



BEUTH HOCHSCHULE FÜR TECHNIK BERLIN
University of Applied Sciences

Expression und Analyse retroviraler
immunsuppressiver
Domänen auf humanen Zellen

**Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie
an der Beuth Hochschule für Technik Berlin
- University of Applied Sciences -**

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

Vorgelegt von
Jasper König
09/2017

Angefertigt am
Robert-Koch-Institut Berlin

Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Grohmann, Dr. Joachim Denner

Betreuer: Dr. Daniel Ivanusic, Dr. Joachim Denner

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	II
Zusammenfassung	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Zielsetzung	5
2 Material und Methoden.....	6
2.1 Material.....	6
2.1.1 Verwendete Geräte.....	6
2.1.2 Chemikalien	6
2.1.3 Nährmedien und Puffer.....	7
2.1.4 Verwendete kommerzielle Kits und Reagenzien.....	8
2.1.5 Sonstige Verbrauchsmaterialien	9
2.2 Methoden	9
2.2.1 Zellkultivierung.....	9
2.2.2 Transformation und Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	10
2.2.3 Transfektion von <i>HEK293T</i> -Zellen.....	10
2.2.4 Isolierung des <i>pOUT</i> -Proteins aus Zellüberständen	10
2.2.5 SDS-Page und Western Blot.....	11
2.2.6 Isolierung von PBMCs aus Buffy-Coat.....	11
2.2.7 Isolierung von Viruspartikeln.....	12
2.2.8 Charakterisierung von isolierten MuLV-Partikel	13
2.2.9 Isolierung und Charakterisierung von Exosomen.....	13
2.2.10 Quantitative Bestimmung des Endotoxingehaltes	13
2.2.11 Quantitative Bestimmung der IL-10 Freisetzung mittels ELISA	14
3 Ergebnisse	15
3.1 Expression der <i>pOUT</i> - und der <i>tANCHOR</i> -Systeme	15
3.2 Charakterisierung der MuLV-Partikel.....	18
3.3 Detektion und Charakterisierung der Exosomen	21
3.4 Analyse des Endotoxingehaltes in den Proteinproben	22
3.5 IL-10-Induktion durch die <i>isu</i> -Domäne.....	24
4 Diskussion	28
4.1 Gelungene Expression der <i>isu</i> -Domäne in beiden Systemen	28
4.2 Infizierte <i>M. dunnii</i> -Zellen produzieren Viruspartikel.....	29
4.3 Exosomen enthalten <i>tANCHOR</i> -exprimierte Proteine	30

4.4	Saccharose als Quelle der Endotoxin-Kontamination.....	31
4.5	Eine IL-10-Induktion erfolgte sowohl durch die <i>isu</i> -Domänen, als auch durch die Mutanten.	31
5	Literaturverzeichnis	33

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
°C	Grad Celsius
AIDS	Erworbenes Immundefizienz-Syndrom
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
CD82	Cluster of Differentiation 82
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EU	Endotoxin-Units
FKS	Fetales Kälberserum
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HRP	horseradish Peroxidase
IL-10	Interleukin-10
<i>isu</i>	immunsuppressiv
LAL	Limulus amoebocyten Lysat
LEL	Large extracellular loop
LPS	Lipopolysaccharid
Min.	Minuten
miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA
MuLV	Murines Leukämievirus
Mut	Mutante
nm	Nanometer
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PERV	Porcines endogenes Retrovirus
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
TEM	Tetraspanin-enriched microdomains
TM	transmembran
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp

Abkürzungen Aminosäuren

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

Abkürzungen Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Retroviren sind in der Lage, das Immunsystem des Wirtes durch verschiedene Mechanismen zu beeinflussen. Die *isu*-Domäne als ein Teil der retroviralen TM-Proteine p15E (PERV, MuLV), sowie gp41 (HIV-1) beispielsweise, ist in der Lage, die Zytokinexpression in PBMCs zu beeinflussen. So werden anti-inflammatorische Zytokine, wie das Interleukin-10 (IL-10) verstärkt exprimiert. Die am RKI entwickelten Proteinexpressionssysteme *pOUT* und *tANCHOR* wurden für die Expression der *isu*-Domäne in HEK293T verwendet. Das *pOUT*-System nutzt das Signalpeptid der *Gaussia princeps* Luciferase zur Sekretion des *pOUT*-Proteins in das Zellmedium. Das *tANCHOR*-System wiederum besteht aus dem Tetraspanin CD82, dessen large extracellular loop (LEL) durch die *isu*-Domäne von PERV oder HIV ersetzt wurde und diese somit auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Beide Expressionssysteme beinhalten neben der *isu*-Sequenz einen Proteintag bzw. Sequenz des mCherry Fluoreszenzproteins, die eine Detektion durch Western Blot-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Beide Methoden konnten eine Expression des *pOUT*-, bzw. *tANCHOR*-Proteins belegen. Partikel des MuL-Virus wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert und durch Western Blot-Analysen charakterisiert. Es konnten die virusspezifischen Proteine Gag, p15E und gp70 nachgewiesen werden. Daneben wurden Exosomen der mit *tANCHOR*-Protein transfizierten Zellen durch Ultrazentrifugation konzentriert und auf die Markerproteine CD9 und CD81, sowie auf das CD82 Δ LEL-*isu*-mCherry-Protein erfolgreich getestet. Die Immunsuppression durch die *isu*-Domäne sollte anhand einer IL-10-Induktion untersucht werden. Die Exosomen, konzentriertes MuLV-Protein, *pOUT*-sekretierende Zellen, sowie das durch kommerzielle His-Tag Dynabeads® isolierte *pOUT*-Protein wurden auf IL-10-Induktion in isolierten PBMCs durch einen ELISA untersucht. Das *pOUT*-Protein bewirkte keine IL-10-Induktion. Die Exosomen transfizierter Zellen, sowie die MuLV-Partikel zeigten eine IL-10-Induktion, welche sich von der Kontrolle aus dem Pellet von Exosomen uninfizierter, bzw. virusfreier Zellen signifikant unterschied. Die aus mutierter *isu*-Domäne bestehende Kontrolle zeigte jedoch ebenfalls eine Induktion des Zytokins. Derzeit ist unklar, warum auch die Mutanten in der *isu*-Domäne IL-10 induzieren.

1 Einleitung

Die Immunsuppression durch Retroviren ist im Fokus vieler Forschungsarbeiten. Retroviren, wie das humane Immunodefizienzvirus-1 (HIV-1) und viele Typ-D und Typ-C Retroviren, wie das MuL-Virus, sind beispielsweise in der Lage, die Proliferation verschiedener Zelltypen des Immunsystems zu hemmen, um so den Schutzmechanismen des Wirtes durch das Immunsystem zu umgehen (Oostendorp et al., 1993; Tacke, S. et al., 2000)). Der genaue Mechanismus, durch den die Viren das Immunsystem des Wirtes beeinflussen, ist bis heute ein Schwerpunkt der Forschung, wenn es um Heilungsmethoden für das erworbene Immundefektsyndrom (AIDS), oder auch die retrovirus-assoziierte onkogene Neoplasie geht. Die Tatsache, dass nicht-infektiöse Viruspartikel, wie HIV-1 oder das murine Leukämievirus (MuLV), ebenfalls in der Lage sind, das Immunsystem des Wirtes zu beeinflussen, lässt darauf schließen, dass virale Proteine möglicherweise eine direkte und wichtige Rolle spielen (Denner, 1998). Hierbei steht ein in allen Retroviren mehr oder weniger stark konservierter Abschnitt der transmembranen (TM) Hüllproteine, die immunsuppressive (*isu*) Domäne, im Mittelpunkt. Die Fähigkeit dieser, die Proliferation von unter anderem T- und B-Zellen des humanen Blutes als Antwort auf mitogene Substanzen zu hemmen, konnte bereits durch diverse Arbeiten belegt werden (Cianciolo et al., 1988; Muhle et al., 2016).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MuLV, FeLV, PERV, KoRV, GaLV, CKS-17 consensus	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E
HIV-1	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K	D

Abbildung 1: Sequenz der *isu*-Domäne der Viren MuLV, PERV und HIV-1 (verändert aus: Denner, 2014).

Retroviren sind RNA-Viren, die ihr Erbgut nach der Infektion einer Zelle in den Zellkern einschleusen. Die Viren codieren in ihrem Genom für das Enzym der Reversen Transkriptase. Dieses schreibt die Virus-RNA in von der eukaryotischen Zelle zur Proteinexpression verwendeten DNA um. Durch das virale Enzym Integrase wird die umgeschriebene Virus-DNA in das Erbgut der Wirtszelle eingebaut (Chiu and Davies, 2004). Die so infizierte Zelle produziert eine Vielzahl neuer Viruspartikel, die durch ein Zusammenspiel verschiedener Proteine, wie dem Proteinkomplex ESCRT, sowie Tetraspanine, in die Umgebung abgegeben werden (Thali, M., 2009). Weitaus effizienter als die direkte Infektion einer Zelle durch infektiöse Viruspartikel ist *in vitro* jedoch eine Infektion durch den Zell-zu-Zell-Transfer-Mechanismus. Bei der Akkumulation von Tetraspaninen, wie CD9 und CD63 an der sogenannten virulogischen Synapse kommt es zu einer Kolokalisation des viralen Gag-Proteins, des zellulären HIV-1-Rezeptors CD4, sowie notwendiger Korezeptoren, wie CCR5 (Ivanusic et al., 2015). In dessen Folge bildet sich ein Zustand sogenannter Hemifusion, in dem die äußere Lipidmembranschicht beider Zellen miteinander

verschmelzen, es aber zu keiner vollständigen Zellfusion kommt (Symeonides et al., 2014). Der letztendliche Prozess der Virusübertragung ist nicht abschließend geklärt. Eine Möglichkeit sei nach Do et al. (2014) die Übertragung der Viren durch Ausbildung einer filopodialen Brücke zwischen uninfizierter und infizierter Zelle. Des Weiteren konnte eine Protein-Protein-Interaktion von CD63 und gp41 nachgewiesen werden (Ivanusic et al., 2014).

Neben der Virusübertragung durch Zell-zu-Zell-Transfer spielen extrazelluläre Vesikel eine wichtige Rolle. Eine Unterkategorie, die Exosomen, sind etwa 0,1 µm große Lipidvesikel, die eine Rolle in der Zellverband-internen Kommunikation und dem Transport spielen. Exosomen beinhalten neben Proteinen auch mRNA und miRNA und sind in der Lage virale und antivirale Faktoren zu transportieren, da der Inhalt der Exosomen dem der Mutterzelle ähnelt. Daneben enthalten Exosomen infizierter Zellen infektiöses virales Erbgut, das in der Lage ist, andere Zellen zu infizieren (Nolte-'t Hoen et al., 2016). Auch eine Übertragung des HIV-Eintrittsrezeptors CD4 auf andere, nicht-konstitutiv-CD4-exprimierende-Zellen ist möglich (Madison and Okeoma, 2015). Sehr wahrscheinlich erscheint, dass die Exosomen von Virus-infizierten Zellen auch die TM-Domäne beinhalten, oder diese möglicherweise auf der Oberfläche präsentieren. Die immunsuppressive Eigenschaft der *isu*-Domäne könnte somit auf uninfizierte Zellen ausgebreitet werden, wie es beispielsweise auch bei Exosomen onkologischer Zellen, durch die Expression immunsuppressiver Proteine auf der Exosomen-Oberfläche der Fall ist (Ichim et al., 2008).

Untersuchungen zur immunsuppressiven Eigenschaft der *isu*-Domäne durch die Induktion anti-inflammatorischer Zytokine sollen durch die Expression der Domäne auf der Zelloberfläche, sowie durch die Sekretion eines, die Domäne beinhaltendem Protein verwirklicht werden. Die Konstrukte hierzu wurden von Dr. Daniel Ivanusic generiert und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um die Expressionsplasmide *tANCHOR* und *pOUT*. Ersteres nutzt zur Oberflächenexpression das Tetraspanin CD82, dessen large extracellular loop (LEL) durch die *isu*-Domäne ersetzt wurde. Das *pOUT*-Plasmid beinhaltet ein Signalpeptid des Tiefseefisches *Gaussia princeps*, welches sich durch die höchste bekannte Sekretionseffizienz auszeichnet (Trosse et al., 2007). Die so exprimierten Proteine *tANCHOR* und *pOUT* besitzen des Weiteren gewisse Proteintags. Der mCherry-Tag des *tANCHOR*-Proteins, sowie der V5-Tag des *pOUT*-Proteins dienen in Analyseverfahren wie Western Blot-Analyse und Immunfluoreszenz zum Nachweis.

