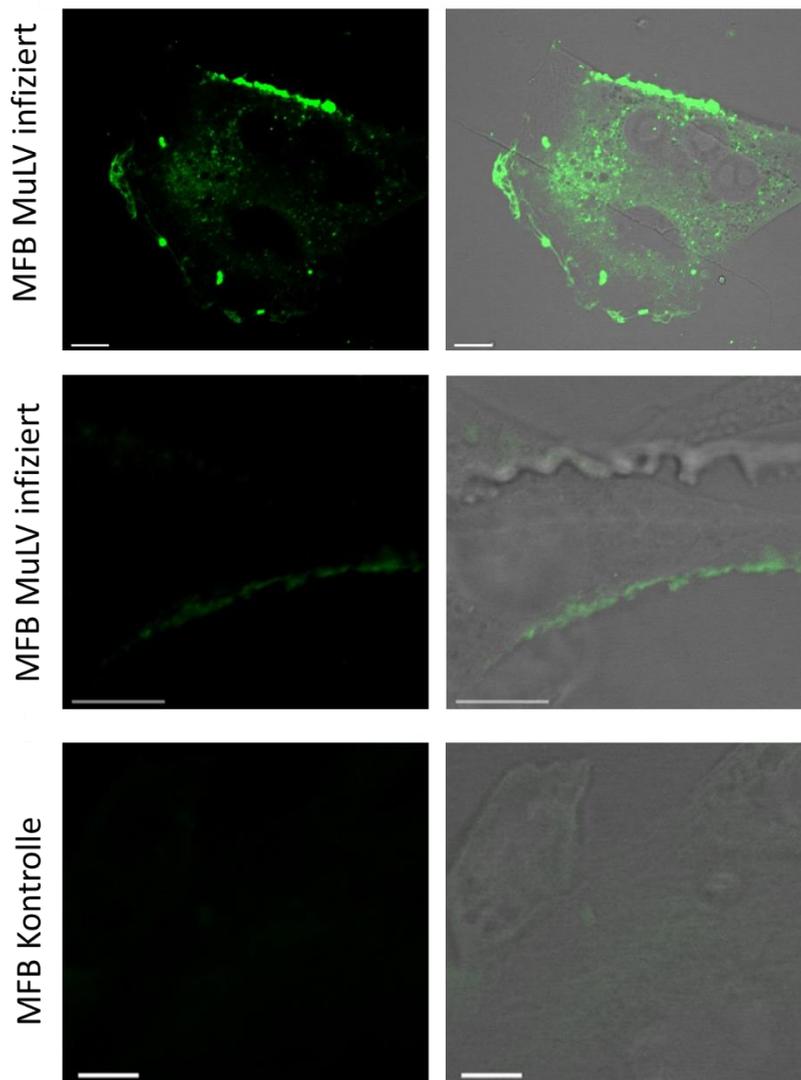


Abbildung 22: Nachweis der MuLV-Infektion über das MuLV-Gag-Protein mittels indirekter Immunfluoreszenz.

Es wurden eLSM-Aufnahmen der Immunfluoreszenz nach Inkubation von MuLV-infizierten MFB-Zellen mit PERV-spezifischen Antiserum gegen das Gag erstellt. In der linken Spalte sind jeweils Aufnahmen nach Fluoreszenzanregung zu sehen. Auf den Aufnahmen der rechten Spalte ist eine Überlagerung der Aufnahmen im Phasenkontrast und nach Fluoreszenzanregung dargestellt. Die mittlere Reihe zeigt eine Detailaufnahme einer infizierten Zelle. Die Kontrolle zeigt nicht-infizierte MFB-Zellen.

3.2.4 Testung der MuLV-Virusisolate auf IL-10-Freisetzung aus PBMCs

Gereinigte und konzentrierte MuLV-Partikel wurden zur Untersuchung einer IL-10-Induktion in PBMCs eingesetzt (**Abbildung 23**). Die höchste Konzentration an MuLV, versetzt mit dem TLR-4-Inhibitor TAK-242, diente als Negativkontrolle in Bezug auf eine Endotoxinkontamination. Es wurde eine konzentrationsabhängige Freisetzung von IL-10 aus PBMCs beobachtet. Die höchste Konzentrationsstufe führte zu einer IL-10-Konzentration von 1200 pg/ml. Die geringste Konzentration an IL-10 wurde durch Inkubation mit der geringsten Menge an Virusisolat (0,75 µl) gemessen und lag bei 714 pg/ml.

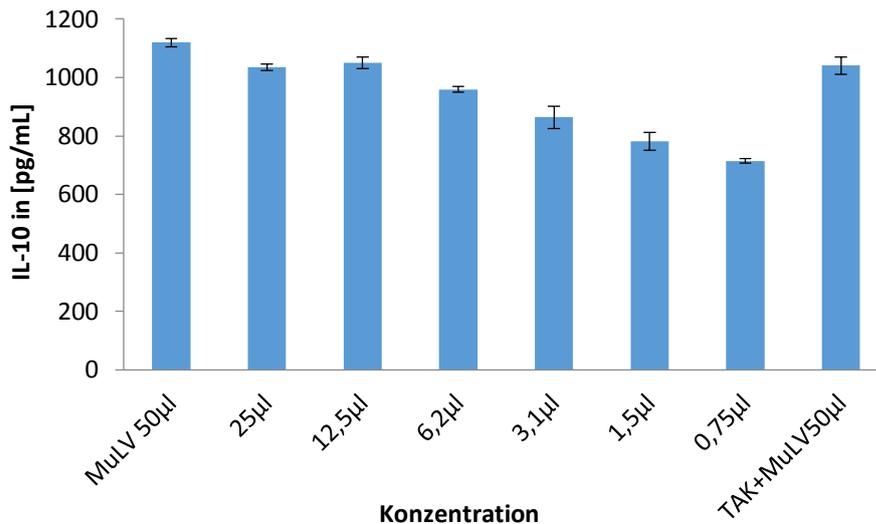


Abbildung 23: IL-10 Freisetzung aus PBMCs nach Inkubation mit MuLV-Partikeln.

MuLV-Isolate sind in Konzentrationsstufen von 50-0,75 µl Gesamtvolumen je 96-Well gegen die Konzentration des freigesetzten IL-10 in pg/ml aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde die höchste Konzentration an MuLV gewählt und diese mit TAK-242 (5 µM) versetzt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus einer 8-fach-Bestimmung.

3.3 Klonierung der PERV *env*-Sequenz

Ziel war die Klonierung der *env*-Sequenz aus PERV-infizierten Zellen zur Expression des Env-Proteins in humanen Zellen und weiteren Charakterisierung. Zu diesem Zweck sollten große Mengen an PERV-Oberflächenprotein hergestellt werden und eine Testung dieses Proteins unabhängig von der Isolierung viraler Partikel mittels IL-10-Analyse erfolgen. Weiterhin sollten Konstrukte untersucht werden, welche bereits die *env*-Sequenz trugen, jedoch nicht zur Expression in humanen Zellen gebracht werden konnten.

3.3.1 Klonierung der PERV *env*-Sequenz in den pTarget-Vektor

Drei bereits klonierten Plasmide, welche ein *env*-Insert enthalten, wurden in kompetente *E. coli* - Zellen transformiert und amplifiziert. Die *env*-Sequenz stammte aus einem Moleklarklon des PERV-A(42) (Krach *et al.* 2001). Durch Verdau der Plasmide und Gelelektrophorese konnten die Inserts nachgewiesen werden (**Abbildung 24**).

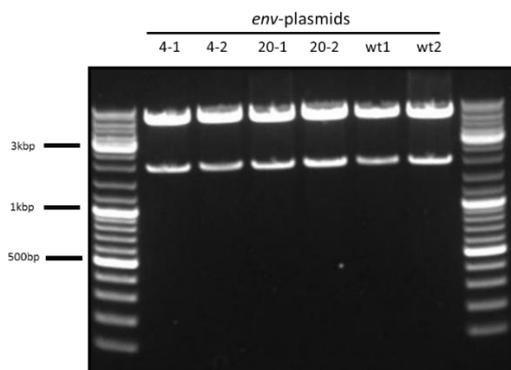


Abbildung 24: Restriktionsverdau der vorhandenen Plasmide mit *EcoRI*.

Es wurden jeweils 1 µg an Plasmid-DNA eingesetzt und anhand eines 1%igen Agarosegels separiert. Es wurden zwei Klone jeder Transformation aufgetragen. Alle Inserts wiesen die gleiche Größe von ca. 2 kbp auf.

Es wurde anschließend ein Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Not*I durchgeführt, um die Vollständigkeit der *multiple cloning site* (MCS) der Konstrukte und die Orientierung des Inserts im Vektor zu untersuchen (**Abbildung 25**) (2.2.14). Da sich hierdurch das Insert aus dem Vektor schneiden ließ, wurde nicht über das Enzym *Eco*RI kloniert. Die Schnittstelle von *Bam*HI liegt außerhalb der *Eco*RI-Schnittstelle, *Not*I schneidet im Insert. Alle Konstrukte zeigten das Insert in korrekter Orientierung.

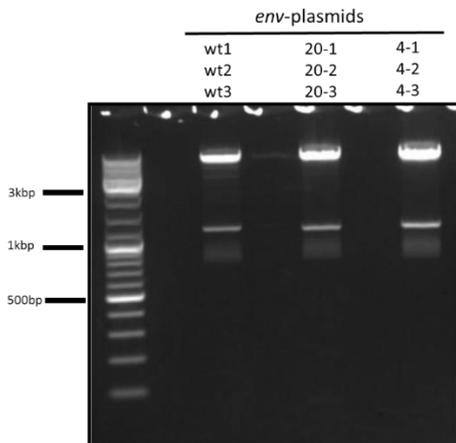


Abbildung 25: Überprüfung der Klonen mittels Restriktionsverdau durch *Bam*HI und *Not*I und Agarose-Gelelektrophorese.

Es wurde jeweils ein Pool der Plasmid-DNA der Klone (wt1-3, 4-1 – 4-3, 20-1 – 20-3) hergestellt und davon 1 µg auf ein 1%iges Gel aufgetragen. *Bam*HI und *Not*I sollten jeweils nur einmal im gesamten Konstrukt schneiden.

Mittels PCR und Sequenzierung wurden die Ergebnisse des Verdau bestätigt und die Orientierung des Inserts überprüft (**Abbildung 26**) (2.2.12). Mit Hilfe eines Primers, der an die T7-Promoter-Region des Vektors bindet sowie eines reversen Primers der an den pTarget-Vektor bindet, konnte ein rund 380 bp großes Sequenzstück amplifiziert werden (**Abbildung 26**).

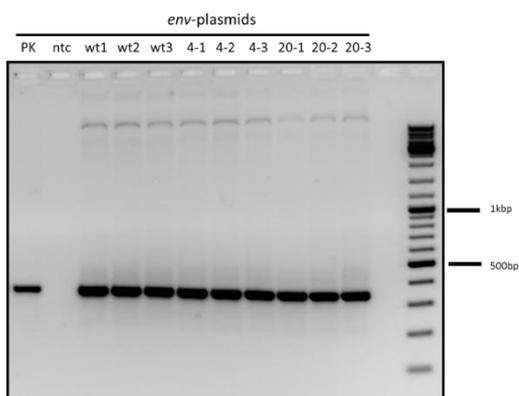


Abbildung 26: Nachweis der *env*-Sequenz in den amplifizierten Klonen mittels PCR-Analyse.

Es wurden 10 µl der PCR-Reaktionen aufgetragen, welches nach einer Plasmid-DNA-Extraktion und PCR mit *env*-spezifischen Primern gewonnen wurde. Es sind die Positivkontrolle (PK), No-template-control (ntc) sowie jeweils drei Klone aus jeder Transformation aufgetragen (wt1-3, 4-1 – 4-3, 20-1 – 20-3).

Die vollständige Sequenzierung des Inserts erfolgte mit vier weiteren Primer-Paaren (2.1.6). Alle Plasmide trugen das Insert in korrekter Orientierung. Mit Ausnahme der jeweiligen Modifikation ist die Sequenz der Konstrukte identisch zur ursprünglichen Sequenz des PERV-A/-C-Molekularklons, welche unter Accession-Nummer AJ133817 in NCBI GenBank abgelegt wurde (**Abbildung 27**). Im Alignment konnten keine Stopp-Codons identifiziert werden, welche

zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führen würden. Die ersten Sequenzierungen hatten eine geringe Qualität. Die Leselimits zeigten z.T. Werte geringer als 650 bp je Read an. Die Sequenzierung wurde wiederholt und es konnten Limits bis ca. 1200 bp je Read erreicht werden, welche die Bildung eines Contigs und damit die Sequenzierung des Inserts ermöglichten.

Die Expression der Plasmide in humanen Zellen war jedoch bereits in vorherigen Arbeiten nicht möglich. Um auszuschließen, dass der ursprünglich-verwendete Vektor (pTargetT) defekt ist, wurden die Plasmide erneut in einen pTargetT-Vektor kloniert.

Durch Verwendung einer Taq-Polymerase konnte durch eine PCR das Insert amplifiziert und Desoxyadenosin-Überhänge am 3'-Ende des PCR-Produkts generiert werden (**Abbildung 28**). Diese dienen zum TOPO-Klonieren in den pTargetT-Vektor. Nach der Ligation in den Vektor wurde dieser in kompetente Zymo JM 109-Zellen transformiert.