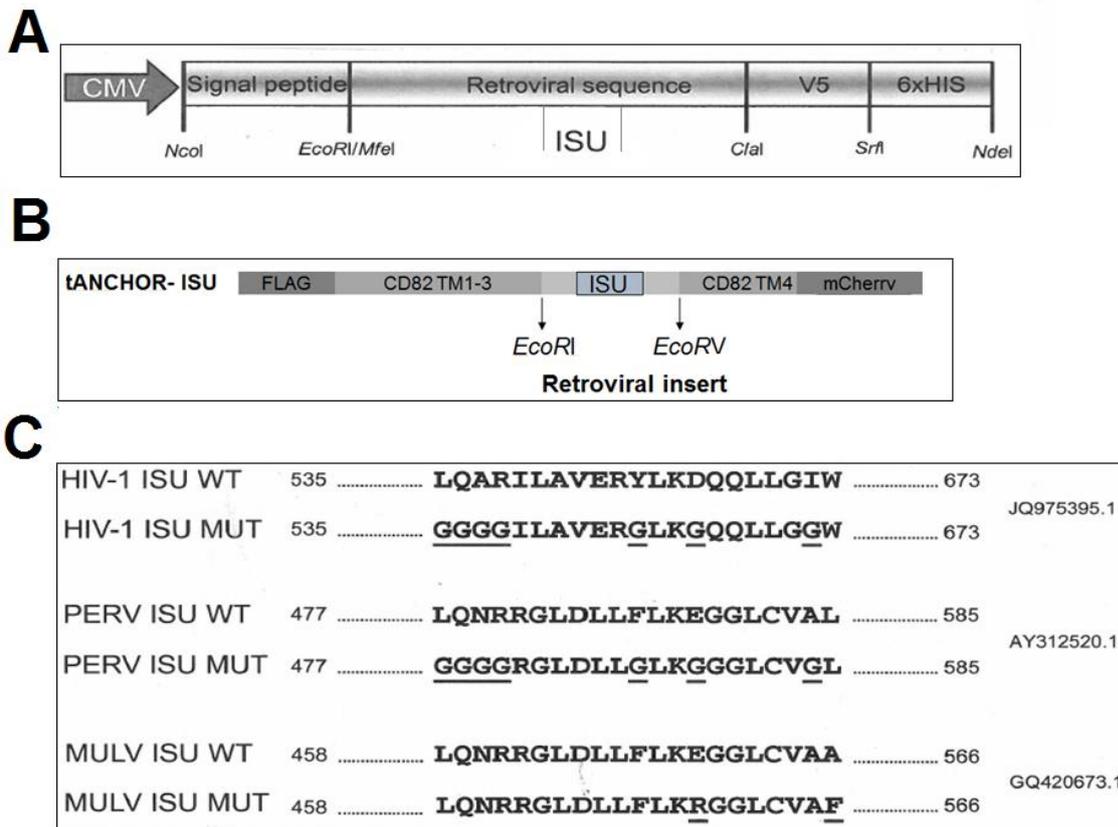


Abbildung 2: **A:** Struktur des pOUT-Sekretionssystems. CMV: Promoter des Cytomegalovirus (CMV). Das Signalpeptid zur Sekretion stammt aus dem Organismus *Gaussia princeps*. Die retrovirale Sequenz des Hüllproteins p15E (PERV, MuLV), bzw. gp41 (HIV-1) beinhaltet die isu-Domäne. Anschließend besitzt das Plasmid einen V5-, sowie einen 6xHistidin-Tag. **B:** Struktur des tANCHOR-Expressionssystems. Auf den vorangehenden FLAG-Tag folgt die Sequenz des Tetraspanins CD82, dessen large extracellular loop (LEL) zwischen den Restriktionsenzymen EcoRI und EcoRV durch die isu-Domäne von MuLV, PERV oder HIV ersetzt wurde. Des Weiteren besitzt das Protein einen C-Terminalen mCherry-Tag. **C:** Darstellung der Sequenzen der isu-Domäne der Viren HIV-1, PERV und MuLV. Aufgezeigt sind jeweils der Wildtyp (WT), sowie die mutierte Sequenz. Die unterstrichenen Aminosäuren weisen hierbei auf die durch Glycin ausgetauschten Aminosäuren hin.

1.1 Zielsetzung

In der Arbeit soll die Expression der *isu*-Domäne auf der Oberfläche humaner Zellen, sowie die Sekretion des Proteins in das umgebende Zellmedium verwirklicht und analysiert werden. Zur rekombinanten Proteinexpression soll die Zelllinie *HEK293T* verwendet und die Expressionsplasmide mittels des liposomalen Transfektionsreagenzes Metafectene® transient transfiziert werden. Alternativ sollen MuLV-Partikel durch Ultrazentrifugation des Zellkulturüberstandes infizierter *M. dunnii* Zellen isoliert werden. Die mit *pOUT*-Vektor transfizierten Zellen, sowie isolierte virale Partikel werden mittels ELISA auf die Induktion des Interleukins IL-10 getestet.

Des Weiteren soll die Lokalisation des CD82-Fusionsproteins auf der Oberfläche von Exosomen der mit *tANCHOR*-Plasmid transfizierten Zellen untersucht und ebenfalls auf IL-10-Induktion getestet werden. Diese werden aus dem Zellkulturüberstand von mit *tANCHOR*-Plasmid transfizierten *HEK293T*-Zellen durch Ultrazentrifugation pelletiert und mittels Western Blot-Analyse charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Bezeichnung

Analysewaage AC211S
Bakterieninkubator Infors HT Ecotron
BioRad Mini Protean Tetra Cell
Duomax 1030 Schüttler
Eppendorf Zentrifuge 5810 R
Fluoreszenzmikroskop Axioskop
Konfokales Lasermikroskop
INTAS Chemocam
Lichtmikroskop ID03
LP 2200 P Waage
Mastercycler pro S
Megafuge 1.0 R
Mikrowellenherd HF 22023
MultiscanGo
NanoDrop ND-1000
Optima L-100K Ultrazentrifuge
PowerPac 300 Powersupply
ThermoStat plus
Tischzentrifuge minispin
TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell
Vortexer
Wasserbad GFL Typ 1013
Zellkultur Werkbank HERASafe

Hersteller

Sartorius, Göttingen, Deutschland
Heraeus, Langensfeld, Deutschland
BioRad, München, Deutschland
Heidolph, Schwabach, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zeiss, Oberkochen, Deutschland
INTAS, Göttingen, Deutschland
Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Sartorius, Göttingen, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Siemens, München, Deutschland
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PiqLab, Erlangen, Deutschland
Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
BioRad, München, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BioRad, München, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gesellschaft für Labortechnik,
Deutschland
Heraeus, Langensfeld, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung

Acrylamid
APS

Hersteller

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ciprofloxacin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Gentamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
H ₂ SO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 100x Lösung	HyClone Laboratories, Pasching, Österreich
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween®-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tylosintartrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.3 Nährmedien und Puffer

Bezeichnung

Blockierungslösung
 Coating-Puffer ELISA
 Coomassie Färbelösung
 DMEM
 Entfärbelösung
 Elutionslösung Dynabeads®
 FKS
 1x HBS
 1x Laufpuffer SDS-Gel

Hersteller

8 % Magermilchpulver in dest. H₂O
 0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5, 0,713 %
 (w/v) NaHCO₃, 0,159 % (w/v) Na₂CO₃
 0.25% Brilliant blue 250 G, 10%
 Essigsäure, 45% Methanol
 Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
 10 % Essigsäure, 20 % Ethanol
 300 mM Imidazol, 50 mM
 Natriumphosphat pH 8, 300 mM NaCl,
 0,01 % Tween®-20
 Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 0,5 % HEPES, 0,8 % NaCl, 0,1 %
 Dextrose, 0,37 % KCl, 0,0188 %
 Na₂HPO₄*7H₂O
 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS

2x Probenpuffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 24 % Glycin, 8 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 0,02 % Coomassie Brilliant Blue G250
RPMI-Medium	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
Sammelgel (Zusammensetzung für etwa 6 Gele)	21 mL H ₂ O, 5 mL 30 % Acrylamid, 3,75 mL TRIS-HCl pH 6,8, 150 μ L 20 % SDS, 250 μ L 10 % APS, 30 μ L TEMED
1x TAE Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
TBF1-Lösung	mM KOAc, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 10 mM CaCl ₂
TBF2-Lösung	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin
Transferpuffer	50mm Tris, 40mm Glycin, 20% Methanol, 0.03% SDS2530
Trenngel (Zusammensetzung für etwa 6 Gele)	22,5 mL 30 % Acrylamid, 11,25 mL TRIS-HCl pH 8,0, 11,25 mL H ₂ O, 250 μ L 10 % APS, 30 μ L TEMED
0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA (w/v)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
2YT-Medium	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
Waschlösung Dynabeads®	100 mM Natriumphosphat pH 8, 600 mM NaCl, 0,02 % Tween®-20

2.1.4 Verwendete kommerzielle Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Anti-goat Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Anti-mouse Immunoglobulins /HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Anti-rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
BD OptEIA™ Set Human IL-10	BD Biosciences, San Diego, USA
BitNuclease	Bimake, Houston, USA
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Invisorb© Spin Plasmid Mini Two Kit	Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland
Invisorb© Spin DNA Extraction Kit	Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland
Lysozym	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Metafectene® Pro	Biontex Laboratories GmbH, München, Deutschland

Novex® Anti-V5 Antibody	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penta-His™ Antibody BSA-free	Qiagen, Venlo, Niederlande
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltman, USA
Rb mAb to CD9 (ab92726)	Abcam, Cambridge, UK
Rb mAb to TAPA1 (ab109201)	Abcam, Cambridge, UK
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltman, USA
TAK-242	Takeda Pharmaceutical, Osaka, Japan
TMB Substrat Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Ziegenseren (anti-Gag, anti-gp70, anti-p15E)	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland

2.1.5 Sonstige Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
E. coli XL-1 Blue kompetente Zellen	Stratagene, San Diego, USA
Immobilon®-P 0,2 µm Blotmembran	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nunc MaxiSorp™ flat-bottom ELISA-Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltman, USA
Mini Protean® TGX™ 10% Acrylamid SDS- Gel	BioRad, München, Deutschland
Whatmanpapier (extra dick)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflasche	Tpp Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte 6well; 96well	Tpp Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Für die Experimente wurden die Zelllinien *HEK293T* und *M. durni* verwendet und in DME-Medium (Glucose-Gehalt 1 g/L) unter Zugabe von 10 % FKS, 40 µg/mL Tylosin, 20 µg/mL von Ciprofloxacin und Gentamycin, sowie 2 mmol/L L-Glutamin kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter Sicherheitswerkbänken der Klasse II durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum splitting der Zellen wurde das Medium verworfen und die Zellen zweifach mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 3-5 mL 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung zugegeben und die Kulturflasche wurde bei 37 °C für einige Minuten in den Brutschrank gestellt, bis ein vollständiges Ablösen der adhärennten Zellen sichergestellt war. Mithilfe der Pipette, sowie mäßigem Klopfen wurden die Zellen resuspendiert und etwa 1:10 in eine neue Kulturflasche gegeben.

Zu Versuchszwecken wurden die jeweiligen Zellen in eine 6-well Zellkulturtestplatte ausgesät. Nach Erreichen von etwa 70-90 % Konfluenz wurde transfiziert.

Die für den ELISA verwendeten PBMCs wurden in RPMI-Medium mit 10 % FKS, sowie 2 mmol/L L-Glutamin und 100 µg/mL Penicillin/Streptomycin resuspendiert.

2.2.2 Transformation und Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Transformation des chemokompetenten *E. coli* Stammes XL-1 Blue erfolgte unter Zugabe von etwa 5 ng DNA zum Bakterienaliquot und anschließendem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Nach Zugabe von 200 µL 2xYT-Medium wurden die Zellen für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 200 mL 2xYT-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und mit den Bakterien angeimpft.

Die über Nacht im Schüttler bei 37 °C gehaltene Kultur wurde anschließend bei 1500*g für 20 Min. abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mithilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.3 Transfektion von *HEK293T*-Zellen

Zur Transfektion wurde das kommerzielle liposomale Transfektionsreagenz Metafectene® Pro nach Herstellerangaben verwendet. Die zu transfizierenden *HEK293T*-Zellen wurden in eine 6-well Plate ausgesät (1×10^6) und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 70-90 % mit entsprechender DNA transfiziert. Dabei wurden pro well 10-20 µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde in 100 µL DMEM gelöst und anschließend mit einem Mix aus 20 µL Metafectene® Reagenz in 100 µL DMEM versetzt. Nach 20 Min. wurde der Transfektionsmix zu den im 6-well befindlichen Zellen tropfenweise unter leichtem Schwenken gegeben.

Die Transfektionseffizienz, sowie eine allgemeine Untersuchung der Oberflächenexpression des tANCHOR-Proteins wurde durch Transfektion der 293T-Zellen mit von Dr. Daniel Ivanusic zur Verfügung gestelltem *pCMV-CD82-YFP*-Vektor (Ivanusic, D. et al., unpublished), sowie dem *tANCHOR*-Plasmid *pCMV-CD82ΔLEL-*isu*-mCherry* durchgeführt. Bei ersterem handelt es sich um die Sequenz des nativen Tetraspanins CD82, welches mit einem C-terminalen YFP-Tag versehen wurde. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion unter einem konfokalen Lasermikroskop unter Verwendung eines 63x/1.40 Öl-Objektives betrachtet. Für die Emission des YFP wurde ein 516-578 nm Filter, für die des mCherry ein 578-696 nm Filter verwendet.

2.2.4 Isolierung des *pOUT*-Proteins aus Zellüberständen

Das *pOUT*-Protein besitzt einen C-terminalen His-Tag aus 6 Histidinen, der zur Isolierung des Proteins herangezogen werden kann. Zur Isolierung des Proteins wurden 6-12 mL Zellüberstand der transfizierten *HEK293T* 24 h nach der Transfektion gesammelt und mit His-Tag Dynabeads der Firma Thermo Fisher Scientific nach den Angaben des Herstellers behandelt. Bei den Dynabeads handelt es sich um magnetische Metallkern-Kügelchen, die in der Lage sind, durch eine aufbrachte Beschichtung mit einem His-Tag versehene Proteine zu binden. Der

Zellüberstand wurde in mehreren Schritten von je 2 mL zu den Beads gegeben und für etwa 20 Min. inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Beads mithilfe eines Magneten gebunden, sodass der Bead-freie Zellkulturüberstand abgenommen werden konnte. Zur Elution des gebundenen Proteins wurden die mit Waschpuffer gewaschenen Beads mit 50 µL Probenpuffer versetzt und für 5 Min. auf 98 °C erhitzt. Nach abschließendem kurzen Zentrifugationsschritt wurden 20 µL der isolierten Proteine mittels SDS-Gel aufgetrennt.

Nach der Abnahme des Zellüberstandes wurden die Zellen eines 6-wells in 100 µL unter Zugabe von 1 µL der BitNuclease der Firma biotool lysiert. Das Lysat wurde in einem Reaktionsgefäß anschließend ebenfalls für 5 Min. auf 98 °C erhitzt und die Proteine wurden anschließend mittels SDS-Gel aufgetrennt

Für den IL-10-Assay wurden die Dynabeads nach der Proteinbindung nicht mit Probenpuffer, sondern mit 50 µL sterilem, auf Endotoxin getestetes (Abb. 11) PBS versetzt. 15 µL der Beadsuspension wurden in ein 96-well mit 3×10^5 PBMCs gegeben.