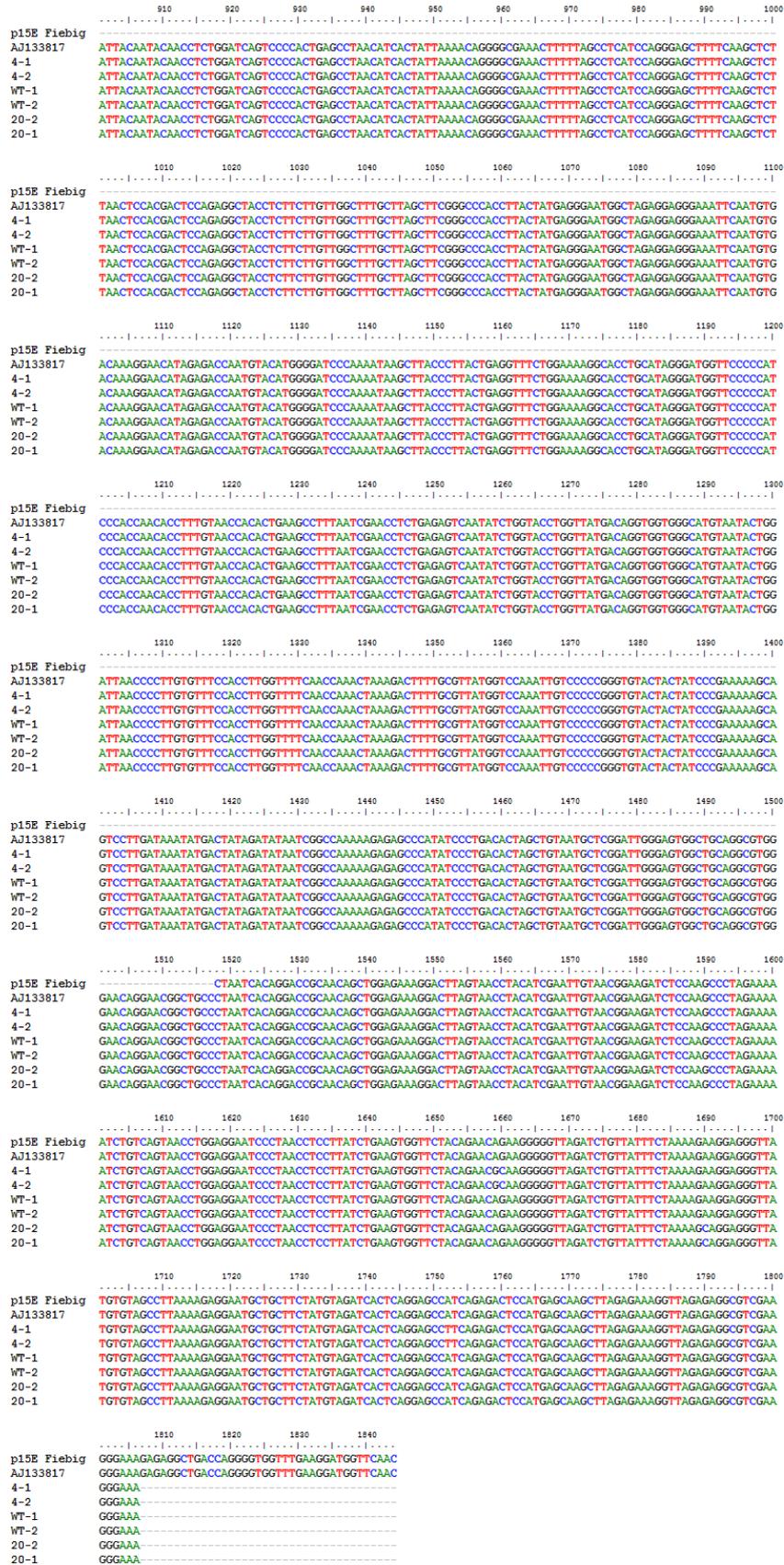


Abbildung 27: Alignment der Nukleotidsequenz der *env*-Inserts.

Das Alignment wurde mittels MEGA5 und implementierten MUSCLE-Algorithmus erstellt. Die graphische Auswertung erfolgte mittels BioEdit und GIMP (Hall 1999). Es wurden jeweils zwei Klone der Konstrukte 4 (Mutation R->A), 20 (Mutation E->A) und WT analysiert. Zudem wurden die Referenzsequenzen AJ133817 und die p15E-Sequenz nach FIEBIG *et al.* in das Alignment aufgenommen (Fiebig *et al.* 2003).

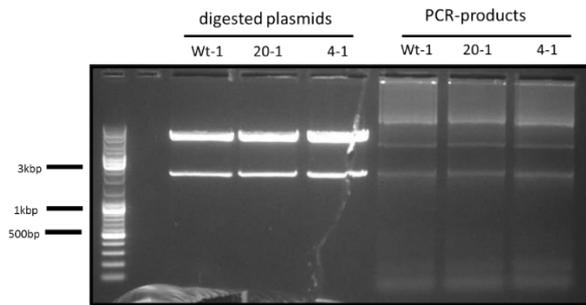


Abbildung 28: Amplifikation des Inserts mittels PCR zur Klonierung in den pTargetT-Vektor.

Es wurde jeweils ein Klon je Ansatz im 1%igen Gel untersucht. Dazu wurden im Falle des Restriktionsverdau 1 µg DNA verwendet und der gesamte PCR-Mix (50 µl) aufgetragen. Anhand des Restriktionsverdaues konnte die spezifische Bande der PCR-Produkte bestimmt werden, welche für die Klonierung ausgeschnitten und gereinigt werden sollte. Die Bande des Inserts wurde, sowohl in den restringierten Plasmiden als auch nach Amplifikation durch die PCR bei 2 kbp detektiert.

Die Überprüfung der Klonierung erfolgte durch einen Restriktionsverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden die positiven Klone amplifiziert, die Plasmid-DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut. Zuvor wurde ein virtueller Verdau des Konstruktes mittels SnapGene erstellt (**Abbildung 29 A**). Die Klone 2, 3 und 5 enthielten kein Insert. In den Klonen 1 und 4 konnte ein Insert von ca. 3 kbp nachgewiesen werden, welches damit nicht die zu erwartenden Größe von 680 bp, gemäß der Analyse *in silico*, hatte (**Abbildung 29 B**). Anhand eines Restriktionsverdaues konnte keine erfolgreiche Umklonierung in den pTargetT-Vektor nachgewiesen werden

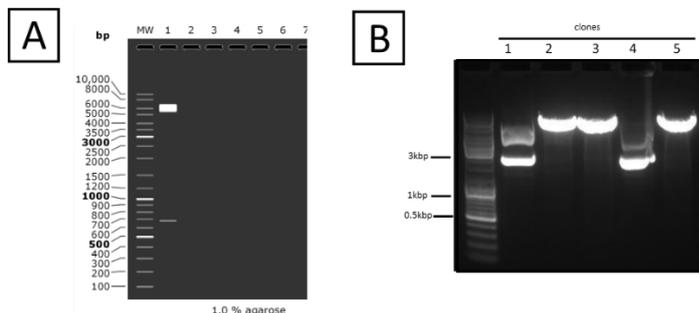


Abbildung 29: Überprüfung der Klonierung mittels Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese.

In **Abbildung (A)** ist der virtuelle Verdau dargestellt. In **(B)** ist der Verdau der Klone 1-5 des Konstruktes 4-1 nach Klonierung in den pTargetT-Vektor gezeigt. Es wurde in **(B)** 1 µg an DNA mit *Bam*HI verdaut und der gesamte Ansatz auf das Agarosegel aufgetragen.

3.3.2 Klonieren der *env*-Sequenz aus rezent-infizierten HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen sollten mit PERV infiziert werden (2.2.2). Das Provirus sowie die RNA der hiernach gebildeten Partikel sollten als Template für eine Klonierung der *env*-Sequenz dienen. Ziel war die Gewinnung einer funktionalen *env*-Sequenz zur Expression des p15E-Proteins. Es wurde angenommen, dass nach einer rezenten Infektion mit PERV integrierte Proviren nicht durch Mutationen während der Zellproliferation beeinträchtigt wurden. Zur Expression sollte der pcDNA-4-Vektor verwendet werden. Nach der Gewinnung viraler Partikel wurden diese mittels PCR und Western Blot-Analyse charakterisiert.

HEK293T-Zellen wurden per PCR-Analyse getestet und integrierte PERV-Proviren konnten somit vor der Infektion ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt) (2.2.12). Die Zellen wurden mit filtriertem Kulturüberstand von PERV-infizierten Zellen oder mit gereinigten viralen Partikeln (Ansätze: i1-i3) durch Spin-oculation (Ansätze: c1-c3) infiziert. Anhand einer PCR mit Primern für die *env*- und LTR-Regionen konnte nach einer Extraktion aus Zelllysat nach drei Tagen das PERV-Provirus in allen Ansätzen nachgewiesen werden (**Abbildung 30 A**). Das Ergebnis konnte vier Wochen später durch einen weitere PCR-Analyse nach 8

Zellpassagierungen bestätigt werden (**Abbildung 30 B**). Wie auch bei der Charakterisierung der PERV-infizierten Zellen, zeigte sich hier für die LTR-Region ein spezifisches Muster aus 5-6 Einzelbanden. Das Bandenmuster war in allen Infektionsansätzen das gleiche. Die kleinsten Banden verliefen bei 170 bp auf Höhe der 3°-LTR-Positivkontrolle. Die größten Banden lagen oberhalb der 5°-LTR-Positivkontrolle bei ca. 280 bp. Dabei zeigte sich eine Bande, welche deutlich mehr Intensität als alle anderen Banden aufwies.

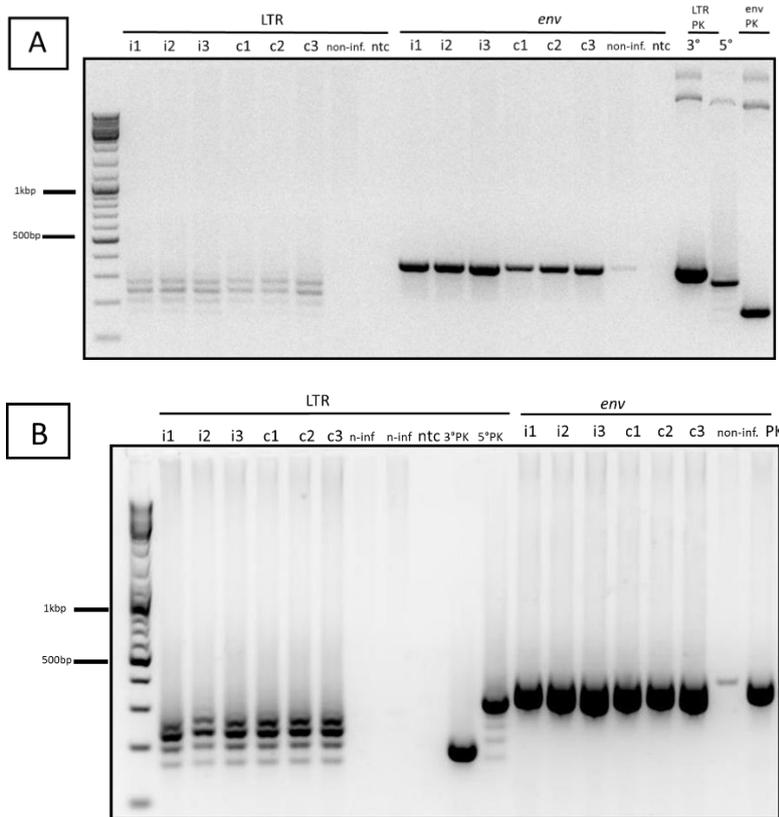


Abbildung 30: Charakterisierung des PERV in rezent-infizierter Zellen mittels PCR-Analyse.

Die Abbildung zeigt die Auftrennung von jeweils 10 µl an PCR-Produkten über ein 2%iges Agarosegel. Es wurden nach einer DNA-Extraktion aus sechs PERV-infizierten Zellkulturen (**i1, i2, i3, c1, c2, c3**) PCRs mit LTR- und *env*-spezifischen Primern durchgeführt. In der LTR-PCR wurden die Positivkontrollen des 3- und 5-Repeats (**3°, 5°**) aufgetragen. Zudem wurde die Positivkontrolle für *env* (**env PK**) aufgetragen. (**ntc**) zeigt die No-template-control der PCR. Es wurde zudem die DNA einer nicht-infizierten HEK293T-Zelllinie aufgetragen (**non-inf., n-inf**). (**A**) zeigt die PCR-Analyse zum Zeitpunkt der dritten Passage nach Infektion. In (**B**) wurden die Zellen über einen Zeitraum von 4 Wochen insgesamt achtmal passagiert und die PCR-Analyse erneut durchgeführt.

Die viralen Partikel in den Mediumüberständen der Zellkultur wurden für den Nachweis mittels Western Blot-Analyse durch Ultrazentrifugation auf das 2000 fache konzentriert. PERV-Proteine konnten anhand eines spezifischen Antikörpers gegen das PERV-Kapsidprotein p27 in allen Infektionsansätzen nachgewiesen werden. Die Western Blot-Analyse ergab, dass das p27 sowie das Vorläuferprotein bei 60 kDa sichtbar waren (**Abbildung 31 A**). In den Infektionsansätzen ist eine schwache Bande bei 15 kDa zu erkennen; in den Negativkontrollen sind diese Banden deutlicher sichtbar. Die schwache Ausprägung der Bande bei ca. 27 kDa in den Ansätzen i3 und c1 ist auf eine Luftblase beim Blotting zurückzuführen. Es wurden zwei Konzentrationen an Virusisolat in der Western Blot-Analyse auf das Gel aufgetragen (**Abbildung 31 B**). Somit sollte geschätzt werden, welche der Infektionsansätze über eine ausreichende Virusproduktion verfügt.

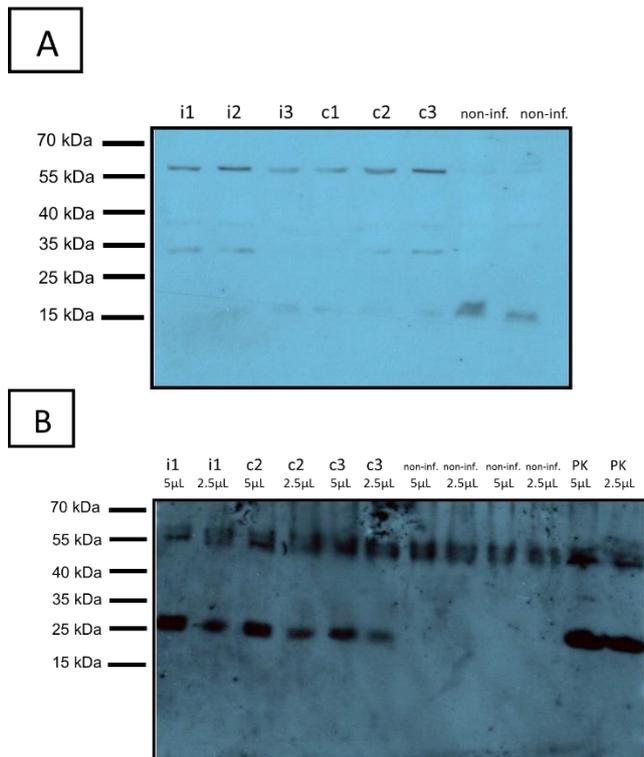


Abbildung 31: Nachweis und Vergleich der PERV-Produktion mittels Western Blot-Analyse.

Es wurden PERV-Isolate auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mittels Serum gegen das PERV-p27 (Ziege 30) in einer Konzentration von 1:800 behandelt. Der HRP-konjugierte Zweitantikörper gegen Ziege wurde in einer Konzentration von 1:10000 verwendet und mittels ECL detektiert. In (A) wurden jeweils 10 µl aller Infektionsansätze aufgetragen. In (B) wurden nur die Infektionsansätze **i1**, **c2** und **c3** aufgetragen, sowie die Positivkontrolle (**PK**) aus bereits infizierten Zellen. Die Negativkontrolle (**non-inf.**) wurde aus nicht-infizierten HEK293T-Zellen gewonnen. Es wurden in (B) jeweils 5 µl und 2.5 µl jedes Ansatzes auf das Gel aufgetragen. Es wurden nur die Ansätze ausgewählt, welche auch in (A) ein Signal zeigten.

Für die Klonierung in den pcDNA-4-Vektor wurden Primer erstellt, welche das vollständige *env*-Gen umfassten. Ein weiteres Primerpaar amplifizierte das *env*, jedoch ohne die Transmembrandomäne (Δ TM). Zur Klonierung in den pcDNA-4-Vektor enthielten die Primer eine *NheI*- und *NotI*-Schnittstelle. Mit Hilfe der Pfu-Polymerase sollte die *env*-Sequenz mit geringer Fehlerrate amplifiziert werden (2.2.12). Im Gel konnten jedoch keine spezifischen Banden beobachtet werden. Die Reaktionsbedingungen waren bei einer Annealingtemperatur im Bereich der T_M der Primer zu stringent, so dass keine Amplifikation erfolgte. Bei niedrigeren Temperaturen wurden unspezifische PCR-Fragmente amplifiziert (**Abbildung 32**).

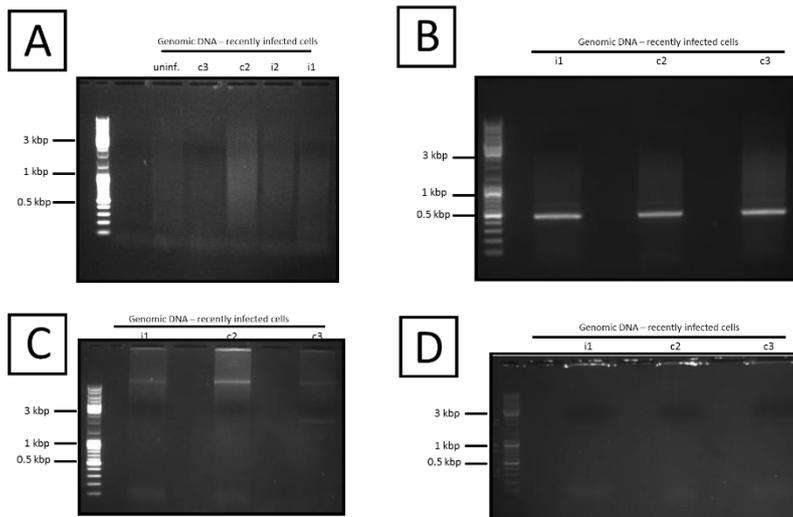


Abbildung 32: Amplifikation der *env*-Sequenz aus rezent-infizierten Zellen, Template: genomische DNA PERV-infizierter HEK293T-Zellen.

Es sind präparative Gele nach Amplifikation der *env*-Sequenz zur Klonierung dargestellt. In (A) und (D) sind keine Banden zu beobachten. In (B) und (C) wurden unspezifische Banden erhalten, welche bei 500 bp (B) oder bei 3 kbp bzw. >5kbp (C) lagen.

Um virale RNA als Template für die PCR verwenden zu können, wurden Viruspartikel durch Ultrazentrifugation gereinigt und dadurch konzentriert. Aus dem PERV-Isolat wurde eine RNA-Extraktion durchgeführt (2.2.6). Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase wurde mit den erstellten Klonierungsprimern (Δ TM) eine Transkription in cDNA durchgeführt (2.2.6). Die cDNA diente als Matrize für die Amplifikation des *env* mittels Pfu-Polymerase. Aus drei von vier unterschiedlichen Infektionsansätzen konnten aus dem Gel die DNA aus Banden der entsprechenden Größe präpariert werden (Abbildung 33) (2.2.13). Dabei zeigten sich für den Ansatz i2 eine nahe beieinanderliegende Doppelbande. Beide Banden wurden in diesem Fall aus dem Gel aufgereinigt (Abbildung 33).

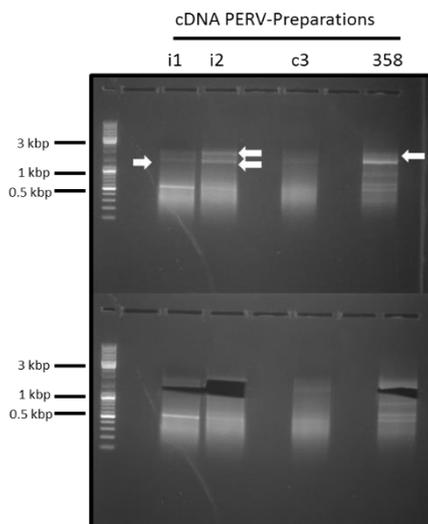


Abbildung 33: Amplifikation der *env*-Sequenz aus rezent-infizierten Zellen, Template: RNA aus Virusisolation, cDNA.

Es wurde das *env*-Fragment ohne dessen Transmembrandomäne aus cDNA amplifiziert und im 1%igen präparativen Agarosegel separiert. Es ist das Gel vor und nach der DNA-Extraktion dargestellt. Pfeile zeigen die präparierten Banden.

Es wurde zudem eine Sequenzierung der Fragmente mit Hilfe der Klonierungsprimer durchgeführt, um einen ersten Hinweis auf die Identität der Banden zu erhalten (2.2.8). Dazu wurden 15 ng an Template-DNA eingesetzt. Es konnte nur eine geringe Qualität der Reads in

der Sequenzierung erreicht werden. Dennoch konnten alle Fragmente mittels lokalem Alignment (NCBI blastn; Megablast) der *env*-Region von PERV zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt) (2.2.24).

Um eine ausreichende Menge an DNA für die Klonierung zu erhalten, wurde die gewonnene DNA zwei weitere Male als Matrize in einer PCR mittels Pfu-Polymerase eingesetzt. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Agarosegel geschnitten, und die DNA wurde gereinigt. Die Amplifikation wurde wiederholt und es konnte genügend DNA für jeweils einen Klonierungsansatz gewonnen werden. Insert und Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *NotI* über Nacht verdaut und ligiert (2.2.15). Es wurden dazu 240 ng an Insert-DNA und 200 ng an pcDNA4-Vektor-DNA eingesetzt.

Es wurden die Ansätze c2-unten, c2-oben, i1 und 358 in DH5 α -Zellen transformiert (2.2.16). Nach der Transformation wurden 40 Klone mittels Restriktionsverdau untersucht (2.2.14). Das Insert sollte durch den Verdau mit *NheI* und *NotI* als Bande auf Höhe von 2300 bp im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Keiner der Klone enthielt das Insert (**Abbildung 34**).

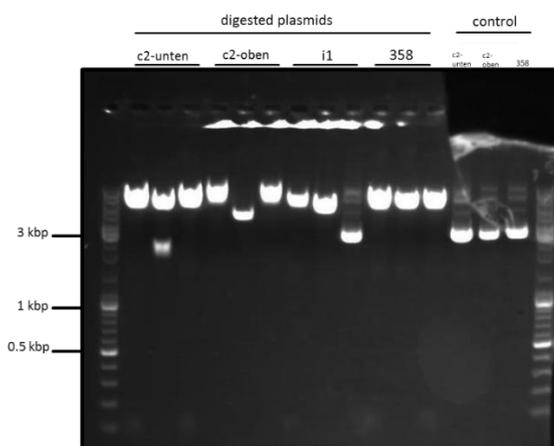


Abbildung 34: Screening nach positiven Klonen nach einem Restriktionsverdau.

Die Abbildung zeigt ein exemplarisches Gel, dass für die Analyse der Klone eingesetzt wurde, welche das Insert der klonierten *env*-Sequenz enthalten sollten. In den Spuren (**control**) wurde unverdaute DNA zur Kontrolle aufgetragen, die übrigen Spuren enthielten *NotI* und *NheI*-verdaute DNA.

3.4 Expression des PERV-p15E-Proteins in HEK293T-Zellen

3.4.1 Design eines synthetischen Konstruktes zur Sekretion des PERV-p15E-Proteins

Die Sekretion des p15E-Proteins von PERV sollte durch eukaryotische Zellen realisiert werden. Die Expression des Proteins in eukaryotischen Zellen hat Vorteile gegenüber der rekombinanten Expression in *E.coli*. Eine korrekte Glykosylierung bzw. weitere Modifizierungen des exprimierten Proteins werden erreicht. Weiterhin enthalten HEK293T-Zellen kein Endotoxin, wie es nach einer Expression in bakteriellen Zellen zu erwarten wäre. Die Expression in humanen Zellen birgt auch Nachteile, welche vorrangig die Expressionseffizienz betreffen. Nach einer transienten Transfektion der Zellen tritt während der Propagation ein Verdünnungseffekt der eingebrachten DNA auf. Zudem werden vermutlich Zellen selektiert, welche das Konstrukt nicht exprimieren. Weiterhin ist die Transfektionseffizienz der Zellen gering. Auch die aus Bakterien gewonnene und zur Transfektion eingesetzte Plasmid-DNA kann Endotoxin enthalten.

Ziel der Arbeit war es, eine ausreichende Menge an endotoxinfreiem PERV-p15E-Protein herzustellen, um dieses in einer Analyse auf IL-10-Induktion aus PBMCs zu testen. Da vorhergehende Strategien zur Klonierung und Expression in eukaryotischen Zellen in dieser Arbeitsgruppe und auch in dieser Arbeit nicht erfolgreich waren, wurde das Konstrukt

kommerziell über eine Gensynthese hergestellt (**Abbildung 35**). Das pOUT-Konstrukt mit dem p15E-Insert hat eine Länge von 468 bp. Der Vektor ohne die p15E-DNA-Sequenz stellt den designten Expressionsvektor pOUT dar (**Abbildung 36**).

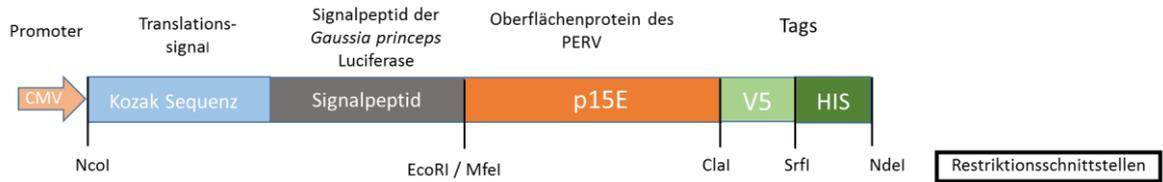


Abbildung 35: Schematische Darstellung der DNA-Abschnitte des synthetischen Konstruktes zur Expression und Sekretion des p15E-Proteins von PERV.

Die Größe der einzelnen Module in der schematischen Übersicht entspricht nicht der Länge der Nukleotidsequenz im pOUT-Konstrukt. Es sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme angezeigt. **CMV** zeigt den starken konstitutiven Promoter des Cytomegalievirus. Die **Kozak Sequenz**, ein Nukleinsäure-Konsensusmotiv, ist für den Translationsstart am Ribosom bedeutend. **V5** beschreibt das C-terminale V5-Epitop, **HIS** stellt den Hexa-HIS-Tag dar.

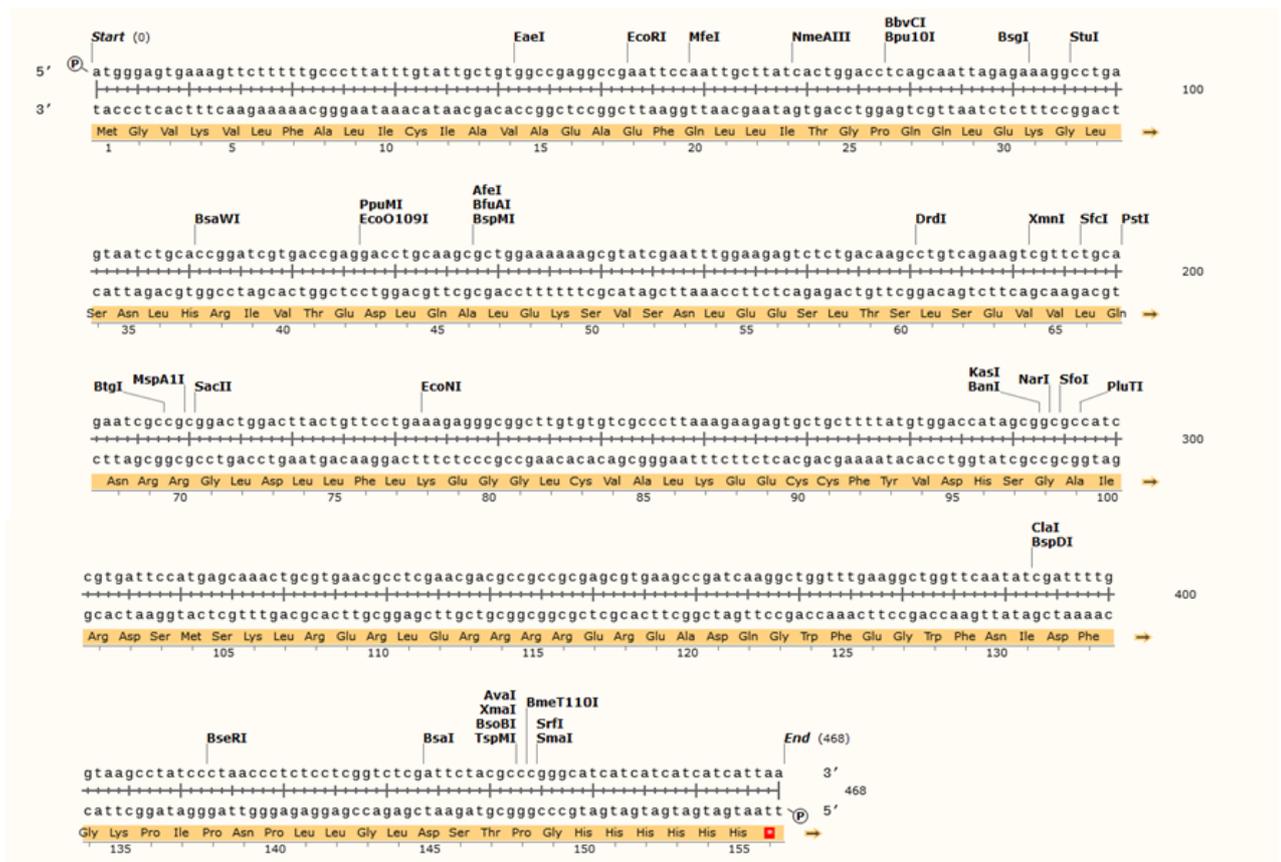


Abbildung 36: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des pOUT-Konstruktes.