2.2.5 SDS-Page und Western Blot

Für die Elektrophorese wurden selbstgefertigte Gele mit einer Acrylamid-Endkonzentration von 10 % im Trenngel verwendet. Die Proben, wie gewaschene Dynabeads oder pelletierte Viruspartikel wurden in 2x Probenpuffer aufgenommen und für 5 Min. auf 95 °C erhitzt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Marker diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa) der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80-120 V durchgeführt.

Für den anschließenden Western Blot wurde eine 0,2 µm PVDF-Membran eingesetzt. Geblottet wurde für 60 Min. bei einer Spannung von 15 V. Um eine unspezifische Bindung des für die Detektion eingesetzten primären Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran nachfolgend für mindestens 60 Min. in 8 % Milchpulver in PBS geblockt. Anti-V5 als primärer Antikörper wurde 1:2000 verdünnt eingesetzt. Hierzu wurde die Membran nach dem Blockieren mit etwa 4 mL des in der Blocklösung verdünnten Antikörpers in einer Plastikhülle eingeschweißt und für 60 Min. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte in PBS unter Zugabe von 0,05 % Tween-20®, sowie einem weiteren in PBS. Abschließend wurde die Membran mit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate versetzt und das Chemolumineszenz-Signal mithilfe einer ChemoCam der Firma INTAS ausgelesen.

2.2.6 Isolierung von PBMCs aus Buffy-Coat

Die Isolierung von Leukozyten erfolgte aus gelieferten Buffy-Coats des Deutschen Roten Kreuzes e.V. Die Trennung der Bestandteile des Konzentrats beruht auf einer Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierfür wurden Leucosep Zentrifugationsröhrchen der Firma Greiner Bio-one verwendet. Die Isolierung von PBMCs wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zentrifugationsröhrchen wurden mit Separationsmedium, sowie in einem weiteren Schritt mit etwa 20-25 mL des Buffy-

Coats befüllt. Nach Zentrifugation bei 1000*g für 15 Min. konnte die Erythrozyten-Fraktion geerntet werden. Restliche Erythrozyten wurden durch Zugabe von 10 mL 0,86 % Ammoniumchlorid-Lösung und Inkubation für 30 Min. bei 37 °C im Inkubator lysiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet zweifach mit PBS gewaschen und zuletzt in einer entsprechenden Menge RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer bestimmt und nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{arithmetisches Mittel der Zellanzahl aus 4 Großquadraten}}{10^{-4} \text{ mL}}$$

Um sicherzustellen, dass die Induktion der Expression des IL-10 in PBMCs nicht auf eventuelle LPS-Kontaminationen zurückzuführen ist, wurde jeder Analyt mit nativen, sowie mit TAK-242 behandelten PBMCs versetzt. Das TLR-4 inhibierende TAK-242 verhindert hierbei die Aktivierung von PBMCs durch an den Rezeptor bindendes LPS (Li et al., 2006; Takashima et al., 2009). Die Zellsuspension aus PBMCs in RPMI-Medium wurde hierzu mit 10 µL TAK-242-Lösung pro mL Suspension versetzt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

2.2.7 Isolierung von Viruspartikeln

Der Zellkulturüberstand der mit MuLV-Virus infizierten *M. dunnii* Zellen wurde bei 1500*g für 10 Min. abzentrifugiert, um Zellen und grobe Zellfragmente zu entfernen. Das separierte Medium konnte anschließend bei 31 000 rpm für 3 h in 50 mL Ultrazentrifugationsröhrchen der Firma Beckman Coulter unter Verwendung des Rotors SW32 ultrazentrifugiert werden. Die so konzentrierten Viruspartikel jedes Röhrchens wurden mit 100 µL PBS versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurde im Anschluss ein weiterer Zentrifugationsschritt durch einen Saccharose-Gradienten zur Reinigung der viralen Partikel durchgeführt. Das Pellet der ersten Zentrifugation wurde hierbei in ein mit steril filtrierter 20 % Saccharose-Lösung in PBS gefülltes 12 mL Zentrifugationsröhrchen der Firma Beckman Coulter gegeben und erneut für 3 h bei 41 000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für den IL-10 ELISA wurden ohne anschließende Saccharose-Zentrifugation isolierte Proben verwendet.

Zur Überprüfung der Infektion der Zellen mittels PCR wurde die im Pellet enthaltene virale mRNA mit SuperScript™ III Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Verwendung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Es wurden 200 ng F-MuLV_sense (AAGTCTCCCCCGCCTCTA) und F-MuLV_antisense (AAGTCTCCCCCGCCTCTA) eingesetzt, welche spezifisch innerhalb des *env*-Gens von MuLV (GenBank No: Z11128.1) binden. Es wurde je Ansatz 10 µL des entsprechenden Pellets als Template eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 45 Min. bei 50 °C. Es wurde ein Zweifachansatz je Probe angesetzt, ein Ansatz enthielt die Reverse Transkriptase, im anderen wurde diese durch Wasser ersetzt (Kontrolle ohne Reverse Transkriptase).

Im Anschluss folgte eine PCR mit gleichem Primerpaar bei einer Annealingtemperatur von 53 °C. Eingesetzt wurden 2 µL des cDNA-Templates. Der Ansatz wies ein Endvolumen von 20 µL auf. Nachfolgend wurden die Proben auf ein 1 % Agarose-Gel aufgetragen. Dem Gel wurde der Farbstoff GelRed™ hinzugefügt, der sich in die DNA-Struktur einlagert und bei Anregung durch UV-Strahlung eine detektierbare Fluoreszenz hervorruft. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt.

2.2.8 Charakterisierung von isolierten MuLV-Partikel

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden die isolierten Partikel mit Probenpuffer versetzt und die viralen Proteine mittels 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Als Standard zur Proteinmengenbestimmung wurden verschiedene Mengen an Lysozym mitgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Coomassie-Lösung für etwa 20 Min. unter gleichmäßigem Schwenken eingefärbt. Die anschließende Entfärbung mit Methanol/Acetat-Lösung fand über Nacht bei RT auf einem Schüttler statt.

Des Weiteren wurde eine Western Blot-Analyse der isolierten Partikel durchgeführt. Hierzu wurden Antiseren aus Ziegen, die mit dem Gag-, dem p15E-, sowie dem gp70-Protein des PERV immunisiert wurden, verwendet. Das goat-anti-Gag-Serum wurde 1:100, das anti-gp70-Serum wurde 1:250 und das anti-p15E-Serum wurde 1:200 in 8 % Magermilchpulver in PBS verdünnt eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein anti-goat HRP-Konjugat (Verdünnung 1:2000).

2.2.9 Isolierung und Charakterisierung von Exosomen

Zur Gewinnung von Exosomen wurden *HEK293T*-Zellen mit *tANCHOR*-Plasmiden transfiziert. Nach 48 h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 3 000 g für 10 Min. zentrifugiert. Anschließend folgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei 40 000 g für 3 h unter Verwendung des Rotors SW41 Ti. Das entstandene Exosomen-Pellet aus 6 mL Zellüberstand wurde in 60 µL Probenpuffer aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Charakterisierung des Pellets erfolgte durch Western Blot-Analyse. Eingesetzt wurden die AK rabbit-anti-CD9, rabbit-anti-CD81, sowie ein gegen das mCherry-Protein gerichteter Maus-AK in einer Verdünnung von 1:2000.

Zur Detektion der primären AK diente ein anti-rabbit HRP-, bzw. anti-mouse HRP-Konjugat, welche ebenfalls 1:2000 verdünnt eingesetzt wurden.

2.2.10 Quantitative Bestimmung des Endotoxingehaltes

Die Bestimmung des Endotoxingehaltes der Proben wurde mithilfe des kommerziellen Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Verwendung des Kits richtete sich nach den Herstellerangaben. Der Test beruht auf der Aktivierung eines im Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL) vorhandenen Enzyms, welches durch anwesendes Endotoxin aktiviert wird. Das aktivierte Enzym setzt ein synthetisches Substrat in den

gelben Stoff p-Nitroanilin um, dessen Absorption durch ein Photometer vermessen wird.

Es wurden 50 µL der Proben und des im Kit enthaltenen Endotoxin-Standards in eine 96-well Mikroplatte gegeben. Nach kurzer Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 µL LAL. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde 100 µL Substratlösung zu jedem well gegeben und erneut für 6 Min. inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50 µL 20 % Essigsäure. Anschließend konnte die Absorption bei 405 nm in einem Photometer vermessen werden. Die abschließende Ermittlung der Endotoxin-Konzentration (angegeben in EU/mL) erfolgte durch die Auftragung der Absorptionswerte des Standards gegen die bekannte Konzentration.

2.2.11 Quantitative Bestimmung der IL-10 Freisetzung mittels ELISA

Die Induktion des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 wurde mittels ELISA-Methode untersucht. Verwendet wurde das kommerziell erhältliche *HEK* Kit BD OptEIA™ Set Human IL-10 der Firma BD Biosciences. Die Anwendung richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

Das Zellkulturmedium der im 6-well ausgesäten und mit den jeweiligen *pOUT*-Plasmiden transfizierten *HEK293T*-Zellen wurde abgenommen und die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen, bevor pro well 2 mL RPMI-Medium zugegeben wurden. Andere analysierte Proben wurden in entsprechender Menge und Verdünnung in RPMI-Medium in eine 96-well Plate gegeben. In jedes 6-, bzw. 96-well wurden 3×10^5 PBMC pipettiert. Das Endvolumen eines 96-wells betrug 200 µL. Die mit Probe und PBMCs kokultivierten Platten wurden für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die 96-wells einer Nunc MaxiSorp™ flat-bottom ELISA-Platte wurden über Nacht mit 200 µL in Coating-Puffer 1:250 verdünntem „capture“-AK anti-human-IL-10 bei 4 °C beschichtet. Nach dreifachem Waschen mit 0,05 % Tween-20® in PBS (Waschlösung) konnten im Folgenden mögliche freie Bindungsstellen der 96-well Plate mit Blockierlösung (10 % FKS in PBS) für 1 h bei RT geblockt werden, um eine unspezifische Bindung des IL-10-Proteins, sowie sekundären AKs an die Plastikoberfläche der wells zu verhindern. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 µL der Proben und Standards in die entsprechenden wells pipettiert. Als Standard wurde das im IL-10 Kit enthaltene lyophilisierte IL-10-Protein verwendet. Aus einer Stocklösung mit einer Konzentration von 500 pg/mL wurden serielle Verdünnungen à 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 und 7,8 pg/mL angelegt. Des Weiteren wurde als Kontrolle eine LPS-Verdünnungsreihe mitgeführt.

Nach 2 stündiger Inkubation bei RT und darauffolgendem fünfmaligem Waschen wurden zu jedem well 100 µL einer Mischung aus in Blockierlösung 1:1000 verdünntem anti-human-IL-10 als sekundärer AK, sowie 1:250 verdünnter Streptavidin-markierter Meerrettich-Peroxidase gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten sieben Waschschritte. Anschließend wurden je well 100 µL TMB-Substratlösung der Firma BD Biosciences zugegeben und die Platte im Dunkeln für etwa 30 Min. gelagert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 50 µL 2N H₂SO₄ konnte die Absorption bei

einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm am MultiScan Go Photometer ausgelesen werden. Im ELISA wurden je well einer Dreifachbestimmung 15 μ L der isolierten, an die Dynabeads gebundenen Proteinsuspension eingesetzt (siehe 2.2.4 Isolierung des *pOUT*-Proteins). Daneben kamen 30 μ L des in 100 μ L resuspendierten MuL-Viruspellets, sowie 10 μ L des resuspendierten Exosomen-Pellets zum Einsatz.

Sollte der Einfluss von exprimiertem *pOUT*-Protein, sowie der MuLV-Partikel oder Exosomen mithilfe eines ELISA untersucht werden, so wurde als Kontrolle hitzeinaktivierte Probe mitgeführt. Das Protein wurde durch das 30-minütige Kochen bei 98 °C denaturiert und somit biologisch inaktiviert. Da Pyrogene wie LPS hitzebeständig sind, kann somit der Einfluss des LPS auf die IL-10-Sekretion durch PBMCs ermittelt werden (Gao et al., 2006).

3 Ergebnisse

3.1 Expression der *pOUT*- und der *tANCHOR*-Systeme

Die Analyse des *pOUT*-, bzw. *tANCHOR*-Systems wurde mittels Western Blot-Analyse der Zellkulturüberstände von *pOUT*-transfizierter Zellen, die Expression des *tANCHOR*-Proteins durch konfokale Lasermikroskopie untersucht.

Das *tANCHOR*-System, als eines der zwei zur Expression der *isu*-Domäne verwendeten Proteinexpressionssysteme, bewirkt die Expression der *isu*-Domäne auf der Zelloberfläche von humanen Zellen. Hierbei wird das Tetraspanin-Protein CD82 verwendet, welches als ubiquitär exprimiertes Oberflächenprotein der Tetraspanin-Familie unter anderem eine Rolle in der Motilität und Invasivität von Tumoren, sowie der Antigenpräsentation von Zellen durch den MHC-Komplex spielt (Fedor Berditchevski, 2013).

Die HEK293T-Zellen wurden mit den beiden Vektoren *pCMV-CD82-YFP* und *pCMV-CD82 Δ LEL-*isu*-mCherry* kotransfiziert. Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz und der Oberflächenexpression der *tANCHOR*-Proteine erfolgte eine separate Anregung der Fluoreszenzproteine bei 514 (YFP), bzw. 543 nm (mCherry). Die Emissionssignale des YFP und des mCherry-Proteins wurden detektiert und sind in Abbildung 3 dargestellt.