Die Abbildung zeigt die Nukleotidsequenz des pOUT in *sense*- und *antisense*-Orientierung sowie die Aminosäuresequenz am ersten Methionin bei Translationsstart bis zum ersten Stop-Codon. Es sind zudem alle Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, welche einmalig im Konstrukt schneiden. Die Grafik wurde mittels SnapGene® viewer erstellt.

Das Konstrukt ist modular aufgebaut. Durch die Restriktionsschnittstellen können das zu exprimierende Protein, das Signalpeptid oder der Tag entfernt oder durch andere Sequenzen ersetzt werden. Durch den C-terminale V5-Tag sollte ein Nachweis des Proteins unabhängig

von einem spezifischen Antikörper realisiert werden. Der Hexa-HIS-Tag ermöglicht eine effiziente Reinigung des exprimierten Proteins. Das Signalpeptid hat eine Länge von 17 Aminosäuren. Es entstammt der *Gaussia princeps*, einem marinen *Crustaceae* der Tiefsee. In diesem Organismus ist das Signalpeptid für die Sekretion eines Luciferase-Gens verantwortlich. Dieses Signalpeptid zeigte in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien im Vergleich mit anderen Signalpeptiden die stärkste bekannte Sekretion eines rekombinanten Proteins (Stern *et al.* 2007). Das pOUT wurde zudem Codon-optimiert.

3.4.2 Klonierung der Expressionskassette in den Modellvektor der Firma ATG:biosynthetics

Zur Expression des synthetisierten Konstruktes wurde der Modellvektor pA4E211-FlexTEC tANCHORbase-mCherry der Firma ATG:biosynthetics gewählt. Es wurden somit 200 ng des Vektors und 86 ng an Insert eingesetzt (2.2.14). Der Verdau von Vektor und Insert mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NdeI* wurde über Nacht durchgeführt (2.2.15). Nach Ligation wurde die Aufnahme des Inserts durch einen Restriktionsverdau überprüft (**Abbildung 37**). Dazu wurde die aus einer Miniprep gewonnene plasmidäre DNA mit *NcoI* und *NdeI* verdaut. Das Insert der Klone war im Agarosegel als Bande zu erkennen. Um eine hohe Menge an Plasmid zur Transfektion von HEK293T-Zellen zu gewinnen, wurden die Klone 1, 2 und 3 für eine Maxiprep eingesetzt (2.2.9).

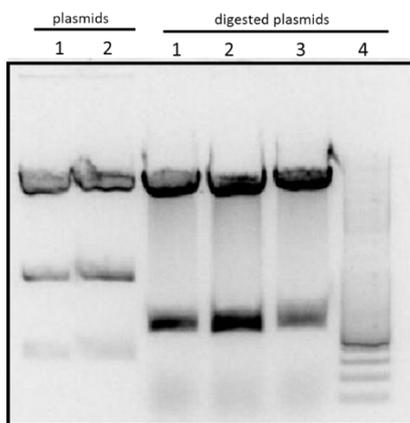


Abbildung 37: Verdau der pOUT-Klone mit *NcoI* und *NdeI*.

Aus einer Miniprep gewonnene plasmidäre DNA wurde verdaut (jeweils 1 µg) und auf das 1%ige Gel aufgetragen, die Klone 1, 2 und 3 wurden in einer Maxiprep eingesetzt. Zudem wurden die Plasmide (1,2) unverdaut aufgetragen.

3.4.3 Transiente Expression in HEK293T-Zellen, Aufreinigung und Nachweis

HEK293T-Zellen wurden mit zwei Konzentrationen (3 µg und 6 µg) an Plasmid-DNA des pOUT-p15E-Klon 1 durch Lipofektion (Metafectene®Pro) transfiziert und in serumfreiem Medium kultiviert (2.2.17). Mit Hilfe magnetischer *beads* (Dynabeads) wurde das sekretierte p15E-Protein durch den HIS-Tag konzentriert und gereinigt (2.2.20). Es wurde hierzu 1 ml, 2 ml und 5 ml an Überstand eingesetzt und Zelllysate hergestellt.

Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Bereits auf der Ponceau-gefärbten Membran konnte bei 15 kDa eine Bande in den Proteinextrakten aus Zellen beobachtet werden (**Abbildung 38**). Um die Identität des exprimierten bzw. sekretierten Proteins zu bestimmen, wurden sowohl ein V5-Antikörper als auch ein PERV spezifischer Ziege Anti-p15E-Antikörper eingesetzt. Die Detektion mittels V5-Antikörper zeigte für das sekretierte p15E-Protein eine konzentrationsabhängige Bandenintensität: die Bande mit der geringsten Signalintensität zeigte sich bei Verwendung des Äquivalents von 150 µl aufgetragenen Überstandes. Die signalintensivste Bande wurde bei der Verwendung des Äquivalents von 750 µl an Überstand beobachtet. Für Zelllysate konnte die höchste

Signalintensität beobachtet werden. Das sekretierte und das aus Zelllysaten gewonnene p15E-Protein unterschieden sich in ihrer Größe nicht voneinander.

Der Anti-V5-Antikörper wurde durch den Stripping-Puffer vom Protein abgelöst, so dass dieser keine HRP-Reaktion mit dem ECL-Substrat verursachen konnte (2.2.19). Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Anti-V5-Antikörpers konnte nach Zugabe des p15E-Antikörpers nur ein schwaches Signal im 750 µl-konzentriertem Überstand, sowie eine deutliche Bande für das Zelllysate gezeigt werden. Die übrigen geringeren Konzentrationen zeigten keine Banden. Zur Kontrolle wurde das Lysat nicht-transfizierter HEK293T-Zellen aufgetragen.

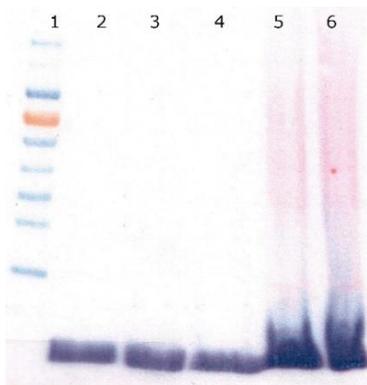


Abbildung 38: Ponceau-Färbung der Membran mit Proteinextrakten nach Transfektion mit dem generierten Vektor pOUT-p15E.

Die Ponceau-gefärbten Membran zeigt den Marker (Spur 1), die HIS-Tag konzentrierten Proteine gewonnen aus 150 µl (2), 300 µl (3) und 750 µl (4) an Zellkulturüberstand sowie Zellextrakte (5, 6), die im Acrylamidgel aufgetragen wurden.

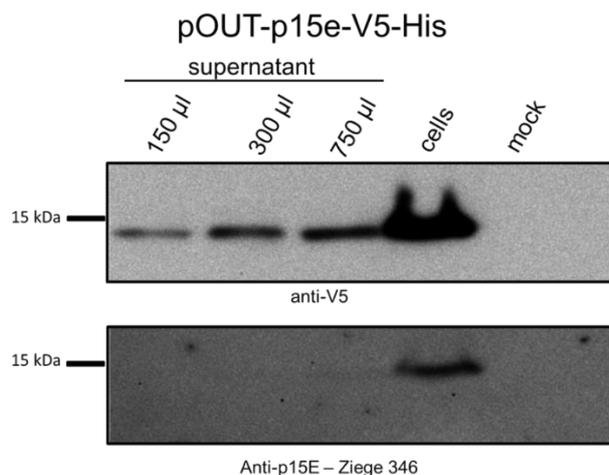


Abbildung 39: Western Blot-Analyse des p15E-Proteins nach der transienten Transfektion mit dem Vektor pOUT-p15E.

Es wurden die über den HIS-Tag konzentrierten Proteine, gewonnen aus den Äquivalenten 150 µl, 300 µl und 750 µl an Überstand, aufgetragen. Die Kontrolle (**mock**) enthält das Lysat nicht-transfizierter HEK293T-Zellen. Es wurden ebenso 100 µl Zelllysate aus 10^6 Zellen hergestellt und diese in einer 20x und 40x-Verdünnung aufgetragen. Der Blot wurde mit einem HRP-gekoppeltem Anti-V5-Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 inkubiert. Nach der Inkubation mit Stripping-Puffer wurde das Ziegen Serum (Ziege 346) gegen das PERV-Gag in einer Konzentration von 1:300 verwendet. Anschließend wurde die Membran mit HRP-gekoppeltem Anti-Ziege-Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 inkubiert und mittels ECL detektiert.

3.4.4 Test des sekretierten p15E-Proteins auf IL-10-Freisetzung aus PBMCs

Transfizierte HEK293T-Zellen mit dem pOUT-p15E und PBMCs wurden kokultiviert. Anschließend wurde eine IL-10-Analyse durchgeführt (**Abbildung 40**). Dabei zeigten die PBMCs des Spenders 1 und des Spenders 2 eine im Bezug zur jeweiligen Kontrolle sehr

signifikante ($p < 0,005$) Konzentration an freigesetztem IL-10. Die IL-10-Freisetzung aus PBMCs des Spenders 3 war deutlich geringer und zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. In der Negativkontrolle wurden PBMCs mit Leervektor-transfizierten HEK293T-Zellen kokultiviert.

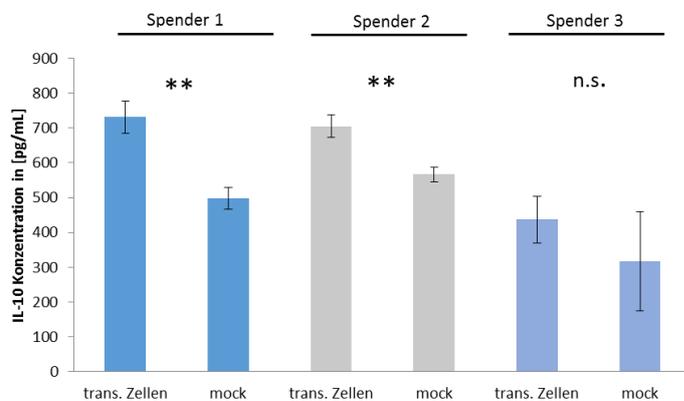


Abbildung 40: IL-10-Freisetzung aus PBMCs nach Kokultivierung mit pOUT-p15E transfizierten HEK293T-Zellen.

Es ist die IL-10-Konzentration in [pg/ml] der PBMCs dreier Spender nach Kokultivierung mit pOUT-p15E-transfizierten oder Leervektor-transfizierten (**mock**) HEK293T-Zellen dargestellt. Die Unterschiede zwischen **Spender 1** und **Spender 2** und ihrer jeweiligen Kontrolle (**mock**) waren sehr signifikant ($p < 0,005$) (t-Test). Die IL-10 Freisetzungen aus PBMCs des **Spenders 3** unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle (t-Test). Die höchste Konzentration an IL-10 lag bei 730 pg/ml (**Spender 1**). Die IL-10-Induktion in den Kontrollen lag im Mittel bei 468 pg/ml. Fehlerbalken repräsentieren die Varianz um den Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung. Auch der Vergleich der Kontrollen der **Spender 1-3** zueinander zeigte keine signifikanten Unterschiede (ANOVA).

3.4.5 Stabile Expression in HEK293T-Zellen

Stabil transfizierte HEK293T-Zellen sollten das p15E-Protein sekretieren. Ziel war die Gewinnung des p15E-Proteins in großen Mengen durch eine hohe Sekretionsrate der Zellen in einer kontinuierlichen seriellen Subkultur und Reinigung des Zellkulturüberstandes über eine Affinitätschromatographie zu erreichen. Das p15E-Protein sollte anschließend für eine IL-10-Analyse eingesetzt werden.

Transfizierte HEK293T-Zellen wurden dazu über mehrere Passagen in Puromycin-versetztem Medium kultiviert. Der pOUT-p15E-Vektor kodiert für ein Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum. Nach der zweiten Passage waren bereits alle Zellen der Kontrolle (nicht-transfizierte Zellen) abgestorben, die transfizierten Zellen blieben dagegen vital (2.2.17).

Nach vierwöchiger Kultivierung der Zellen in antibiotikahaltigem Medium wurde eine Aufreinigung des Überstandes über magnetische *beads* durchgeführt sowie Zelllysate hergestellt (2.2.20). Das p15E-Protein konnte mittels Western Blot-Analyse weder durch den Anti-V5-Antikörper noch durch den Anti-p15E-Antikörper im Überstand oder im Zelllysate nachgewiesen werden (**Abbildung 41**). Es wurde auch eine Konzentrierung und Reinigung des p15E-Proteins mit Hilfe eines molekularen Siebes durchgeführt (2.2.20). Auch hier konnte mittels Western Blot-Analyse gegen das V5-Epitop bzw. das p15E-Protein kein sekretiertes p15E-Protein nachgewiesen werden (**Abbildung 41**).

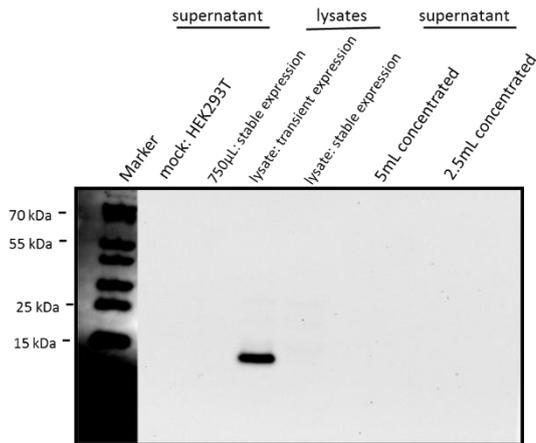


Abbildung 41: Western Blot-Analyse zum Nachweis des p15E-Proteins nach stabiler Transfektion von HEK293T-Zellen mit dem Vektor pOUT-p15E.