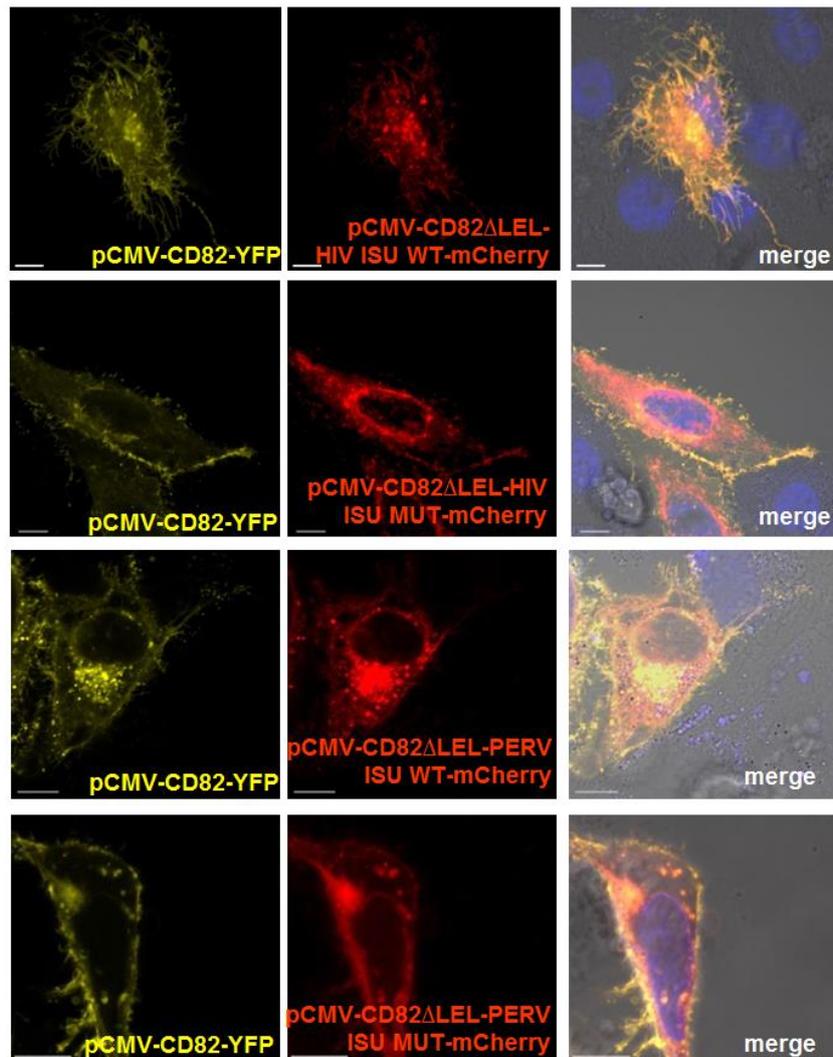


Abbildung 3: Proteineexpressionsanalyse mittels cLSM. Links: Detektierte Fluoreszenz des mit YFP-markiertem CD82-Proteins nach Anregung bei 514 nm. Mitte: Detektierte Fluoreszenz nach Anregung bei 543 nm. Filter: YFP: 516-578 nm; mCherry: 578-696 nm. Verwendetes Objektiv: 63x/1.40 Öl. Rechts: Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale und dem Transmissionskanal. CMV steht für den verwendeten Promoter des Cytomegalovirus (CMV). Länge der Maßstabsbalken beträgt 10 μm .

Bei Betrachtung der mit dem Vektor *pCMV-CD82-YFP* transfizierten Zellen ließ sich erkennen, dass das Protein dominant auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wodurch die Zellbegrenzungen deutlich erkennbar sind. Die ebenfalls fluoreszierenden Ausstülpungen der Zellen lassen darauf schließen, dass CD82 auch in den Pseudopodien lokalisiert ist, wo es eine wichtige regulatorische Rolle bei der Ausbildung der Plasmaausstülpungen spielt (Bari et al., 2011). Bei den vereinzelt gelben Flecken und Punkten innerhalb der Zelle handelt es sich vermutlich um Endosomen in sogenannten multivesikulären Körpern, die der Proteinspeicherung und dem Transport dienen (Piper and Katzmann, 2007).

Bei Anregung des Fluoreszenzproteins mCherry zeigt sich ein vergleichbares Bild. Das CD82 befindet sich größtenteils innerhalb der Plasmamembran, jedoch lässt sich im Vergleich zum YFP-markierten Protein eine vermehrte Lokalisation auch innerhalb des Cytosols erkennen. Die Pseudopodien weisen ebenfalls eine

Fluoreszenz auf, was besonders bei Betrachtung der überlagerten Fluoreszenzsignale (merge) zu erkennen ist.

Zur Analyse der Sekretion des pOUT-Proteins durch die transfizierten Zellen wurden die His-Tag Dynabeads mit dem Zellüberstand der entsprechend transfizierten Zellen versetzt. Die Detektion des Proteins erfolgte anhand einer Western Blot-Analyse unter Verwendung eines mouse-anti-V5 AKs (Abb. 4).

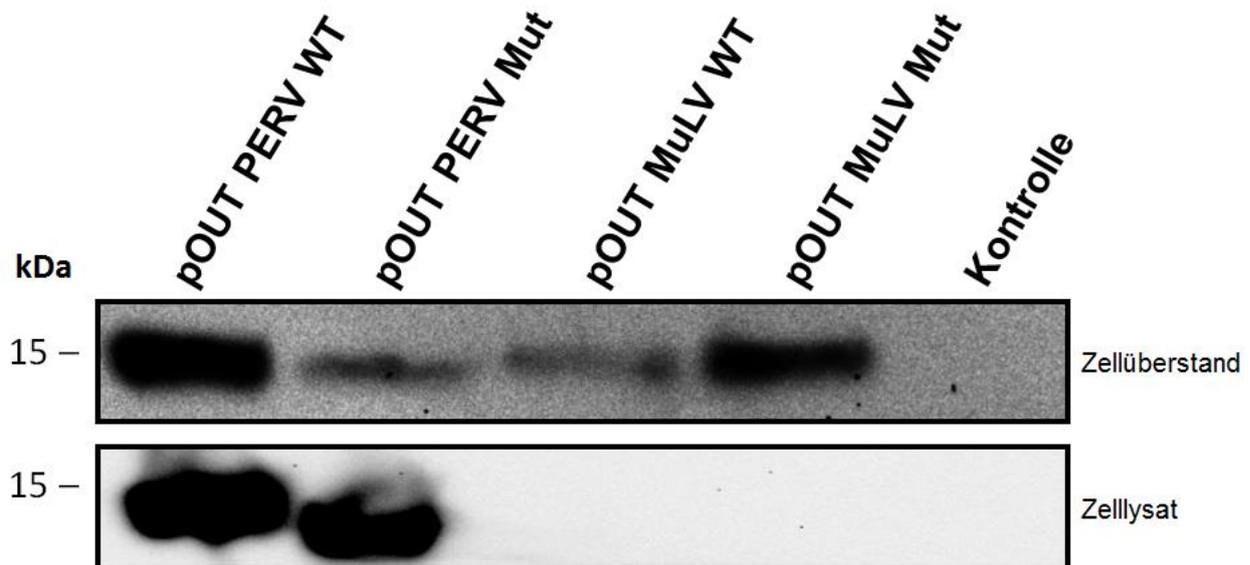


Abbildung 4: Western Blot-Analyse des durch His-Tag Dynabeads isolierten pOUT-Proteins transfizierter HEK293T-Zellen. Aufgetragen wurden 20 μ L des in 20 μ L PP eluierten Proteins. Der mouse-anti-V5 AK wurde in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Zur Detektion diente ein 1:2000 verdünntes anti-mouse HRP-Konjugat. Als Kontrolle dienen untransfizierte Zellen. Die Detektion erfolgte über eine ECL-Reaktion.

Das aus dem Zellüberstand gewonnene Eluat zeigte deutliche Proteinbanden, die etwa auf Höhe der 15 kDa Markerbande lagen. *pOUT*-PERV Wildtyp (WT) und *pOUT*-MuLV Mutante (Mut) zeigten hierbei unter der ChemoCam das höchste Lumineszenz-Signal. Im aufgetragenen Zelllysat zeigten lediglich die mit *pOUT*-PERV WT- und -PERV Mut-DNA transfizierten Zellen eine Proteinbande, welche ebenfalls auf Höhe von 15 kDa lag (Abb. 4). Die Kontrolle aus untransfizierten Zellen zeigte weder im mit Dynabeads® behandelten Zellüberstand, noch im Zelllysat eine Bande. Das *pOUT*-HIV-WT-Protein der sekretierenden Zellen konnte im Zellkulturüberstand ebenfalls mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 5). Die Analyse ließ im aufgetragenen *pOUT*-HIV Mut keine Proteinbande erkennen. Es zeigte sich im Vergleich zu den pOUT-Proteinen des PERV und MuLV eine erhöhte Proteinmasse, die zwischen 25 und 35 kDa lag. Die Sequenz des gp41 von HIV-1 weist mehrere Modifizierungsstellen auf (GenBank No: P04578), wodurch das Protein durch die mehrfache Glycosylierung ein erhöhtes Molekulargewicht aufweist (Abb. 5). Diese Glycosylierungsstellen sind im Hüllprotein p15E von PERV und MuLV nicht zu finden (GenBank No (MuLV-p15E): P03390).

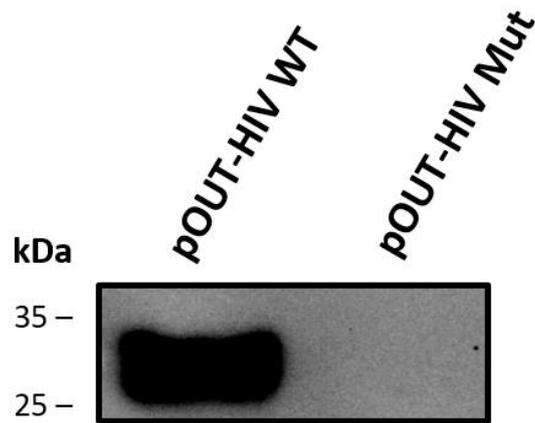


Abbildung 5: Western Blot-Analyse des isolierten Proteins aus dem Zellkulturüberstand von mit *pOUT*-HIV-WT und Mut transfizierten 293T-Zellen. Aufgetragen wurden 20 μ L des in 20 μ L PP eluierten Proteins. Es wurde ein 1:2000 verdünnter mouse-anti-V5, sowie ein 1:2000 verdünntes anti-mouse HRP-Konjugat eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem ECL-Substrat.

Durch konfokale Lasermikroskopie und Western Blot-Analyse ließ sich die Effizienz der Expressionssysteme untersuchen. Das *tANCHOR*-System bewirkt eine effiziente, selektive Präsentation des Proteins auf der Zelloberfläche. Die Sekretion des *pOUT*-Systems konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Das sekretierte MuLV- und PERV-*pOUT*-Protein ließ sich durch eine Western Blot-Analyse mit mouse-anti-V5 AK spezifisch detektieren.

3.2 Charakterisierung der MuLV-Partikel

Zur Überprüfung der MuLV-Infektion der kultivierten *M. dunnii* Zellen wurde die mRNA aus dem Ultrazentrifugationspellet in cDNA umgeschrieben und anschließend eine PCR durchgeführt (Abb. 6).

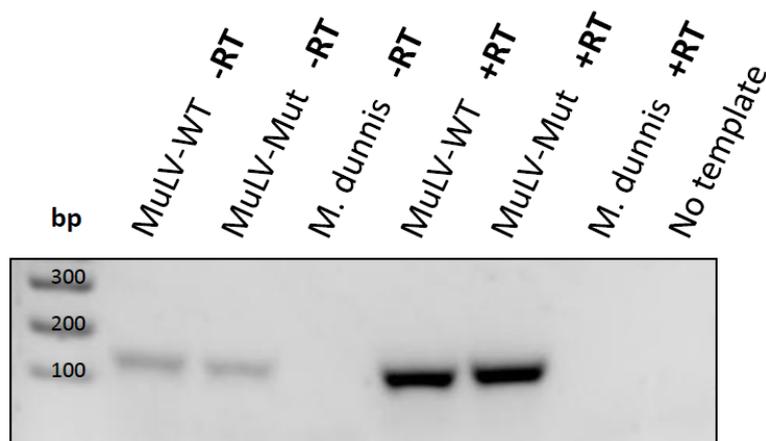


Abbildung 6: 1 % Agarose-Gel der PCR-Reaktion in den pelletierten MuLV-Partikel. -RT: Pellet wurde nicht mit Reverser Transkriptase versetzt. +RT: Probe wurde vor der PCR durch den Einsatz der Rev. Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Durch die Zugabe des GelRed™ zum Agarosegel ließ sich bei der nach der reversen Transkriptase amplifizierten MuLV WT- und MuLV Mut-DNA unter der UV-Lampe ein

ausgeprägtes Fluoreszenzsignal detektieren. Die ohne vorherigen Reverse Transkriptase-Schritt amplifizierte DNA (-RT-Kontrolle) ließ bei MuLV WT und Mut ebenfalls schwache Banden erkennen, die auf die Verunreinigung der Proben mit zellulärer DNA hinweist. Vergleicht man die Intensität der Banden beider Ansätze, so deuten die deutlich stärker ausgeprägten Fluoreszenzbanden (mit Reverser Transkriptase behandelten Ansätze) auf einen positiven Nachweis viraler MuLV-mRNA im konzentrierten Pellet des Zellüberstandes hin. Sowohl die *M. dunnii* Zellen, als auch die Kontrolle ohne eingesetztes Template zeigten kein Fluoreszenzsignal.

Die pelletierten Viruspartikel sollten ebenfalls durch eine Western Blot-Analyse charakterisiert werden. Die mittels Ultrazentrifugation angereicherten MuLV-Partikel wurden durch Western Blot-Analysen charakterisiert. Zur Abschätzung der Proteinmenge der Pellets wurde Lysozym ausverdünnt, im SDS-Gel aufgetrennt und ebenfalls mit dem Farbstoff Coomassie gefärbt (Abb. 7).