Der Blot wurde mit HRP-gekoppeltem Anti-V5-Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das, aus der vorherigen transienten Expression gewonnene, Lysat verwendet. Dieses zeigte ein eindeutiges Signal nach ECL-Detektion. In allen übrigen Ansätzen ließ sich keine p15E-spezifische Bande nachweisen.

3.4.6 Einführung einer Mutation in das p15E-pOUT

Mit Hilfe einer ortssepezifischen Mutagenese sollte eine Mutation in die Sequenz des p15E des pOUT-Konstruktes innerhalb der immunsuppressiven Domäne eingeführt werden. Dazu wurden Primer erstellt, welche sich in der *isu*-Sequenz des p15E überlappen. Somit sollte eine Mutation des initialen Leucins (CTG) des p15E in Alanin (GCG) erreicht werden (2.1.6). Im pOUT entspräche dies einem Austausch der Aminosäure 66 (L 66 A). Die Transformation des Mutagenese-Konstruktes erfolgte in DH5 α -Zellen (2.2.16). Es konnten keine Klone nach Selektion durch eine Ampicillin-Resistenz isoliert werden (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Infektion humaner Zellen und Isolierung von PERV- und MuLV-Partikel

Die Untersuchung der LTR-Sequenzen des PERV-Expressionsvektor (PERV-Moleklarklon) zeigte, dass diese mit den 2003 publizierten Sequenzen von DENNER *et al.* übereinstimmen (Denner *et al.* 2003). Die LTR-Regionen der γ -Retroviren enthalten Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren (Denner *et al.* 2001). Im Genom der γ -Retroviren konnten bislang kein weiterer interner Promoter identifiziert werden (Modrow *et al.* 2010). In der Sequenz des 37-bp-Repeats wurde insbesondere eine Bindestelle des zellulären Transkriptionsfaktors *nuclear factor-Y* identifiziert (Denner *et al.* 2001). In einem Luciferase-Assay konnte gezeigt werden, dass die Transkription eines Reportergens in HEK293-Zellen mit steigender Anzahl an Repeats, und damit auch einer steigenden Anzahl an möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, zunahm (Denner *et al.* 2003). Die LTR-PCR zweier in dieser Arbeit untersuchter PERV-infizierter Zellkulturen zeigte ein zueinander ähnliches Bandenmuster an LTR-Repeats mit unterschiedlicher Länge (3.1.3; **Abbildung 10**). Diese Ergebnisse stimmten mit den Versuchen von SCHEEF *et al.* überein. Ebenso konnte ein ähnliches Bandenmuster vier Wochen nach Transfektion von Zellen mit einem Moleklarklon von PERV-A oder -B beobachtet werden, wobei keine Mutationen in der LTR-Region nachweisbar waren. Die Banden von unterschiedlicher Länge entstanden hierbei durch Multimerisierung eines 39-bp-Repeat Motivs (Scheef *et al.* 2001). Für die, in dieser Arbeit erhaltenen LTR-Sequenzen, könnte demnach eine Multimerisierung des 37-bp-Repeats angenommen werden. Jedoch wurden die Ergebnisse nicht durch eine Klonierung und Sequenzierung verifiziert, weshalb sich diese Annahme lediglich auf Grund der beobachteten Fragmentlänge stützt. Die nach einer PCR-Analyse erhaltenen Banden zeigten unterschiedliche Signalintensitäten. Aufgrund der Signalintensität der prominentesten Bande im jeweiligen Ansatz wurde vermutet, dass die Zellkultur 293Ti vornehmlich ein 5°-Repeat trägt, während in der Kultur 293vV ein 3°-Repeat dominierte (**Abbildung 10**, **Abbildung 11**). Jedoch wurde, entgegen den Erwartungen, eine höhere Virusexpression in der Kultur des 3°-Repeats (293vV) mittels SDS-Page und Ponceau-Färbung beobachtet (Daten nicht gezeigt) (3.1.2). Obwohl eine hohe Zahl an Repeat-Sequenzen in den LTR-Regionen die virale Expression erhöht, scheint die Größe der LTR limitiert zu sein. Dies konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, da die erhaltenen LTR-Sequenzen in allen Infektionsansätzen in einem Bereich von 150 – 350 bp ermittelt werden konnten. Ein LTR-Repeat von 350 bp würde einer fünffachen Multimerisierung (5°-Repeat) des 37-bp-Repeats entsprechen. Vermutlich würde durch eine höhere Anzahl an Repeats die korrekte Verpackung des viralen Genoms in das Partikel beeinträchtigt werden (Scheef *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass die Multimerisierung der LTR-Region durch eine Fehlbindung während des Annealings im Zuge der Reversen Transkription zustande kommt (Scheef *et al.* 2001).

Virale Partikel wurden durch Infektion und kontinuierliche Kultivierung in humanen Zellen gewonnen. Retroviren verlassen die Wirtszelle durch einen Budding-Prozess. Dabei treten keine Zellschäden auf (Flint 2009). Demnach sollten lichtmikroskopisch keine zytotoxischen Effekte zu erkennen sein, wie sie beispielsweise nach der Lyse durch nicht-behüllte Virusspezies entstehen (Modrow *et al.* 2010). Dies konnte für die Infektion von HEK293T-Zellen durch PERV bestätigt werden. Dagegen wurden 24 Stunden nach der Infektion von MFB-Zellen mit MuLV aus infektiösen Zellkulturüberständen zytotoxische Effekte beobachtet. Nach Infektion der Zellen in Ibidi-Kulturschalen zum Virusnachweis mittels Immunfluoreszenz wurde ein vollständiges Absterben der Kultur beobachtet. Dieses zeigte sich in Form von Ablösung einiger Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes, auffälligen morphologischen Veränderungen und Lyse einzelner Zellen. Auch die Beobachtung mittels Lichtmikroskopie ließen eine Kontamination der MuLV-infizierten Zellen vermuten. Nach DAPI-Färbung der DNA im

Präparat wurde außerhalb bzw. in der Nähe der Zellmembran der MFB-Zellen ein schwaches Signal in bakterien- oder hefeähnlichen Partikeln nachgewiesen.

Insofern eine Replikation des MuLV eine Zytotoxizität verursachen würde, sollten diese Effekte nicht eher als nach einer Inkubation von 24 Stunden beginnen. Das MuLV integriert, wie die übrigen „einfachen“ Retroviren, nur in Zellen während der Teilungsphase, welche bei humanen Zelllinien ca. alle 24 Stunden vollzogen wird. γ -Retroviren können keine ruhenden Zellen infizieren, da sie keine akzessorischen Proteine codieren, welche einen Kernttransport ermöglichen (Modrow *et al.* 2010).

Es konnte eine hohe Menge an PERV-Partikeln gewonnen werden. Durch die hohe Anzahl an Viruspartikeln wurde eine Bande auf der Höhe des Kapsid-Proteins bei ca. 27 kDa bereits nach einer unspezifischen Ponceau-Färbung der Membran detektiert. Das Kapsid-Protein gehört stöchiometrisch gesehen zum größten Anteil an der Menge viraler Proteine und eignet sich daher für eine Quantifizierung viraler Partikel. Die Ponceau-Färbung hatte eine geringere Farbintensität als eine Färbung des Gels mit Coomassie. Im Gegensatz zu der Bandenintensität nach der durchgeführten Ponceau-Färbung, unterschieden sich die p27-Banden unterschiedlicher Konzentration in der Western Blot-Analyse in ihrer Signalintensität kaum voneinander (**Abbildung 13 B**). Dies zeigt deutlich, dass eine Quantifizierung mittels Western Blot-Analyse nach Antikörperzugabe keine zuverlässigen Daten liefern kann. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung des Virusmaterials wäre beispielsweise durch die Messung der Reversen Transkriptaseaktivität möglich. Daraus könnte indirekt ein Rückschluss auf die Anzahl viraler Hüllproteine in der Präparation gezogen werden. Ob die Anzahl viraler Partikel von PERV und MuLV proportional zur Aktivität der Reversen Transkriptase wäre, bliebe jedoch ungeklärt. Die Analyse der Infektiosität, beispielsweise durch eine Immunfluoreszenzmessung mittels Focus Forming Assay, wäre keine geeignete Methode zur Erfassung der Partikelzahl (Flint 2009). Die Anzahl gebildeter viraler Partikel korreliert häufig nicht mit der Infektiosität des Viruspartikels (Flint 2009).

4.2 PERV-spezifische Antikörper zeigen eine Kreuzreaktion gegen MuLV-Proteine
Da es sich bei PERV und MuLV um nah-verwandte Spezies handelt, sollten Antikörper gegen das p27 des PERV mit dem p30 des MuLV kreuzreagieren. Wie in den Ergebnissen der Western Blot-Analyse des MuLV mit Seren gegen PERV-spezifische Proteine gezeigt werden konnte, ist eine kreuzreaktive Reaktion des p27 Antiserum mit dem entsprechendem Kapsidprotein von MuLV nachweisbar.

Das PERV-spezifische Serum gegen das p15E-Protein erkennt das entsprechende p15E-Protein des MuLV. Die Doppelbande, welche im gereinigten MuLV-Isolat nach Detektion mit PERV Anti-p15-Serum erhalten wurde, könnte eine Degradation des p15E-Proteins darstellen. Wie vermutet wurde, bindet das PERV-Anti-gp70-Serum nicht das entsprechende MuLV-Antigen. Die Sequenz des gp70 ist im Taxon der γ -Retroviren weitaus weniger konserviert, als beispielsweise das p15E-Protein. Das PERV-Anti-Gag-Serum bindet insbesondere das Vorläufer-Protein des Kapsids von MuLV auf der Höhe von etwa 60 kDa. Dies ist vermutlich nur bei einer hohen Viruspartikelzahl nach Konzentrierung zu beobachten, da das MuLV-Antigen in den MFB-Lysaten infizierter Zellen keine Banden zeigte (3.2.2, **Abbildung 20**).

4.3 Nachweis und Charakterisierung der PERV-Infektion mittels PCR

Die Integration des PERV-Provirus wurde in HEK293T-Zellen untersucht, welche über einen längeren Zeitraum nach einer PERV-Infektion kultiviert worden waren. Es zeigte sich hier in der PCR-Analyse für die LTR-Region ein spezifisches Bandenmuster bestehend aus 5-6 Einzelbanden. Die einzelnen Banden sind vermutlich das Ergebnis verschiedener, voneinander unabhängiger Integrationen in die zelluläre Wirts-DNA. Das gleiche Muster wurde auch nach der Untersuchung von rezent-infizierten Zellen beobachtet. Vermutet wurde hier, dass die

Infektion ein seltenes Ereignis ist und nur wenige Viren integrieren können. Die Amplifikation der LTR-Region mittels PCR sollte daher in einer einzelnen Bande spezifischer Größe resultieren. Vermutlich entstand das Bandenmuster, da die Zellen nicht mit einem einzigen Klon infiziert wurden, sondern mit einer Vielzahl viraler Partikel, welche durch mehrfache Infektionszyklen vermutlich bereits Multimerisierung oder auch Mutationen in ihren LTR-Regionen trugen. Allerdings beobachteten SCHEEF *et al.* ein ähnliches Bandenmuster nach initialer Transfektion humaner Zellen mit einem Molekularklon und Kultivierung und Reinfektion dieser Zellen über vier Wochen (Scheef *et al.* 2001).

In dieser Arbeit könnte ebenfalls durch die Infektion mit Zellkulturüberständen oder gereinigten viralen Partikeln ein Carry-Over an DNA aufgetreten sein. Durch die Ultrazentrifugation durch eine 20%ige Saccharoselösung können DNA-Fragmente vermutlich nicht von den viralen Partikeln getrennt werden. Es könnte jedoch auch nach einer initialen Infektion weitere Reinfektionen mit Virionen aufgetreten sein, welche eine Multimerisierung oder Mutation der LTR-Region zur Folge hatten. Gegen diese Hypothese, und die Vermutung des DNA-Carry-Overs bei Infektion, spricht, dass sich die Bandenmuster drei Tage nach Infektion (**Abbildung 30 A**) und zu einem späteren Zeitpunkt (**Abbildung 30 B**) nicht voneinander unterschieden. Die Identität der erhaltenen Banden mittels LTR-PCR bleibt unklar, da diese nicht kloniert und sequenziert wurden.

4.4 Nachweis von MuLV mittels Fluoreszenzmikroskopie

Das detektierte Fluoreszenzsignal war dominant auf der Zelloberfläche lokalisiert (3.2.3, **Abbildung 22**). Dies stimmte mit den Erwartungen überein, da sich retrovirale Partikel an der Zellmembran bilden und anschließend über einen Budding-Prozess die Zelle verlassen (Modrow *et al.* 2010). Die Gag-Vorläuferproteine werden zur Zytoplasmamembran transportiert und interagieren dort mit den Fettsäureresten. Während der Virusreifung werden sie von der viralen Protease in die einzelnen Protein-Komponenten gespalten (Modrow *et al.* 2010).

Mittels Western Blot-Analyse konnte eine Kreuzreaktion des PERV-spezifischen Kapsid-Antikörpers mit dem entsprechenden MuLV-Antigen beobachtet werden. Insbesondere bei Verwendung des Antiserums gegen das PERV-Kapsid konnten viele unspezifische Banden bei MuLV-infizierten MFB-Zelllysaten detektiert werden (3.2.2). Es konnten in den Ansätzen infizierter Zellen unspezifische Banden detektiert werden, welche in der Kontrolle nicht-infizierter Zellen nicht zu beobachten waren. Zwischen der Kontrolle und den infizierten Ansätzen konnten in der Signalintensität nur geringe Unterschiede festgestellt werden. Die nicht spezifische Bindung des Serums könnte der Grund für diese Beobachtung sein.

Die Verwendung des PERV-p15E-Antiserums erzielte ein deutlich stärkeres Signal in der Kreuzreaktion gegen das MuLV-Oberflächenprotein in der Western Blot-Analyse als die Verwendung des PERV-spezifischen Gag-Antiserums. Der Nachweis mittels Immunfluoreszenz sollte daher unter Verwendung des PERV-spezifischen Anti-p15E-Serums wiederholt werden.