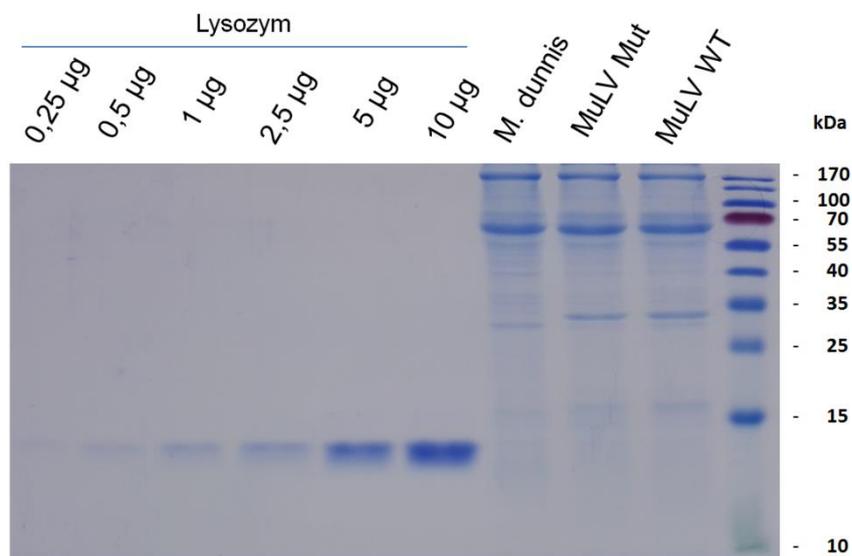


Abbildung 7: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. Aufgetragen wurden 5 µL der entsprechenden pelletierten MuLV-Partikel, sowie verschiedene Lysozym-Mengen als Kontrolle.

Das eingefärbte Gel ließ bei mit den MuLV infizierten, sowie den uninfizierten *Mus dunnii*-Zellen eine Bande etwas unter der 70 kDa Markerbande erkennen. Da diese bei allen drei Proben gleichermaßen stark ausgeprägt war, handelte es sich hierbei vermutlich um restliches Serumalbumin. Des Weiteren waren bei MuLV WT und Mut eine etwa 30 kDa große Proteinbande ersichtlich. Bei den *M. dunnii* Zellen besaß diese ein etwas geringeres Molekulargewicht. Ein ähnliches Muster war bei den etwas über 15 kDa liegenden Proteinbanden zu erkennen. Eine Abschätzung der Proteinmenge anhand der Software „ImageJ“ ergab für das 30 kDa große Protein eine MuLV WT-Probenmenge von etwa 4,6 µg, der MuLV Mut-Probenmenge von etwa 3,9 µg und eine Proteinmenge der *M. dunnii*-Probe von etwa 1,8 µg.

Die Charakterisierung der MuLV-Partikel erfolgte durch Western Blot-Analysen unter Nutzung verschiedener Ziegenseren gegen die Virusproteine Gag, p15E, sowie gp70 von PERV, die kreuzreaktiv sind (Abb. 8).

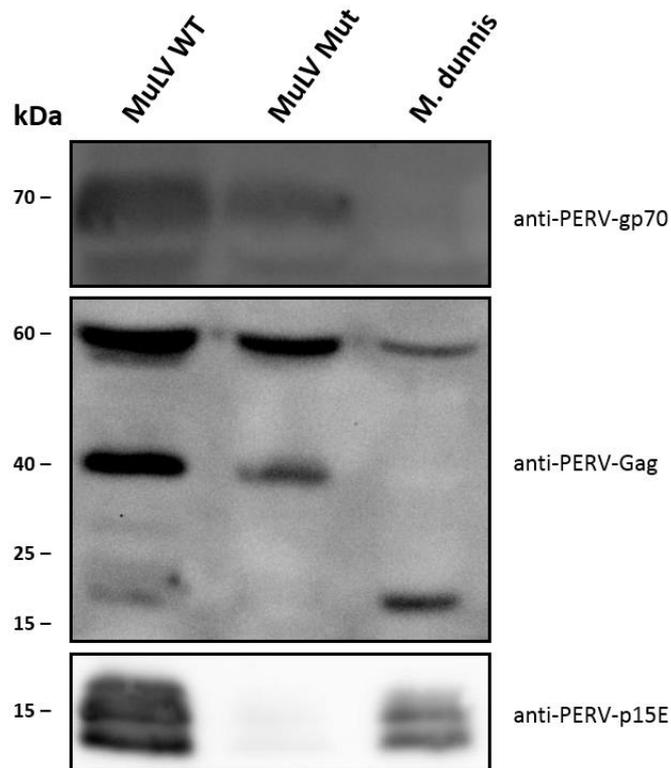


Abbildung 8: Western Blot-Analyse der durch Ultrazentrifugation bei 31 000 rpm pelletierten MuLV-Partikel mittels Ziegenseren gegen PERV-Gag, -gp70, sowie -p15E. Die Antigene wurden in drei unterschiedlichen Blots nachgewiesen. Die Antiseren wurden in folgender Verdünnung in 8 % Milchpulver in PBS eingesetzt: anti-PERV-Gag: 1:100; anti-PERV-gp70: 1:250; anti-PERV-p15E: 1:200. Die Detektion erfolgte über eine ECL-Reaktion.

Die mit anti-PERV-gp70 inkubierte Membran zeigt bei MuLV WT und MuLV Mut eine Bande auf Höhe der 70 kDa Markerbande. Unter dieser, ließen sich bei beiden Proben eine relativ schwach ausgeprägte Bande eines Proteins mit etwas kleinerem Molekulargewicht erkennen. Die *M. dunnis* Zellen zeigten keine Banden. Die Kreuzreaktivität der gegen PERV-Antigene gerichteten AK mit denen des MuLV zeigt sich auch beim Gag-Protein des MuLV. MuLV WT und Mut ließen beide beim Einsatz des anti-PERV-Gag AK zwei Banden, auf Höhe von 60 kDa und 40 kDa, erkennen. Auch die uninfizierten *Mus dunnis* Zellen wiesen eine etwas schwächer ausgeprägte Bande auf der Höhe von 60 kDa auf. Es konnte jedoch keine 30 kDa Proteinbande detektiert werden. Auf Höhe von etwa 15 kDa zeigten die *M. dunnis* Zellen eine weitere Bande.

Durch Inkubation der Membran mit gegen PERV-p15E gerichtetem Antikörper wurde bei den mit MuLV WT, sowie den *M. dunnis* Zellen eine Doppelbande sichtbar, deren obere auf Höhe der 15 kDa Markerbande lag. Bei der Probe mit MuLV Mut konnte kein Signal bei der Inkubation mit anti-PERV-p15E detektiert werden.

Anhand der Durchführung einer PCR mit der cDNA des ultrazentrifugierten Pellets aus Zellüberständen konnte die Infektion von *M. dunnis*-Zellen mit dem MuLV-Virus erfolgreich nachgewiesen werden. Ein etwa 30 kDa großes Virusprotein ergab bei einer abschätzenden Proteinmessung einen Gesamtgehalt im Gel von 4,6 µg bzw. 3,9 µg bei 5 µL auf das Gel aufgetragenem Probenvolumen. Durch gegen die

Virusproteine gp70, Gag, sowie p15E AK konnten die im Ultrazentrifugationspellet des Zellüberstandes infizierter Zellen befindlichen MuL-Viren charakterisiert werden.

3.3 Detektion und Charakterisierung der Exosomen

Die isolierte Exosomenfraktion transfizierter *HEK293T*-Zellen wurde durch Western Blot-Analysen auf das Vorhandensein des mCherry-getagten *tANCHOR*-Proteins getestet. Der Zellüberstand der mit *tANCHOR*-Plasmid transfizierten Zellen wurde zur Gewinnung der Exosomen bei 40 000 rpm zentrifugiert. Das *tANCHOR*-Protein in den Exosomen wurde durch eine Western Blot-Analyse mittels eines anti-mCherry AK nachgewiesen (Abb. 9).

Das mCherry-Signal war in dem Pellet des pelletierten Zellkulturüberstandes nur geringfügig erkennbar. In allen Ansätzen ließen sich jedoch Proteinbanden erkennen.

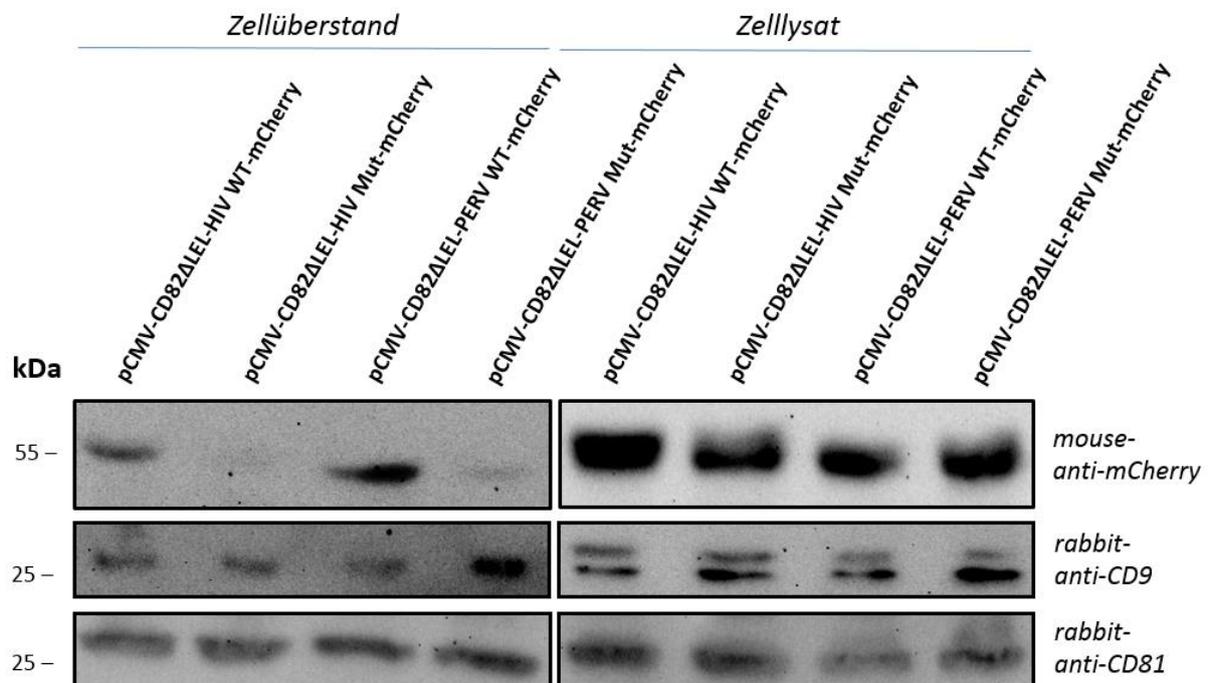


Abbildung 9: Western Blot-Analyse des ultrazentrifugierten Zellkulturüberstandes mit *tANCHOR* transfizierten *HEK293T*-Zellen. Der mouse-anti-mCherry AK wurde 1:1000 in 8 % Milchpulver in PBS verdünnt eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein anti-mouse HRP Konjugat. Der anti-CD9 AK, sowie der anti-CD81 AK wurden 1:2000 verdünnt eingesetzt. Hier diente zur Detektion ein anti-rabbit HRP als sekundärer AK. Die Detektion erfolgte über eine ECL-Reaktion.

Die Banden des HIV WT und PERV WT zeigten hierbei das stärkste Signal. Es ließen sich in allen Proben eine Bande auf Höhe von 55 kDa erkennen. Das Zellpellet wies deutlich stärker ausgeprägte Banden auf. Ähnlich wie im Zellüberstand der mit *pCMV-CD82ΔLEL-PERV-WT-mCherry* transfizierten *HEK293T*-Zellen zeigten sich auch hier in allen Ansätzen eine Bande auf Höhe von 55 kDa.

Bei der Anwendung eines rabbit-anti-CD9 AK zeigten sich sowohl im Zellüberstand, als auch im Lysat deutliche Proteinbanden etwa auf Höhe der 25 kDa Markerbande.

Im Zelllysate war oberhalb der 25 kDa eine weitere, schwächer ausgeprägte Bande ersichtlich. Die Inkubation mit rabbit-anti-CD81 zeigte ebenfalls deutliche Banden, deren Protein die gleiche Masse, wie das der anti-CD9 Banden aufwies.

Die Tetraspanin-Proteine CD9 und CD81 dienen, besonders neben CD63, als Markerproteine für Exosomen (Andreu et al., 2014). CD9 und CD81 ließen sich im Pellet des zentrifugierten Überstands der mit *tANCHOR*-transfizierten *HEK293T* ebenso wie das Protein CD82 Δ LEL-HIV-, bzw. CD82 Δ LEL-PERV-mCherry durch eine Western Blot-Analyse nachweisen.

3.4 Analyse des Endotoxingehaltes in den Proteinproben

Da auch Pyrogene, wie LPS, eine Expression von IL-10 hervorrufen, ist die Analyse der Proben auf mögliche LPS-Kontaminationen für die Zuordnung der immunsuppressiven Eigenschaft zum exprimierten Protein essentiell. Zur Bestimmung des Endotoxingehaltes wurde das kommerzielle Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Bestimmung des Endotoxin-Gehaltes aus den Absorptionwerten erfolgte durch eine Standardkurve (Abb. 10).

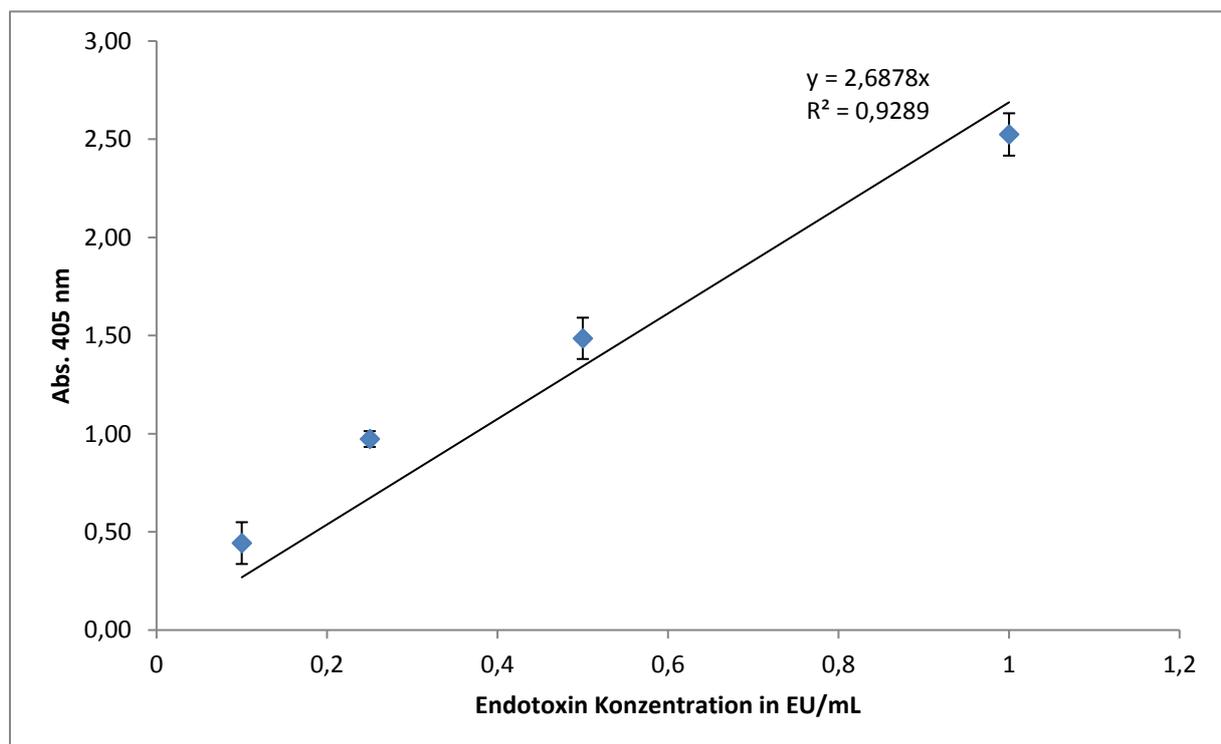


Abbildung 10: Standardkurve zur Berechnung des Endotoxin-Gehaltes. Dargestellt ist das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung, sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

Die durch das Saccharose-Kissen gereinigten Viruspartikel zeigten eine starke Kontamination mit Endotoxin (Abb. 11). Das getestete PBS zeigte ein nur sehr geringfügiges Signal, wohingegen die Saccharose-Lösung deutlich mehr Endotoxin enthielt. MuLV WT-, Mut- und *M. dunni*-Partikel unterschieden sich im Endotoxin-Gehalt nur gering, wobei *M. dunni*-Partikel die niedrigsten LPS-Kontaminationswerte aufwiesen.

Die ohne anschließenden Reinigungsschritt durch die Saccharose-Lösung isolierten Partikel zeigten hierzu im Vergleich deutlich verringerte Endotoxin-Werte (Abb. 12). Dieser war im Vergleich zum Endotoxin-Gehalt der 2 μ L *M. dunni*-Probe auf etwa 1/7 reduziert.

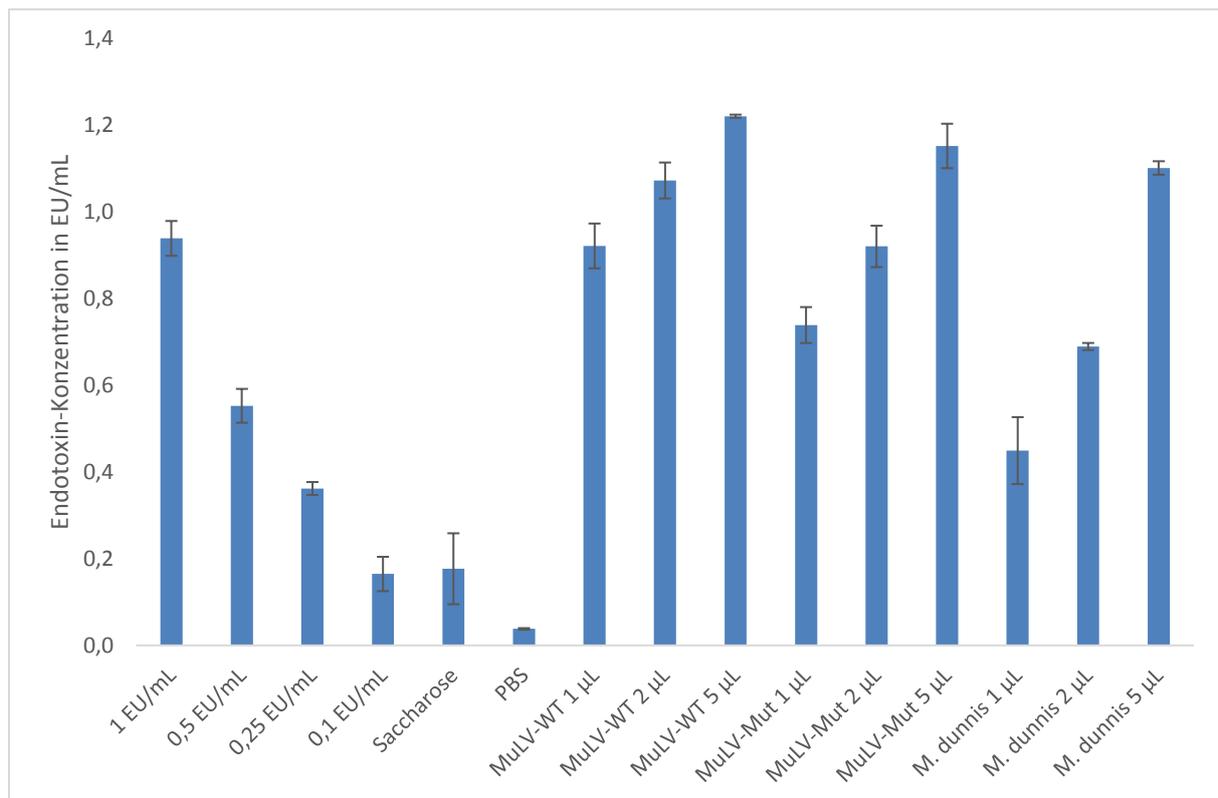


Abbildung 11: Ergebnis des LAL-Tests zur Detektion bakterieller Endotoxine. Die Ermittlung des Endotoxin-Gehaltes wurde mithilfe der Standardkurve (Abb. 10) durchgeführt. Dargestellt sind die Endotoxin-Gehalte des Testansatzes. Dargestellt ist das arithmetische Mittel einer Dreifachbestimmung. Dargestellte Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Beschriftung der Proben beinhaltet das im Test eingesetzte Probenvolumen.

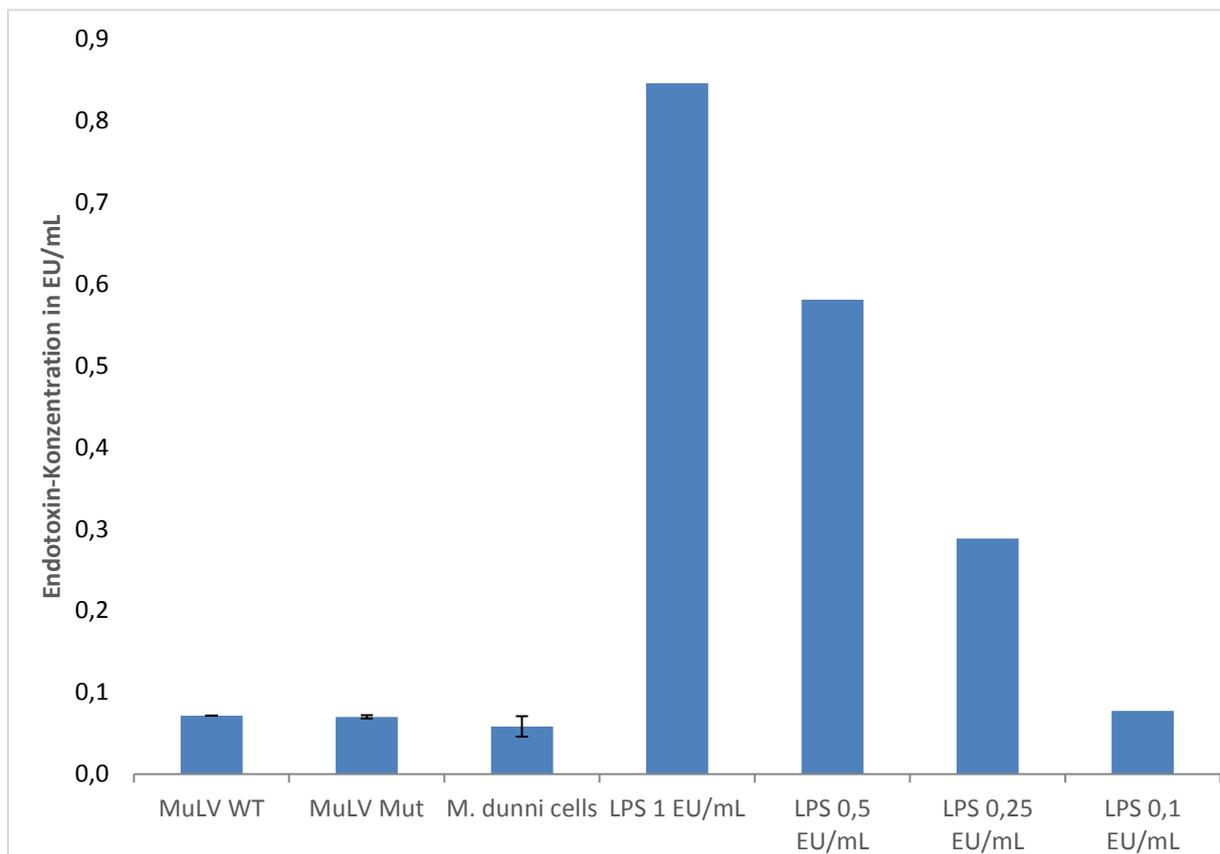


Abbildung 12: Ergebnisse des LAL-Tests der ohne nachfolgenden Saccharose-Zentrifugation pelletierten Viruspartikel. Es wurde ein Probenvolumen von 2 μ L eingesetzt. Aufgetragen ist das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung. Die LPS-Standards wurden in Einfachbestimmung getestet.

3.5 IL-10-Induktion durch die *isu*-Domäne

Die Induktion des Zytokins IL-10 in PBMCs durch die *isu*-Domäne der Viren HIV, PERV und MuLV wurde unter Verwendung eines ELISAs gemessen.

Zusätzlich zu den das *pOUT*-Plasmid sekretierenden HEK293T-Zellen wurden im ELISA das durch die Dynabeads isolierte *pOUT*-Protein für einen direkten Test eingesetzt. Des Weiteren wurden isolierte Exosomen der mit *tANCHOR*-Plasmid transfizierten Zellen verwendet. Diese trugen einen CD82 Tetraspanin-Anker auf der Oberfläche, dessen LEL um die *isu*-Domäne der Viren erweitert wurde. Die isolierten MuLV-Partikel wurden ebenfalls auf die Induktion von IL-10 getestet.

Die *pOUT* sekretierenden Zellen ließen im ELISA keine IL-10-Induktion erkennen (Abb. 13). Das isolierte und gereinigte *pOUT*-Protein zeigte bei Vergleich mit den mit Überstand untransfizierter Zellen behandelten Dynabeads ebenfalls keine IL-10-Induktion. Die Hitzeinaktivierung des an die Beads gebundenen Proteins bei 98 °C zeigte keinen Unterschied in der IL-10-Induktion. Dies konnte ebenfalls mit TAK-242-inkubierten PBMCs beobachtet werden.

Die durch Ultrazentrifugation pelletierten Exosomen der mit *tANCHOR*-Plasmid transfizierten Zellen zeigten vergleichsweise stark erhöhte IL-10-Werte von bis zu 46,9 pg/mL. Zu erkennen war jedoch, dass die PERV Mut im Vergleich zum WT

mehr IL-10 zu induzieren schienen. Bei HIV war dies nicht der Fall. Die CD82 Δ LEL-PERV-isu WT präsentierenden Exosomen zeigten im ELISA keine IL-10-Induktion, da diese sich, im Gegensatz zu den anderen verwendeten Exosomen-Proben, nicht von dem aus Zellüberstand untransfizierter Zellen gewonnenen Pellet unterschied. Für eine abschließende Interpretation der Ergebnisse ist eine Ermittlung des Proteingehaltes der verschiedenen Proben vonnöten, da die Western Blot-Analyse eine unterschiedliche Proteinkonzentration zwischen den vier Proben erkennen ließ (Abb. 9).

Isolierte MuLV-Partikel zeigten im ELISA eine relativ starke Induktion des IL-10 in PBMCs (Abb. 14). Die IL-10-Konzentrationen der Probenansätze erreichten Werte von bis zu 200 pg/mL. Die für den ELISA der MuLV-Partikel verwendeten PBMCs entstammten jedoch aus Buffy-Coat eines anderen Spenders. Die ermittelte IL-10-Konzentration des mit MuLV WT versetzten Ansatzes unterschied sich nicht von den mit der Mutante behandelten PBMCs. Beide Ansätze zeigten bei einem Vergleich mit dem mit Pellet des Überstandes der *M. dunnii*-Zellen versetzten Ansatz jedoch eine erhöhte IL-10-Konzentration.