4.5 Klonierung der PERV *env*-Sequenz

Die erneute Klonierung der PERV *env*-Sequenz aus einem bereits vorhandenen Molekularklon mit einem kloniertem *env*-Insert im Vektor schlug fehl. Es konnte keine erfolgreiche Klonierung mittels Restriktionsverdau nachgewiesen werden (3.3). Die Ausbildung einer Sekundärstruktur aufgrund der Sequenz des Inserts könnte eine erfolgreiche Ligation verhindert haben. Die *env*-Sequenz entstammte einem Molekularklon des PERV-A, welcher nach Infektion von HEK293-Zellen in der Arbeitsgruppe TÖNJES hergestellt wurde (Krach *et al.* 2001). Somit sollte dieser Klon replikationskompetent in HEK293T-Zellen sein (Krach *et al.* 2001).

Auch die Verwendung von rezent-infizierten HEK293T-Zellen zur Klonierung der PERV *env*-Sequenz war während dieser Arbeit nicht erfolgreich (3.3.2). Die Klonierung des *env*-Inserts aus rezent-infizierten Zellen sollte durch eine Isolierung viraler Partikel einer Rekombinanten aus PERV-A/-C erreicht werden (Karlus *et al.* 2010). Diese Rekombinante ist nicht in Form eines Moleklarklons verfügbar. Es sollte daher eine *env*-Sequenz in Volllänge kloniert werden, obwohl jedoch lediglich das p15E-Protein für eine IL-10-Induktion von Interesse wäre. Der Grund hierfür lag beim viralen Signalpeptid welches *upstream* der p15E-Sequenz in der PERV *env*-Sequenz codiert ist. Es wurde angenommen, dass nach einer rezenten Infektion mit PERV das integrierte Provirus nicht durch Mutationen oder durch Rekombination während der Zellproliferation beeinträchtigt werden kann und somit infektiöse Partikel produziert werden (Alberts *et al.* 2005). Es wurde vermutet, dass nach einer rezenten Infektion nur eine geringe Anzahl an Provirusintegrationen stattgefunden hatte, und somit nur eine geringe Menge an Template-DNA für eine Amplifikation mittels PCR zur Verfügung stand.

Anhand der Western Blot-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass alle, zur Klonierung der PERV *env*-Sequenz eingesetzten rezent-infizierten Zelllinien, eine ausreichende Produktion viraler Partikel aufwiesen. Es wurden dazu zwei Konzentrationen an Virusisolat auf das Acrylamidgel aufgetragen (3.3.2; **Abbildung 31 B**). Die Western Blot-Analyse lässt keine quantitativen Vergleiche zu, kann aber einen Hinweis auf die Effizienz der Virusproduktion durch einen Vergleich der Bandenintensität geben. Im Gegensatz hierzu sollte die unspezifische Färbung von Proteinen mittels Ponceau-Lösung ein Signal proportional zur Proteinmenge geben.

Bei der Verwendung genomischer DNA als Template konnten keine oder nur unspezifische Amplikons der Δ TM- oder vollständigen PERV *env*-Sequenz erzielt werden (3.3.2). Möglicherweise war die Anzahl an Template zu gering für eine effiziente Amplifikation mittels PCR. Die Häufigkeit der Integration des Provirus wurde jedoch nicht untersucht. Für PERV ist eine Anzahl von 50 Integrationen replikationsfähiger Proviren in das humane Genom beschrieben (Takeuchi *et al.* 1998). Eine Degradation der DNA während der Probenbehandlung konnte ausgeschlossen werden, da die DNA-Extraktion mehrfach wiederholt wurde. Auch die Reinheit der DNA-Extraktion wurde mittels Adsorptionsmessung am NanoDrop überprüft.

Im Gegensatz zur Amplifikation aus genomischer DNA gelang die Amplifikation der *env*-Sequenz ohne Transmembrandomäne (Δ TM) aus einem cDNA-Template. Der Vergleich zwischen der Amplifikation aus cDNA und genomischer DNA lässt vermuten, dass die Amplifikation der Sequenz ineffizient war. Auch nach dreimaliger PCR und anschließender Reinigung des Templates aus dem Agarosegel konnten für die Amplifikation aus der cDNA keine distinkten oder signalintensiven Banden detektiert werden (**Abbildung 32**).

4.6 Design des pOUT-Konstruktes zur Produktion von PERV-p15E-Protein

Da die Klonierung der PERV *env*-Sequenz in dieser Arbeit nicht erfolgreich war und auch vorherige Strategien zur Klonierung in dieser Arbeitsgruppe fehlgeschlagen waren, wurde ein neues Konzept zur Sekretion entwickelt und Teile der Expressionskassette durch Gensynthese generiert und in den Modellvektor der Firma ATG:biosynthetics kloniert (3.4).

Das pOUT-Konstrukt ist modular aufgebaut, um auch andere Proteine sekretieren zu können. Durch den C-terminale V5-Tag sollte ein Nachweis des Proteins unabhängig von der Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers ermöglicht werden. Der Hexa-HIS-Tag ermöglicht eine effiziente Reinigung des exprimierten Proteins mittels Affinitätschromatographie.

4.7 Vorteile der kommerziellen Gensynthese

Das pOUT ist aus kurzen Sequenzmodulen zusammengesetzt. Aufgrund der kurzen Sequenzen des Signalpeptids, der Kozak-Sequenz und des Tags wäre eine erfolgreiche Klonierung sehr

zeitaufwändig und der Erfolg nicht garantiert. Die Klonierung der Module müsste in jeweils einzelnen Klonierungsschritten erfolgen. Da die Kosten für DNA-Synthesen in den letzten Jahren gesunken sind, war die Synthese ökonomischer als eine molekulare Klonierung. Zudem konnte eine Codon-Optimierung durchgeführt werden.

4.8 Erfolgreiche Sekretion durch die Wahl eines starken Sekretionssignals

Die Sekretion von Proteinen aus der Zelle verläuft über den Transport durch das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat. Die erfolgreiche Sekretion und besonders die Sekretionseffizienz eines Proteins hängt vor allem von seinem N-terminalen Signalpeptid ab (Stern *et al.* 2007). Das Signalpeptid am N-Terminus ist verantwortlich für den Transport des Proteins ins ER. Meist besteht dieses aus 15-30 Aminosäuren. Im ER-Lumen wird das Signalpeptid enzymatisch entfernt. Im Golgi-Apparat finden posttranslationale Modifikationen statt (Stern *et al.* 2007).

Das Signalpeptid des Luciferase-Gens von *Gaussia princeps* zeigte im Vergleich zu anderen Signalpeptiden die stärkste bekannte Sekretion eines rekombinanten Proteins in eukaryotischen Zellen. Dies wurde in HepG2-Zellen und CHO-Zellen für eine rekombinante Luciferase gezeigt. *G. princeps* (Crustacea), ein mariner Tiefseebewohner, nutzt die Biolumineszenz zur Abwehr von Fraßfeinden. Da in der Tiefsee ein hoher Druck und eine niedrige Umgebungstemperaturen herrschen, ist die Stoffwechselrate von *G. princeps* gering. Im Gegensatz dazu muss die Sekretion der Luciferase mit hoher Geschwindigkeit erfolgen, um eine erfolgreiche Abwehr durchzuführen. Dies wird in diesem Organismus nicht durch eine hohe Transkriptionsrate des Luciferase-Gens, sondern über eine effiziente Sekretion erreicht (Stern *et al.* 2007).

Die Transkription im entwickelten pOUT-Vektorsystem wird von einem starken, konstitutiven Promoter, dem CMV-Promoter, getrieben. Eine hohe Transkriptionsrate ist eine Voraussetzung für eine starke Expression. Zudem ist die Expressionsrate von Modifikationen der mRNA abhängig. Das 5' Capping und der Poly-A-Tail beeinflussen dabei die Stabilität, das Splicing und die Translationsrate. Zudem ermöglichen diese Modifikationen den effizienten Transport der mRNA aus dem Nukleus. Der Export durch den *nuclear pore complex* und das Dirigieren der mRNA zu den Ribosomen wird durch weitere mRNA-bindende Proteine reguliert (Stern *et al.* 2007).

4.9 Erfolgreiche Sekretion des PERV-p15E-Proteins durch den generierten pOUT-Vektor

Hauptaufgabe dieser Arbeit war die Gewinnung des p15E-Proteins des PERV aus eukaryotischen Zellen. Durch die Expression in *E. coli* können zwar große Mengen an rekombinanten Protein gewonnen werden, jedoch entspricht das Glykosylierungsmuster sowie Proteinfaltung nicht dem tierischer Zellen. Zudem kann das gewonnene p15E-Protein nicht zur Untersuchung der IL-10-Induktion in PBMCs verwendet werden, da die exprimierten und isolierten Proteine herstellungsbedingt Endotoxin enthalten.

Das p15E-Protein enthält eine Transmembrandomäne (TM), welche die Sekretion in das Kulturmedium beeinträchtigen würde. Die Aminosäuresequenz der TM besteht aus hydrophoben Aminosäuren, welche das Protein in der Hüllmembran des Virions verankern (Denner und Tonjes 2012). Aufgrund der hydrophoben TM wäre nur eine geringe Sekretion des p15E-Proteins zu erwarten, da diese Domäne mit zellulären Membranen interagieren würde. Deshalb wurde die Transmembrandomäne vom p15E entfernt. Alternativ wäre eine Gewinnung des vollständigen p15E-Proteins aus Zellextrakten möglich. Jedoch würden nach einer Isolation des p15E-Proteins aus Zellysaten bzw. Membranzubereitungen aufgrund der Transmembrandomäne die Bestandteile der Zellmembran sowie weiterer Membranproteine nicht vollständig vom Protein entfernbar. Diese zellulären Proteine sowie Zellmembranen könnten ebenso eine IL-10-Antwort in PBMCs induzieren (Brockner *et al.* 2010).

Die Sequenz des PERV-p15E codiert für eine hohe Anzahl an Arginin und Serin. Proteine, welche reich an alkalischen Aminosäuren sind, zeigen eine vornehmliche Lokalisation im Nukleus (Tenenbaum und Aguirre-Ghiso 2005). Dies würde die Sekretion des Proteins beeinträchtigen. Jedoch zeigten die Ergebnisse der Western Blot-Analyse, dass die Sekretion des p15E-Proteins aus den Zellen bereits in geringen Mengen an Überstand nachweisbar ist (3.4.3). Daraus lässt sich schließen, dass das *Gaussia*-Signalpeptid ein sehr starkes Exkretionssignal für die Zelle darstellt.

Die Verwendung eines Tags ermöglichte den Nachweis des Proteins unabhängig von der Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers. Es konnte gezeigt werden, dass das exprimierte p15E-Protein dennoch vom spezifischen Antikörper erkannt wird (3.4.3). Für das sekretierte p15E-Protein ist die Bindung nicht eindeutig gezeigt worden, da hier nur eine sehr schwache Bande nach Analyse mittels Western-Blot unter Verwendung des PERV-spezifischen p15E-Antiserums nachgewiesen wurde. Die Reinigung des p15E-Proteins aus dem Kulturüberstand sollte in einer höheren Konzentration erfolgen, um zu überprüfen, ob eine größere Menge an Antigen die Detektion mittels Western Blot-Analyse verbessert. Insofern dies eine stärkere Bindung des spezifischen Antikörpers hervorrufen würde, ließe sich die schwache Detektion auf die Qualität des Serums zurückführen. Würde jedoch keine stärkere Bindung erreicht werden, könnte durch die Sekretion eine Modifikation des p15E-Proteins erfolgt sein. Somit würden sich das sekretierte p15E-Protein und das aus Zelllysate gewonnene Protein voneinander unterscheiden. Anhand eines Vergleichs der Bandengröße der Western Blot-Analyse ließ sich kein Unterschied im Molekulargewicht zwischen beiden Ansätzen feststellen. Eine mögliche posttranslationale Modifikation könnte also nur eine Größenänderung von wenigen Kilodalton hervorgerufen haben oder die Größe des p15E-Proteins nicht beeinflusst haben.

Es sollten weitere Anwendungsmöglichkeiten des generierten pOUT-Vektors geprüft werden. Interessant wäre es, die maximale Größe des exprimierten Proteins zu bestimmen, welches noch erfolgreich sekretiert werden kann. Auch könnte beispielsweise die Sekretion des gp70 (SU) der Gammaretroviren mittels pOUT-Vektor untersucht werden. Das gp70 von PERV und MuLV ist stark glykosyliert. Der Transportweg und -Geschwindigkeit durch die Zelle sind entscheidend für das Glykosylierungsmuster (Kemp *et al.* 1981). Es sollte untersucht werden, inwiefern der Sekretionsweg, bzw. das Signalpeptid, einen Einfluss auf das Glykosylierungsmuster haben kann. Das Signalpeptid dirigiert das Protein in das ER und wird dort abgespalten. Im ER findet bereits eine initiale Glykosylierung statt, welche im *trans*-Golgi-Netzwerk vollendet wird (Stern *et al.* 2007). Die Sekretion von posttranslational modifizierten Proteinen über das pOUT-System ist vermutlich für gering modifizierte Proteine geeignet, wie beispielsweise das PERV-p15E-Protein.

4.10 Induktion des IL-10 in PBMCs durch MuLV-Isolate und PERV-p15E-Protein, nicht jedoch durch PERV-Isolate

Die Messung der Endotoxinkonzentration in den PERV-Isolaten wurde in einen Zeitraum von 16 Stunden durchgeführt, da die Varianz der Messungen geringer war, als nach einem Messzeitraum über zwei Stunden. Die Konzentration an Endotoxin in den PERV-Isolaten war sehr niedrig (3.1.5). Der Wert lag nicht oder nur geringfügig höher als die Kontrollmessung mit endotoxinfreiem PBS. Die Isolate I und II konnten somit als endotoxinfrei bezeichnet werden. Das Isolat III dagegen war jedoch mit Endotoxin kontaminiert. Die Messung enthielt eine hohe Standardabweichung, so dass die ermittelte Konzentration an Endotoxin keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle zeigte. Die tatsächliche Kontamination könnte dabei auch in einem Bereich von 5 - 0,5 EU/ml an Endotoxin liegen (**Abbildung 15**).

Eine IL-10-Freisetzung aus PBMCs wird durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst. So beispielsweise durch bakterielles Endotoxin. Dieses wird als Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) erkannt und verursacht die Zytokinausschüttung, beispielsweise über einen

Signalweg durch die Aktivierung des Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) und durch Bindung an den CD14-Rezeptor (Groß 2009).