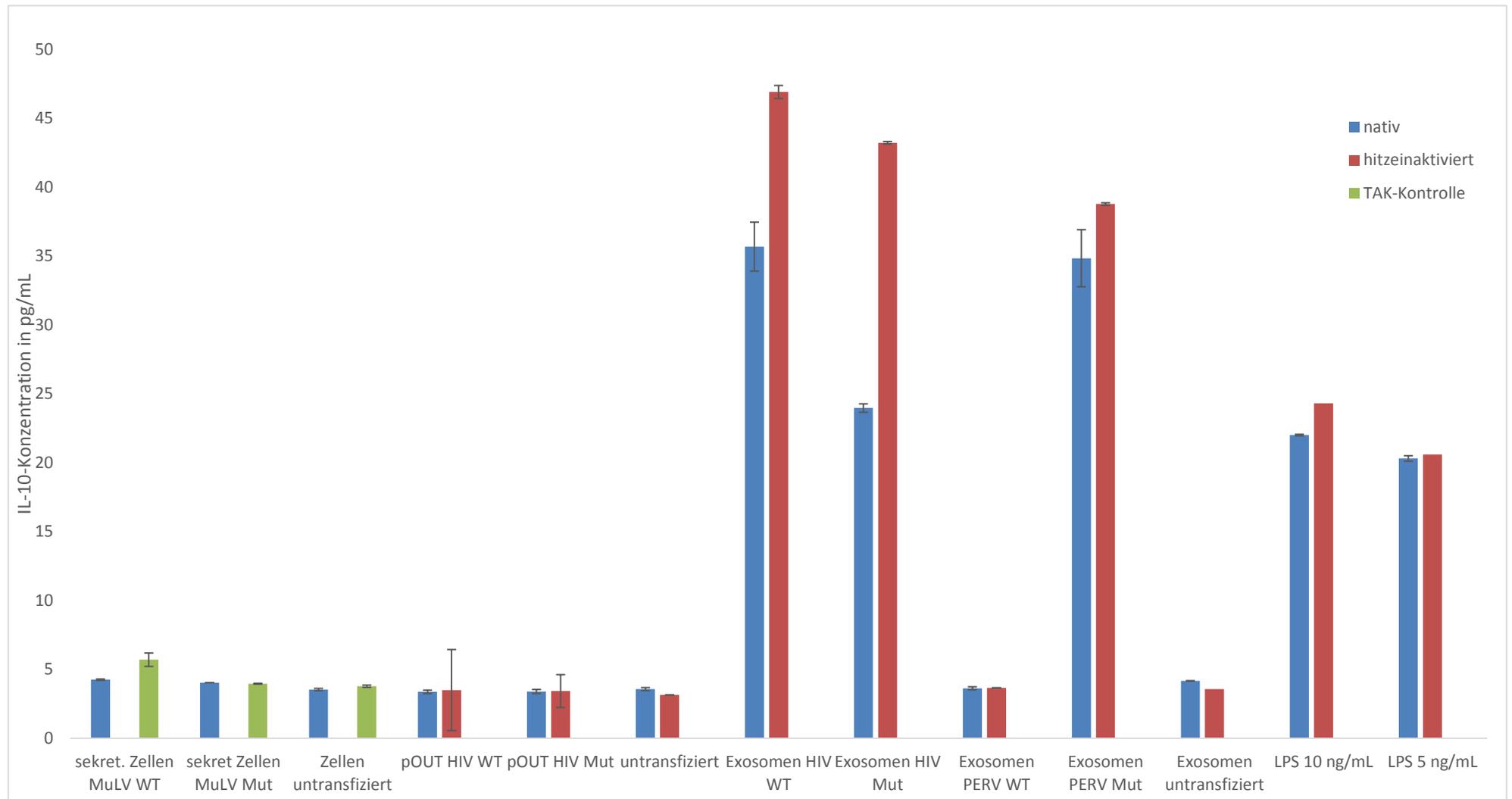


Abbildung 13: Ergebnis des IL-10 Assays mit exprimierten *isu*-Proteinen. Getestet wurden neben den *pOUT*-Protein sekretierenden *HEK293T*-Zellen das, isolierte *pOUT*-Protein, sowie die Exosomen der mit *pCMV-CD82ΔLEL-isu*-Plasmid transfizierten Zellen. „Nativ“: unbehandelte Probe wurde eingesetzt; „TAK-Kontrolle“: Die mit entsprechender Probe versetzten PBMCs wurden mit dem TLR-4-Inhibitor TAK-242 behandelt; „hitzeinaktiviert“: Die Probe wurde für 5 Min. bei 98 °C hitzeinaktiviert. Als Kontrolle diente ein LPS-Standard unterschiedlicher Konzentration.

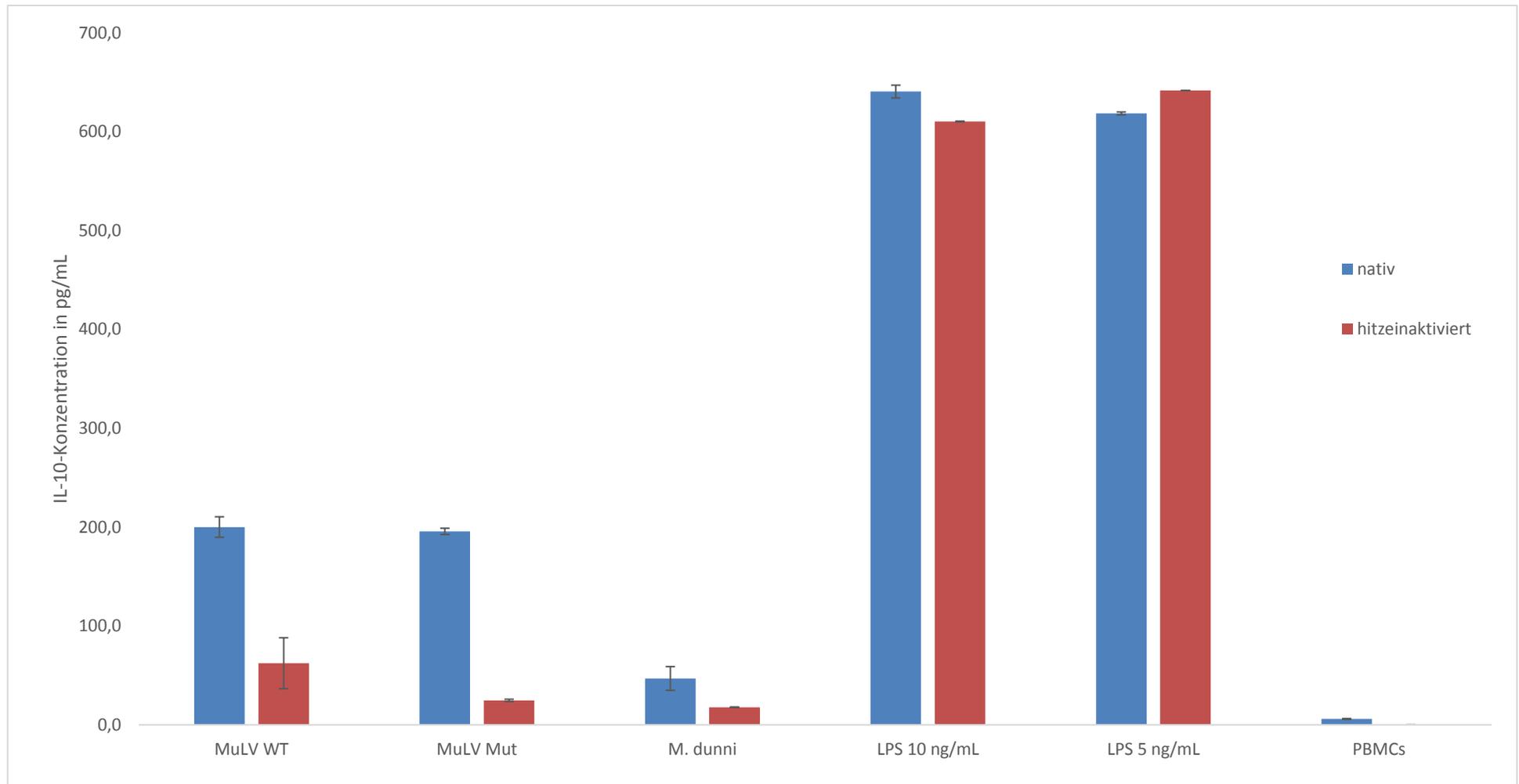


Abbildung 14: Ergebnis des IL-10 Assays mit eingesetzten MuLV-Partikeln. Eingesetzt wurden 30 μL der in 100 μL resuspendierten Pellets aus 50 mL Zellkulturüberstand. Als Kontrolle wurde ein LPS-Standard eingesetzt. „nativ“: Proben wurden unbehandelt eingesetzt; „hitzeinaktiviert“: Proben wurden vor dem Einsatz für 5 Min. bei 98 °C hitzeinaktiviert.

4 Diskussion

4.1 Gelungene Expression der *isu*-Domäne in beiden Systemen

Die *isu*-Domäne wurde durch die Expressionssysteme *tANCHOR* und *pOUT* zum einen auf der Zelloberfläche von *HEK293T*-Zellen präsentiert, zum anderen in das umgebende Zellmedium sekretiert. Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop zeigten eine deutliche mCherry-Fluoreszenz an den Zellbegrenzungen. Das überlagerte Signal der Fluoreszenzproteine CD82-YFP und CD82 Δ LEL-mCherry ließ kaum Unterschiede erkennen. Die Veränderung der Tetraspaninstruktur schien keinen relevanten Einfluss auf die Oberflächenexpression zu besitzen. Mögliche Unterschiede in der Stärke des Fluoreszenzsignals von YFP und mCherry sind auf die Unterschiede in der Helligkeit des abgestrahlten Lichtes zurückzuführen.

Western Blot-Analysen des sekretierten *pOUT*-Proteins zeigten deutliche Banden, sowohl bei der Analyse des Zelllysats, als auch des Zellüberstandes. Das *pOUT*-HIV-Mut-Protein ließ sich durch einen Western Blot nicht nachweisen (Abb. 5). Ob dies durch eine erfolglose Transfektion, eine zu geringe Proteinkonzentration, oder eine ungenügende Bindung durch die Dynabeads® auftrat, bleibt zu klären. Auffällig war, dass die Zelllysate der mit *pOUT*-PERV WT und Mut transfizierten Zellen bei Inkubation mit mouse-anti-V5 AK intensive Proteinbanden zeigten, die im *pOUT*-MuLV-WT- und -Mut-Lysat nicht ersichtlich waren. Ein Alignment der Sequenz des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV und MuLV zeigt neben weitgehender Übereinstimmung besonders zwischen den AS 113 und 118 markante Unterschiede (Abb. 15). Erkennbar ist, dass die AS Glu₁₁₃, Glu₁₁₅, Lys₁₁₆ und Phe₁₁₈ des MuLV-p15E Proteins durch vier Arginine in der p15E-Sequenz des PERV ersetzt sind.

p15E PERV	1	MGVKVLFALICIAVAEAEFQLLITGPQQLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTS
p15E MuLV	1	MGVKVLFALICIAVAEAEFQL--TTALVATQQFQQLHAAVQDDLKEVEKSITNLEKSLTS
		***** * ** * * * * * * * *
p15E PERV	61	LSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRERLRRRRREEA
p15E MuLV	59	LSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLSQRQKLFES
		***** ** * * * * * * * *
p15E PERV	121	DQGWFEQWFN--IDFGKPIPNPLLGLDSTPGHHHHHHHM
p15E MuLV	119	SQGWFEQWFNRSIDFGKPIPNPLLGLDSTPGHHHHHHHM
		***** *****

Abbildung 15: Alignment der p15E-Proteinsequenz von PERV und MuLV. Die Sternchen markieren Übereinstimmungen in der Sequenz zwischen beiden Viren, eine Lücke deutet auf Unstimmigkeiten hin. Rot markiert ist die Arg-reiche Region des p15E von PERV.

Die Repetition von Arg-Aminosäuren innerhalb eines kurzen Proteinabschnittes ist vergleichbar mit denen der Arginin/Serin-reichen Proteinfamilie, die häufig im Nukleus lokalisiert als Protein-splicing Faktoren wirken (Isshiki et al., 2006; Manley

and Krainer, 2010). Durch die Sequenzhomologie des Arg-reichen Proteinabschnittes zwischen PERV-p15E und den splicing-Faktoren könnte es zu einer unvollständigen Sekretion des *pOUT*-PERV-Proteins kommen.

4.2 Infizierte *M. dunnii*-Zellen produzieren Viruspartikel

Der Zellüberstand potentiell mit MuLV infizierter *M. dunnii*-, sowie uninfizierter Zellen wurde gesammelt und die Viruspartikel wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde zur Detektion der sekretierten Viruspartikel mit reverser Transkriptase behandelt und die cDNA anschließend durch eine PCR amplifiziert. Die durch den Fluoreszenzfarbstoff GelRed™ gefärbten DNA-Banden des Agarosegels wiesen auf im Pellet vorhandene Viruspartikel hin. Die verwendeten Primer amplifizierten spezifisch einen Teil des *env*-Gens des MuL-Virus (Abb. 6).

Mittels Western Blot-Analysen der Viruspartikel konnten die Virusproteine Gag, p15E und gp70 nachgewiesen werden. Die Inkubation mit goat-anti-gp70 und goat-anti-p15E AK ergab zwei Banden. Hierbei könnte es sich um die Virusproteine gp85, gp70, bzw. p15E und p12E handeln (Abb. 8). Auffällig ist die Expression des Gag-Polyproteins (60 kDa), sowie dessen Untereinheit, dem Matrixprotein p15, durch uninfizierte *M. dunnii*-Zellen, die auf im Genom der Zellen vorhandenen endogenen Viren zurückzuführen sind. Das Genom der Maus besteht bis zu 10 % aus endogenen Retroviren, die sich im Laufe der Evolution durch eine Infektion in das Genom einbauten (Stocking et al., 2008).

Auch das virale p15E konnte durch einen goat-anti-p15E AK im Überstand der *M. dunnii*-Zellen detektiert werden. Die Expression des Virusproteins durch immortale, jedoch nicht mit Virus infizierten Zelllinien der Maus ist bereits mehrfach berichtet (Schmidt et al., 1988). Die Expression des p15E führte zu Tumorwachstum *in vivo* in proliferationsunfähigen MCA205 und CL8.1 Mauszellen in immunkompetenten Mäusen (Mangeney et al., 1998), was auf die immunsuppressive Eigenschaft des TM-Proteins zurückzuführen ist.

Die Inkubation mit goat-anti-Gag AK ergab neben dem Precursor-Protein eine weitere Bande auf Höhe der 40 kDa Markerbande. Laut Nitta et al. (2011), codiert das MuLV-Genom für zwei Formen des Gag-Polyproteins. Neben der 60 kDa großen Einheit, existiert eine glycosylierte Form mit einer Größe von 80 kDa, die beide aus derselben unspliced mRNA gebildet werden. Das mit gPr80(Gag) benannte Protein wird in zwei Untereinheiten von 55 und 40 kDa geschnitten. Bei den detektierten Proteinbanden könnte es sich somit um die geschnittenen Untereinheiten des glycosylierte Gag-Precursors handeln.