Durch Zugabe von MuLV-Isolaten ließ sich eine konzentrationsabhängige IL-10-Ausschüttung der PBMCs beobachten (3.2.4; **Abbildung 23**). Zum Nachweis einer Rezeptorbindung müssten weiterhin eine Sättigung bei hoher Konzentration, sowie ein Reversibilität der Bindung gezeigt werden (Müller-Esterl 2010). Die Zytokinantwort der, mit MuLV-Isolaten getesteten, PBMCs war auch unter Einfluss von TAK-242 nicht signifikant reduziert. TAK-242 ist ein Inhibitor des TLR-4 Signalweges (Zhang *et al.* 2015). Es könnte angenommen werden, dass die IL-10-Ausschüttung nicht durch eine Kontamination der Isolate mit Endotoxin verursacht wurde. Allerdings erkennen PBMCs die PAMPs über eine Reihe von Pattern Recognition Receptors. Es wurde daher auch eine Induktion von IL-10 durch Bindung von Endotoxin an den TLR-2 oder TLR-3 bei Makrophagen oder an den TLR-4 und TLR-9 in Makrophagen und dendritischen Zellen nachgewiesen (Saraiva und O'Garra 2010). Auch doppelsträngige RNA führt über die Proteinkinase R und den TF NF- κ B zur Induktion der IL-10-Expression (Feng *et al.* 1992). Zudem war im Experiment die Inkubationsdauer von 15 min der Zellen mit TAK-242 bei Raumtemperatur vermutlich nicht ausreichend, um eine Aufnahme des Moleküls in die Zellen und Bindung an den TLR-4 zu ermöglichen.

Die Untersuchung des, aus humanen Zellen sekretierten, PERV-p15E-Proteins lässt auf eine IL-10-Induktion durch dieses schließen (3.4.4). Für die PBMC-Präparationen aus zweien der drei Spendern konnte eine sehr signifikant erhöhte Freisetzung in Bezug zur jeweiligen Kontrolle ermittelt werden. Die Messwerte aus der Untersuchung der PBMCs von Spender 3 zeigten dagegen keine Induktion. Jedoch war hier in der Kontrolle eine starke Streuung der Messwerte um den Mittelwert zu beobachten. Der Versuch sollte mit einer höheren Anzahl an Replikaten wiederholt werden. Die Varianz zwischen PBMC-Präparationen unterschiedlicher Spender ist bekannt. Dieser Effekt könnte beispielsweise durch die Verwendung eines Pools von PBMC-Präparationen verringert werden (Wieczorek *et al.* 2013). Eine statistische Untersuchung mittels ANOVA ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede der Kontrollen der einzelnen Spender in dieser Arbeit zueinander. Die Durchführung des Versuchs entsprach einer *in vivo*-Situation, wie sie z.B. durch die Xenotransplantation von Langerhansschen Inselzellen zur Therapie von Diabetes Typ 1 eingesetzt wird (Shapiro *et al.* 2000).

Es sollte weiterhin untersucht werden, welche Konzentration an PERV-p15E-Protein auf die PBMCs wirkte und ob die Verwendung von isoliertem p15E-Protein die gleiche Wirkung zeigen würde. Weiterhin sollte eine konzentrationsabhängige Freisetzung an IL-10 überprüft werden. Um die Effekte von PERV auf humane Immunzellen zu belegen, ist letztendlich die Identifikation eines Rezeptors notwendig (Müller-Esterl 2010).

4.11 Entspricht die IL-10-Induktion einer Immunsuppression *in vivo*?

Das IL-10 wird von vielen Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert und freigesetzt. Die Konzentration des freigesetzten IL-10 aus dem gleichen Zelltyp ist dabei abhängig von der Art und der Stärke des Stimulus (Saraiva und O'Garra 2010). Der IL-10-Signalweg ist in ein Netzwerk verschiedener Zytokine eingebunden und durch diese reguliert (Manzanillo *et al.* 2015). IL-10 wird dabei stets zusammen mit proinflammatorischen Zytokinen induziert (Saraiva und O'Garra 2010). Der Effekt des IL-10 sollte daher nicht isoliert betrachtet werden. Aufgrund vielfältiger Funktionen ist seine Wirkung abhängig von weiteren Botenstoffen im Netzwerk der angeborenen und adaptiven Immunantwort. IL-10 kann somit aktivierende als auch supprimierende Funktionen in der Immunantwort haben (Mocellin *et al.* 2004a). Für IL-10 ist beispielsweise eine aktivierende Wirkung auf Natürliche Killer-Zellen (NK) nachgewiesen worden (Mocellin *et al.* 2004b). Durch aktivierte NK-Zellen erfolgt eine Bekämpfung von Tumorzellen. Insofern die Expression von PERV oder MuLV auch *in vivo* eine IL-10-Antwort induziert, könnte diese im Gegensatz zu einer immunsuppressiven Eigenschaft des IL-10 stehen.

Die immunsuppressiven Eigenschaften des IL-10 im Darm des Menschen werden zudem durch das IL-12 reguliert. Ausschließlich das IL-10 selbst hat hier keine immunsuppressive Wirkung (Schopf et al., 2002).

Für eine akute Infektion mit endogenen Retroviren wurde dagegen ein verstärktes Wachstum von Tumorzellen (Neuro-2a-Zellen) in Mäusen nachgewiesen, welches auf die immunsuppressive Domäne im Hüllprotein endogener Retroviren zurückgeführt wurde (Pothlichet *et al.* 2006). Dabei wurde das neuro-2a-assoziierte Retrovirus untersucht, welches in diesen Neuroblastomzellen exprimiert wird. Der RNAi Knock-down des Virus zeigte eine Reduktion im Wachstum der Neuro-2a-Zellen nach Transplantation der Zellen in Mäuse (Pothlichet *et al.* 2006). Jedoch wurden in diesem Experiment keine Daten zur IL-10-Freisetzung erhoben. Allerdings zeigten die Daten der Kontrollgruppen des Knock-downs mittels eines transfizierten RNAi-Konstruktes keine Kongruenz zu den Daten der Kontrollgruppe aus einer intraperitonealen Verabreichung von siRNA. Der Effekt in den Kontrollgruppen war, wider der Erwartung, in beiden Experimenten voneinander verschieden (Pothlichet *et al.* 2006). Die verwendeten RNAi-Konstrukte waren gegen die *gag*-Sequenz des Virus gerichtet und nicht ausschließlich gegen retrovirale Hüllproteine. Um die Hypothese der Immunsuppression durch das Retrovirus zu stützen, wurde von POTHLICHTET *et al.* ein Kontrollversuch in Röntgen-bestrahlten Mäusen durchgeführt. Dabei wurde nach Transplantation der Tumorzellen sowohl für die Kontrolle als auch für die Zellen mit retroviralem Knock-down ein ungehemmtes Tumorwachstum registriert. Dieses Wachstum wurde auf das zerstörte Immunsystem der bestrahlten Mäuse zurückgeführt (Pothlichet *et al.* 2006).

In einer weiteren Studie konnte diese Arbeitsgruppe eine Abstoßung transplantierte muriner Melanomzellen nachweisen, sobald ein Knock-down eines endogenen Retrovirus mittels RNAi im Empfängertier durchgeführt wurde (Mangeny *et al.* 2005). Jedoch wurde auch hier ein melanom-assoziiertes Retrovirus (*murine melanoma-associated retrovirus*) untersucht, welches im Genom dieser Melanomzellen integriert ist und von diesen exprimiert wird (Li *et al.* 1999). Es ist nicht belegt, inwiefern die Ergebnisse beider Studien der HEIDMANN-Gruppe auf weitere Spezies endogener Retroviren übertragbar sind. In keinem der Versuche wurde zudem der Parameter der IL-10-Freisetzung erfasst. Letztendlich existieren bisher keine Studien, welche den Zusammenhang zwischen einer mögliche Immunsuppression *in vivo* und einem Konzentrationsanstieg von Interleukin-10 *in vivo* belegen konnten.

Ähnliche Effekte auf Zelllinien konnten für das HERV-K gezeigt werden. Für Melanomzellen wurde *in vitro* nachgewiesen, dass Stress, wie z.B. die Kultivierung in Minimalmedium, oder eine hohe Expressionsrate von HERV-K zu einer morphologischen Veränderung der Zellen in eine hoch-maligne Form führt (Serafino *et al.* 2009). Jedoch wurden hier auch Veränderungen im Antigenmuster der Zellen nachgewiesen, welche eine Strategie der Tumorzelle zur Immunevasion darstellen (Serafino *et al.* 2009).

Um die Expression viraler Proteine des HIV zu ermöglichen, ist eine Stimulierung des Immunsystems notwendig. Dabei wird der Nuclearfaktor κ B (NF κ B) durch Zytokine, wie das IL-1 oder durch TNF- α , in den T-Lymphocyten aktiviert und verstärkt als Transkriptionsfaktor die Expression des HIV (Modrow *et al.* 2010).

Die Wirkung von IL-10 wurde von ELREFAEI *et al.* im Kontext von Alterungsprozessen an Mäusen und einer Immunabwehr gegen das MuLV untersucht (Elrefaei *et al.* 2002). Dabei zeigten ältere Tiere eine geringere Produktion an IL-2, IFN- γ und IL-10 nach einer Infektion mit MuLV im Vergleich zu den Jungtieren. Die geringere Produktion an Zytokinen stand dabei im Zusammenhang mit einer größeren Zeitspanne, welche für die Immunabwehr gegen das MuLV benötigt wurde (Elrefaei *et al.* 2002). *In vivo* wurde nachgewiesen, dass die schwächere Immunabwehr älterer Mäuse gegen MuLV auf eine geringere Antwort zytotoxischer T-Zellen

und einen geringeren Antikörpertiter zurückzuführen war (ElRefaei *et al.* 2001). Insofern eine erhöhte IL-10-Freisetzung eine immunsuppressive Wirkung hat, hätte die Bekämpfung der MuLV-Infektion in Jungtieren demnach länger andauern müssen, da in diesen eine höhere IL-10-Konzentration gemessen wurde. Dies konnte hier jedoch nicht beobachtet werden. Weiterhin zeigte der Versuch, dass die Herkunft der PBMCs, beispielsweise das Alter des Spenders, einen Einfluss auf deren Eigenschaften hat. Die Varianz, die bei *in vitro*-Versuchen an PBMCs verschiedener Spender auftritt, ist nachgewiesen und sollte stets in der Versuchsplanung berücksichtigt werden; beispielsweise durch das Verwenden eines Spenderpools an PBMCs (Wieczorek *et al.* 2013). Dies kann jedoch zu einer *mixed leukocyte reaction* führen (Bain *et al.* 1963).

Die Untersuchung einer möglichen Immunsuppression *in vivo* ist vermutlich komplex und nicht durch einzelne Parameter zu erfassen. Daher sollte kritisch betrachtet werden, wenn POTHLICHT und MANGENEY *et al.* aus den Ergebnissen einer reduzierten Tumorbildung durch den Knock-down endogener Retroviren in diesem Gewebe auf eine Immunsuppression schließen (MangeneY *et al.* 2005; Pothlichet *et al.* 2006). Hier wurden zwei Effekte miteinander verglichen und für korrelativ befunden, welche im Einzelnen nicht genügend verstanden sind und daher vermutlich von vielen Parametern beeinflusst werden. Dies belegen beispielsweise Experimente von SERAFINO *et al.* Hier führten unterschiedliche Stressparameter *in vitro* zu dem gleichen Effekt, wie sie durch eine Expression von HERV-K beobachtet wurden (Serafino *et al.* 2009).

Auch für die *isu*-Domäne des gp41 des HIV-1 wurde eine Modulation der Zytokinantwort und eine Immunsuppression *in vitro* berichtet (Denner *et al.* 2013) (Morozov *et al.* 2012) (Denner 2014). Die Immunsuppression durch das HIV *in vivo* beruht jedoch auf dem Verlust von Immunzellen und nicht auf einer verringerten Aktivierung dieser Zellen. Nach Primärinfektion und nach der Ausbildung der erworbenen Immunschwäche (*acquired immune deficiency*) kommt es zu einem starken Anstieg der Virusreplikation bei einem gleichzeitigem Absinken der CD4⁺-T-Lymphozyten. HIV repliziert in CD4⁺-Zellen und ist für diese zytolytisch. Zudem werden durch die Interaktion des CD4-Rezeptors der Zielzellen mit dem gp120 des HIV apoptotische Prozesse in CD4⁺-Zellen ausgelöst oder Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten zerstört. Auch sollte erwähnt werden, dass HIV nach Primärinfektion aktivierend auf Makrophagen und dendritische Zellen wirkt und diese somit für eine Infektion rekrutieren. Zudem entgeht HIV der Immunantwort aufgrund einer hohen Mutationsrate (Modrow *et al.* 2010).

Die Ergebnisse der IL-10-Analyse dieser Arbeit sollten mit weiteren Experimenten überprüft werden. Dazu würden die Messung weiterer Zytokine oder die Expressionsanalyse relevanter Gene zählen. Auch könnte eine Expressionsanalyse der verschiedenen Transkriptionsfaktoren einen Hinweis auf die Ursache und den Signalweg der IL-10 Induktion durch sekretiertes PERV-p15E-Protein geben (1.1.8; **Abbildung 1**). Es blieb ungeklärt, von welchen Immunzellen-Populationen das IL-10 sezerniert wurde. Auch die Regulation des IL-10 durch microRNA könnte untersucht werden (Saraiva und O'Garra 2010). Letztendlich sollte der vermutete Zusammenhang zwischen einer möglichen Immunsuppression durch die Expression endogener retroviraler Elemente und einer erhöhten Freisetzung von IL-10 auch anhand eines *in vivo*-Modelles belegt werden.

5 Literatur

- AKIYOSHI DE, DENARO M, ZHU H, GREENSTEIN JL, BANERJEE P, FISHMAN JA. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol* 72(5):4503-7.
- ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, WALTER P, NOVER L, VON KOSKULL-DÖRING P. 2005. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*: Wiley.
- ARGAW T, WILSON CA. 2012. Detailed mapping of determinants within the porcine endogenous retrovirus envelope surface unit identifies critical residues for human cell infection within the proline-rich region. *J Virol* 86(17):9096-104.
- BADYLAK SF, TAYLOR D, UYGUN K. 2011. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering* 13(1):27-53.
- BAIN B, VAS M, LOWENSTEIN L. 1963. REACTION BETWEEN LEUKOCYTES IN MIXED PERIPHERAL BLOOD CULTURES. *Federation Proceedings* 22(2):428-&.
- BAUER A, POSTRACH J, THORMANN M, BLANCK S, FABER C, WINTERSPERGER B, MICHEL S, ABICHT JM, CHRIST F, SCHMITZ C *et al.* 2010. First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation* 17(3):243-9.
- BIOINFORMATICS" SSIO. 2016.
- BITTMANN I, MIHICA D, PLESKER R, DENNER J. 2012. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERV) in different organs of a pig. *Virology* 433(2):329-336.
- BOASSO A, SHEARER GM. 2008. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol* 126(3):235-42.
- BREESE SS, JR. 1970. Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch* 30(4):401-4.
- BROCKER C, THOMPSON D, MATSUMOTO A, NEBERT DW, VASILIOU V. 2010. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Human Genomics* 5(1):1-26.
- COMMINS SP, BORISH L, STEINKE JW. 2010. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2):S53-S72.
- CZAUDERNA F, FISCHER N, BOLLER K, KURTH R, TÖNJES RR. 2000. Establishment and Characterization of Molecular Clones of Porcine Endogenous Retroviruses Replicating on Human Cells. *Journal of Virology* 74(9):4028-4038.
- DENNER J. 1998. Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 862:75-86.
- DENNER J. 2014. The transmembrane proteins contribute to immunodeficiencies induced by HIV-1 and other retroviruses. *AIDS* 28(8):1081-90.
- DENNER J, ESCHRICHT M, LAUCK M, SEMAAN M, SCHLAERMANN P, RYU H, AKYÜZ L. 2013. Modulation of Cytokine Release and Gene Expression by the Immunosuppressive Domain of gp41 of HIV-1. *PLoS ONE* 8(1):e55199.
- DENNER J, MIHICA D, KAULITZ D, SCHMIDT CM. 2012. Increased titers of neutralizing antibodies after immunization with both envelope proteins of the porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virol J* 9:260.
- DENNER J, NORLEY S, KURTH R. 1994. The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS* 8(8):1063-72.
- DENNER J, SPECKE V, KARLAS A, CHODNEVSKAJA I, MEYER T, MOSKALENKO V, KURTH R, ULRICHS K. 2008. No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in a long-term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats. *Ann Transplant* 13(1):20-31.

- DENNER J, SPECKE V, SCHWENDEMANN J, TACKE SJ. 2001. Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann Transplant* 6(3):25-33.
- DENNER J, SPECKE V, THIESEN U, KARLAS A, KURTH R. 2003. Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology* 314(1):125-133.
- DENNER J, TONJES RR. 2012. Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin Microbiol Rev* 25(2):318-43.
- EDGAR RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797.
- EKSER B, COOPER DKC. 2010. Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future. *Expert review of clinical immunology* 6(2):219-230.
- ELREFAEI M, BLANK KJ, MURASKO DM. 2001. Prolonged E55+ retrovirus expression in aged mice is associated with a decline in the anti-virus immune response. *Virology* 290(2):281-9.
- ELREFAEI M, BLANK KJ, MURASKO DM. 2002. Decreased IL-2, IFN- γ , and IL-10 Production by Aged Mice During the Acute Phase of E55+ Retrovirus Infection. *Virology* 299(1):8-19.
- ERICSSON TA, TAKEUCHI Y, TEMPLIN C, QUINN G, FARHADIAN SF, WOOD JC, OLDMIXON BA, SULING KM, ISHII JK, KITAGAWA Y *et al.* 2003. Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11):6759-64.
- EUROTRANSPLANT. 2016.
- FENG GS, CHONG K, KUMAR A, WILLIAMS BR. 1992. Identification of double-stranded RNA-binding domains in the interferon-induced double-stranded RNA-activated p68 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(12):5447-5451.
- FIEBIG U, DIECKHOFF B, WURZBACHER C, MÖLLER A, KURTH R, DENNER J. 2015. Induction of neutralizing antibodies specific for the envelope proteins of the koala retrovirus by immunization with recombinant proteins or with DNA. *Virology Journal* 12:68.
- FIEBIG U, STEPHAN O, KURTH R, DENNER J. 2003. Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology* 307(2):406-13.
- FLINT SJ. 2009. Principles of virology. American Society for Microbiology.
- GIFFORD R, TRISTEM M. 2003. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 26(3):291-315.
- GROß U. 2009. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Thieme.
- HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- HAN G-Z, WOROBAY M. 2015. A Primitive Endogenous Lentivirus in a Colugo: Insights into the Early Evolution of Lentiviruses. *Molecular Biology and Evolution* 32(1):211-215.
- HERRERA RJ, LOWERY RK, ALFONSO A, MCDONALD JF, LUIS JR. 2006. Ancient retroviral insertions among human populations. *J Hum Genet* 51(4):353-62.
- KARLAS A, IRGANG M, VOTTELER J, SPECKE V, OZEL M, KURTH R, DENNER J. 2010. Characterisation of a human cell-adapted porcine endogenous retrovirus PERV-A/C. Robert Koch-Institut.
- KEMP MC, FAMULARI NG, COMPANS RW. 1981. Glycoproteins of murine leukemia viruses. III. Glycosylation of env precursor glycoproteins. *J Virol* 39(2):463-70.
- KLYMIUK N, AIGNER B, BREM G, WOLF E. 2010. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Molecular Reproduction and Development* 77(3):209-221.
- KOFIDIS T, AKHYARI P, BOUBLIK J, THEODOROU P, MARTIN U, RUHPARWAR A, FISCHER S, ESCHENHAGEN T, KUBIS HP, KRAFT T *et al.* 2002. In vitro engineering of heart muscle: Artificial myocardial tissue. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 124(1):63-69.
- KOOLMAN J, RÖHM KH. 2009. *Taschenatlas Biochemie des Menschen*: Thieme.

- KRACH U, FISCHER N, CZAUDERNA F, TÖNJES RR. 2001. Comparison of Replication-Competent Molecular Clones of Porcine Endogenous Retrovirus Class A and Class B Derived from Pig and Human Cells. *Journal of Virology* 75(12):5465-5472.
- KÜHN R, LÖHLER J, RENNICK D, RAJEWSKY K, MÜLLER W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75(2):263-274.
- KURTH R, BANNERT N. 2010. Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis. Caister Academic. p 112-120.
- LAI L, KOLBER-SIMONDS D, PARK K-W, CHEONG H-T, GREENSTEIN JL, IM G-S, SAMUEL M, BONK A, RIEKE A, DAY BN. 2002. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295(5557):1089-1092.
- LANDER ES. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.
- LE TISSIER P, STOYE JP, TAKEUCHI Y, PATIENCE C, WEISS RA. 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389(6652):681-682.
- LI M, HUANG X, ZHU Z, GORELIK E. 1999. Sequence and insertion sites of murine melanoma-associated retrovirus. *J Virol* 73(11):9178-86.
- LIN SS, KOOYMAN DL, DANIELS LJ, DAGGETT CW, PARKER W, LAWSON JH, HOOPES CW, GULLOTTO C, LI L, BIRCH P *et al.* 1997. The role of natural anti-Gal alpha 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants. *Transpl Immunol* 5(3):212-8.
- MANGENEY M, POTLICHET J, RENARD M, DUCOS B, HEIDMANN T. 2005. Endogenous Retrovirus Expression Is Required for Murine Melanoma Tumor Growth In vivo. *Cancer Research* 65(7):2588-2591.
- MANZANILLO P, EIDENSCHENK C, OUYANG W. 2015. Deciphering the crosstalk among IL-1 and IL-10 family cytokines in intestinal immunity. *Trends in Immunology* 36(8):471-478.
- MARTINA Y, MARCUCCI KT, CHERQUI S, SZABO A, DRYSDALE T, SRINIVISAN U, WILSON CA, PATIENCE C, SALOMON DR. 2006. Mice Transgenic for a Human Porcine Endogenous Retrovirus Receptor Are Susceptible to Productive Viral Infection. *Journal of Virology* 80(7):3135-3146.
- MOALIC Y, BLANCHARD Y, FÉLIX H, JESTIN A. 2006. Porcine Endogenous Retrovirus Integration Sites in the Human Genome: Features in Common with Those of Murine Leukemia Virus. *Journal of Virology* 80(22):10980-10988.
- MOCELLIN S, MARINCOLA F, RICCARDO ROSSI C, NITTI D, LISE M. 2004a. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15(1):61-76.
- MOCELLIN S, PANELLI M, WANG E, ROSSI CR, PILATI P, NITTI D, LISE M, MARINCOLA FM. 2004b. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes Immun* 5(8):621-630.
- MODROW S, FALKE D, TRUYEN U, SCHÄTZL H. 2010. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag. p 410-520.
- MOHIUDDIN MM. 2007. Clinical Xenotransplantation of Organs: Why Aren't We There Yet? *PLoS Medicine* 4(3):e75.
- MOROZOV VA, MOROZOV AV, SEMAAN M, DENNER J. 2012. Single mutations in the transmembrane envelope protein abrogate the immunosuppressive property of HIV-1. *Retrovirology* 9:67.
- MÜLHARDT C. 2009a. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*: Spektrum Akademischer Verlag.
- MÜLHARDT C. 2009b. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*: Spektrum Akademischer Verlag.
- MÜLLER-ESTERL W. 2010. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler [Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger]*: Spektrum Akademischer Verlag.

- POTHLICHET J, HEIDMANN T, MANGENEY M. 2006. A recombinant endogenous retrovirus amplified in a mouse neuroblastoma is involved in tumor growth in vivo. *Int J Cancer* 119(4):815-22.
- QUEREDA JJ, HERRERO-MEDRANO JM, ABELLANEDA JM, GARCIA-NICOLAS O, MARTINEZ-ALARCON L, PALLARES FJ, RAMIREZ P, MUNOZ A, RAMIS G. 2012. Porcine endogenous retrovirus copy number in different pig breeds is not related to genetic diversity. *Zoonoses Public Health* 59(6):401-7.
- REIF AE. 1985. Vaccination of adult and newborn mice of a resistant strain (C57BL/6J) against challenge with leukemias induced by Moloney murine leukemia virus. *Cancer Res* 45(1):25-31.
- SARAIVA M, O'GARRA A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10(3):170-181.
- SCHEEF G, FISCHER N, KRACH U, TÖNJES RR. 2001. The Number of a U3 Repeat Box Acting as an Enhancer in Long Terminal Repeats of Polytropic Replication-Competent Porcine Endogenous Retroviruses Dynamically Fluctuates during Serial Virus Passages in Human Cells. *Journal of Virology* 75(15):6933-6940.
- SCHLECHT-LOUF G, MANGENEY M, EL-GARCH H, LACOMBE V, POULET H, HEIDMANN T. 2014. A targeted mutation within the feline leukemia virus (FeLV) envelope protein immunosuppressive domain to improve a canarypox virus-vectored FeLV vaccine. *J Virol* 88(2):992-1001.
- SCHOPF LR, HOFFMANN KF, CHEEVER AW, URBAN JF, WYNN TA. 2002. IL-10 Is Critical for Host Resistance and Survival During Gastrointestinal Helminth Infection. *The Journal of Immunology* 168(5):2383-2392.
- SEMAAN M, IVANUSIC D, DENNER J. 2015. Cytotoxic Effects during Knock Out of Multiple Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Sequences in the Pig Genome by Zinc Finger Nucleases (ZFN). *PLoS ONE* 10(4):e0122059.
- SERAFINO A, BALESTRIERI E, PIERIMARCHI P, MATTEUCCI C, MORONI G, ORICCHIO E, RASI G, MASTINO A, SPADAFORA C, GARACI E *et al.* 2009. The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Experimental Cell Research* 315(5):849-862.
- SHAPIRO AM, LAKEY JR, RYAN EA, KORBUTT GS, TOTH E, WARNOCK GL, KNETEMAN NM, RAJOTTE RV. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343(4):230-8.
- STERN B, OLSEN LC, TRÖBE C, RAVNEBERG H, PRYME IF. 2007. Improving mammalian cell factories: The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells. *Trends Cell Mol Biol* 2:1-17.
- TAKEUCHI Y, PATIENCE C, MAGRE S, WEISS RA, BANERJEE PT, LE TISSIER P, STOYE JP. 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 72(12):9986-91.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731-2739.
- TAYLOR DA, ATKINS BZ, HUNGSPREUGS P, JONES TR, REEDY MC, HUTCHESON KA, GLOWER DD, KRAUS WE. 1998. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4(8):929-33.
- TENENBAUM SA, AGUIRRE-GHISO J. 2005. Dephosphorylation Shows SR Proteins the Way Out. *Molecular cell* 20(4):499-501.
- VAN DER LAAN LJW, LOCKEY C, GRIFFETH BC, FRASIER FS, WILSON CA, ONIONS DE, HERING BJ, LONG Z, OTTO E, TORBETT BE *et al.* 2000. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407(6800):90-94.
- WIECZOREK L, BROWN BK, DELSARTO MACEDO C, WESBERRY-SCHMIERER M, NGAUY V, ROSA BORGES A, MICHAEL NL, MAROVICH MA, MONTEFIORI DC, POLONIS VR. 2013.

- Mitigation of variation observed in a peripheral blood mononuclear cell (PBMC) based HIV-1 neutralization assay by donor cell pooling. *Virology* 447(1-2):240-8.
- YANG L, GUELL M, NIU D, GEORGE H, LESH A E, GRISHIN D, AACH J, SHROCK E, XU W, POCI J *et al.* 2015. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science* 350(6264):1101-4.
- YANG Y-G, WOOD JC, LAN P, WILKINSON RA, SYKES M, FISHMAN JA, PATIENCE C. 2004. Mouse retrovirus mediates porcine endogenous retrovirus transmission into human cells in long-term human-porcine chimeric mice. *Journal of Clinical Investigation* 114(5):695-700.
- ZHANG Y, PENG W, AO X, DAI H, YUAN L, HUANG X, ZHOU Q. 2015. TAK-242, a Toll-Like Receptor 4 Antagonist, Protects against Aldosterone-Induced Cardiac and Renal Injury. *PLoS ONE* 10(11):e0142456.
- ZHU T. 2005. *Human Retrovirus Protocols: Virology and Molecular Biology*: Humana Press.