Das TM-Protein p15E ließ sich im Überstand der mit MuLV WT infizierten Zellen nachweisen, zeigte im Überstand der MuLV Mut sekretierenden *M. dunnii* unerwarteter weise jedoch nur eine sehr schwach ausgeprägte Bande (Abb. 8). Zur Überprüfung der MuLV-Sequenz des WT und der Mut wurde eine Sequenzierung vorgenommen (Ivanusic et al., Daten nicht gezeigt). Durch ein Epitop-mapping des eingesetzten goat-anti-p15E AK konnten zwei verschiedene Bindungsstellen im

Protein PERV-p15E ermittelt werden, die mit E1 und E2 gekennzeichnet wurden (Kaulitz, D. et al., 2011). Das Epitop E1 befindet sich in der fusion peptide proximal region (FPPR), das Epitop E2 in der membrane proximal external region (MPER) und wird deswegen auch als MPER-Epitop bezeichnet. Das p15E Fusionsprotein des MuLV weist ebenfalls das Epitop E2 auf. Es besitzt die Sequenz **FEGWFN** (Abb. 16).

	<i>isu</i> -Domäne	MPER-Epitop
WT	LQNRRGLDLLFLK <u>E</u> GGLCA <u>A</u> LKEECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLSQRQKLFESSQGW	FEGWFN RS
MUT	LQNRRGLDLLFLK <u>R</u> GGLCA <u>F</u> LKEECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLSQRQKLFESSQGW	FEGWFN RS

Abbildung 16: Sequenzausschnitt des p15E Proteins von MuLV. Gegenübergestellt sind die beiden Sequenzen des MuLV WT und der MuLV Mut (MUT). Die *isu*-Domäne ist grün hinterlegt. Die im WT und der Mut abweichenden Aminosäuren sind fett und unterstrichen gekennzeichnet. Das Epitop des neutralisierenden goat-anti-PERV-p15E AK befindet sich zwischen den Aminosäuren Leu₇ und Gly₁₅ der *isu*-Domäne. Das Epitop E2, oder auch MPER-Epitop, ist blau hinterlegt und mit fetten Buchstaben gekennzeichnet.

Zusätzlich beschreiben Kaulitz, D. et al. (2011) ein weiteres Epitop des goat-anti-PERV-p15E, welches sich innerhalb der *isu*-Domäne befindet und die Sequenz **LDLLFLKEG** aufweist. Die zwei vom MuLV WT abweichenden Aminosäuren der MuLV Mut könnten hierbei ein vermindertes Binden des goat-anti-PERV-p15E an die *isu*-Sequenz hervorrufen. Der somit erschwerte Nachweis des MuLV-p15E durch den in der Western Blot-Analyse verwendeten goat-anti-PERV-p15E AK könnte die schwache Intensität der p15E-Bande des aufgetragenen MuLV Mut-Proteins erklären (Abb. 8).

4.3 Exosomen enthalten *tANCHOR*-exprimierte Proteine

Die Isolierung der Exosomen der mit *tANCHOR*-System transfizierten HEK293T erfolgte durch Ultrazentrifugation des Zellüberstandes. Der Nachweis mittels Western Blot-Analysen ergab deutliche Proteinbanden bei Inkubation mit rabbit-anti-CD9 und -anti-CD81. Die transfizierten HEK293T wiesen eine starke Expression des *tANCHOR*-Proteins auf, was durch die Western Blot-Analyse des Zelllysates unter Einsatz eines gegen den Proteintag mCherry gerichteten AKs nachgewiesen werden konnte (Abb. 9). Im Exosomen-Pellet des Zellüberstandes konnte das mit mCherry getagte CD82ΔLEL-Protein ebenfalls nachgewiesen werden. Bei der Western Blot-Analyse des Überstandes der mit *pCMV*-CD82ΔLEL-HIV Mut-, sowie *pCMV*-CD82ΔLEL-PERV Mut-mCherry transfizierten Zellen wurde nur ein geringfügiges Chemolumineszenz-Signal detektiert. Da Proteinfusionen mit dem mCherry-Tag jedoch anfällig für Abbauvorgänge sind, könnte der Nachweis des Proteins durch den Tag fehleranfällig gewesen sein.

Es zeigte sich, dass die *tANCHOR*-Proteine nicht nur auf der Oberfläche von Zellen zu finden waren, sondern sich auch in und auf den Exosomen nachweisen ließen (Abb. 9). Die Anreicherung von Tetraspaninen in Exosomen ist durch das Membranbudding von Tetraspanin-enriched microdomains (TEM) erklärbar, die eine vermittelnde Rolle im Mechanismus des budding spielen (Hurley, J. et al., 2010). Die

Biogenese von Exosomen beginnt durch die Einstülpung der Plasmamembran ins Zellinnere, durch die zunächst frühe Endosomen entstehen, die durch weitere Einstülpungen der Endosomen-eigenen Plasmamembran multivesikuläre Körper bilden (Zhang, B. et al., 2014). Durch das budding der Zellmembran in den TEM und die daraus resultierende Endozytose der frühen Endosomen kann es zu einer Aufnahme von Tetraspaninen durch die Endosomen kommen, wodurch sich diese in den Exosomen wiederfinden ließen.

4.4 Saccharose als Quelle der Endotoxin-Kontamination

Zur Überprüfung auf mögliche Endotoxin-Kontaminationen der MuLV-Pellets wurde ein LAL-Test durchgeführt. Die Bestimmung des Endotoxin-Gehaltes beruht hierbei auf der Absorptionsmessung der Proben und eines Standards, wodurch der Gehalt an Endotoxin berechnet werden kann.

Die MuLV-Partikel wurden anhand eines zweiten Ultrazentrifugations-Schrittes durch eine 20 % Saccharose-Lösung von zellulären Bestandteilen gereinigt. Der anschließende LAL-Test ergab stark erhöhte Endotoxin-Gehalte des Pellets (Abb. 11). Deutlich geringere Endotoxin-Werte ergab der LAL-Test der Pellets, die ohne anschließenden Saccharose-Schritt abzentrifugiert wurden (Abb. 12). Diese Tatsache deutet auf die Saccharose-Lösung als verursachende Kontaminationsquelle hin. Da Saccharose für viele Bakterien eine gut verwertbare Nahrungsquelle darstellt, können sich diese in einer Saccharose-Lösung sowie in der Pulverform schnell ausbreiten. Eine Endotoxin-Konzentration der Saccharose-Lösung von etwa 0,2 EU/mL bewirkte somit eine Anreicherung an Endotoxin in den Proteinproben.

4.5 Eine IL-10-Induktion erfolgte sowohl durch die *isu*-Domänen, als auch durch die Mutanten.

Die IL-10-Induktion wurde durch einen ELISA analysiert. Verwendet wurden die mit *pOUT*-Vektor transfizierten *HEK293T*-Zellen, sowie das durch die Dynabeads isolierte *pOUT*-Protein. Des Weiteren kamen neben den aus dem Zellüberstand mit *tANCHOR*-Plasmid transfizierter Zellen isolierten Exosomen auch konzentrierte MuLV-Partikel zum Einsatz. Neben der nativen *isu*-Domäne, wurden stets Proben, die eine Mutation in der Domäne aufwies, auf die IL-10-Induktion getestet.

Im ELISA getestete *pOUT*-sekretierenden Zellen sowie das konzentrierte Protein zeigten keine IL-10-Freisetzung in humanen PBMCs. Ein möglicher diskutierter Faktor ist die Menge und die Proteinfaltung (Denner, 2015). Diese besitzt einen zentralen Einfluss auf die Wirksamkeit und auf die Zugänglichkeit durch den entsprechenden Rezeptor der Immunzellen, welche letztere durch sterische Hinderungen beeinträchtigt sein könnte.

Die starke Induktion des IL-10 durch die CD82 Δ LEL-mCherry tragenden Exosomen deutet auf eine bessere Zugänglichkeit der *isu*-Domäne durch Präsentation mittels

tANCHOR-System hin. Die durch die Hitzeinaktivierung der Probe erhöhten IL-10-Werte traten unerwartet auf. Da durch die Hitzeinaktivierung die in den Exosomen enthaltenen Proteine denaturieren, kann die vermehrte IL-10-Induktion nicht auf die Freisetzung des *tANCHOR*-Proteins aus den Exosomen zurückzuführen sein und scheint durch eine Endotoxin-Verunreinigung oder andere Faktoren in der Exosomensuspension erklärbar.

Die getesteten MuLV-Partikel ließen die Induktion einer IL-10-Freisetzung erkennen. Der Vergleich der Werte zwischen den getesteten MuLV-Partikeln (Abb. 14) und den mit PBMCs eines anderen Spenders versetzten Proben (Abb. 13) zeigt bei den MuLV-Partikeln deutlich erhöhte Werte, welche jedoch bei Betrachtung der getesteten LPS-Standards auf die unterschiedliche Aktivität in der LPS-assoziierten Signaltransduktion zurückzuführen zu sein scheint, die je nach Spender variieren kann (Bodenmiller et al., 2012). Auch die Stärke der IL-10-Induktion durch die *isu*-Domäne ist abhängig vom Spender, aus dem die PBMCs isoliert wurden (Morozov, V. et al., 2012).

Der Vergleich zwischen den Proben der Wildtyp *isu*-Domäne mit denen der Mutationen enthaltenden Domäne ließ stets erkennen, dass das Protein mit mutierter Domäne eine vergleichbar starke Freisetzung von IL-10 hervorrief. Morozov et al. (2012) zeigten, dass die Einführung gewisser Mutationen in der sogenannten „core“-Region der *isu*-Domäne eine Aufhebung der immunsuppressiven Eigenschaft zur Folge hat. Die *pOUT*- und *tANCHOR*-Plasmide weisen eine nahezu vollständig mutierte core-Region auf, lediglich Glu₉ ist in den verwendeten Systemen nicht mutiert. Die IL-10-Induktion der Mutanten scheint somit nur auf Endotoxin-Verunreinigungen in den Proben zurückführbar zu sein.

5 Literaturverzeichnis

Andreu, Z., and Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Front Immunol* 5, 442.

Bari, R., Guo, Q., Xia, B., Zhang, Y.H., Giesert, E.E., Levy, S., Zheng, J.J., and Zhang, X.A. (2011). Tetraspanins regulate the protrusive activities of cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 415, 619-26.

Berditchevski, F. (2013). Tetraspanins (Springer Science).

Bodenmiller, B. et al. (2012). Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. *Nature Biotechnology* 30, 858-67

Chiu, T.K., and Davies, D.R. (2004). Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem* 4, 965-977.

Cianciolo, G.J., Bogerd, H., and Snyderman, R. (1988). Human retrovirus-related synthetic peptides inhibit T lymphocyte proliferation. *Immunol Lett* 19, 7-13.

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, 1081–1090.

Denner, J. (2015). Immunosuppressive properties of retroviruses. *European Journal of Immunology* 46, 253-255.

Do, T., Murphy, G., Earl, L.A., Del Prete, G.Q., Grandinetti, G., Li, G.H., Estes, J.D., Rao, P., Trubey, C.M., Thomas, J., et al. (2014). Three-dimensional imaging of HIV-1 virological synapses reveals membrane architectures involved in virus transmission. *J Virol* 88, 10327-39.

Gao, B., Wang, Y., and Tsan, M.F. (2006). The heat sensitivity of cytokine-inducing effect of lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 80, 359-66.

Hurley, J., Boura, E., Carlson, L. and Rózycki, B. (2010). Membrane Budding. *Cell* 134, 875-887.

Ichim, T.E., Zhong, Z., Kaushal, S., Zheng, X., Ren, X., Hao, X., Joyce, J.A., Hanley, H.H., Riordan, N.H., Koropatnick, J., et al. (2008). Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *J Transl Med* 6, 37.

Isshiki, M., Tsumoto, A., and Shimamoto, K. (2006). The serine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *Plant Cell* 18, 146-58.

Ivanusic, D. (2014). HIV-1 cell-to-cell spread: CD63-gp41 interaction at the virological synapse. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30, 844-5.

Ivanusic, D., Madela, K., Laue, M., and Denner, J. (2015). Three-Dimensional Imaging of CD63 Recruitment at the Virological Synapse: HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31, 579-80.

Kaulitz, D., Fiebig, U., Eschricht, M., Wurzbach, C., Kurtz, R. and Denner, J. (2011). Generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology* 411, 78-86

Li, M., Matsunaga, N., Hazeki, K., Nakamura, K., Takashima, K., Seya, T., Hazeki, O., Kitazaki, T. and Iizawa, Y. (2006). A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol.* 69, 1288-95.

Madison, M.N., and Okeoma, C.M. (2015). Exosomes: Implications in HIV-1 Pathogenesis. *Viruses* 7, 4093-118.

Mangeney, M. and Heidmann, T. (1998). Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 8, 14920-5.

Manley, J.L., and Krainer, A.R. (2010). A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes Dev* 24, 1073-74.

Morozov, V., Morozov AV., Semaan, A. and Denner, J. (2012). Single mutations in the transmembrane envelope protein abrogate the immunosuppressive property of HIV-1. *Retrovirology* 9, 69.

Muhle, M., Kroniger, T., Hoffmann, K., and Denner, J. (2016). The immunosuppressive domain of the transmembrane envelope protein gp41 of HIV-1 binds to human monocytes and B cells. *Immunol Res* 64, 721-29.

Nitta, T., Tam, R., Kim, JW. and Fan, H. (2011). The cellular protein La functions in enhancement of virus release through lipid rafts facilitated by murine leukemia virus glycosylated Gag. *MBio* 2, 341-10

Nolte-'t Hoen, E., Cremer, T., Gallo, R.C., and Margolis, L.B. (2016). Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 9155-161.

Oostendorp, R.A., Meijer, C.J., and Scheper, R.J. (1993). Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins, and their role in non-retroviral human disease. *Crit Rev Oncol Hematol* 14, 189-206.

Piper, R.C., and Katzmann, D.J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 519-547.

Schmidt, DM. and Snyderman, R. (1988). Retroviral protein P15E and tumorigenesis. Expression is neither required nor sufficient for tumor development. *J Immunol.* 140. 4035-41.

Stocking, C. and Kozak, C.A. (2008). Murine endogenous Retroviruses. *Cell Mol Life Sci* 65, 3383–398.

Symeonides, M., Lambele, M., Roy, N.H., and Thali, M. (2014). Evidence showing that tetraspanins inhibit HIV-1-induced cell-cell fusion at a post-hemifusion stage. *Viruses* 6, 1078-90.

Tacke, S., Kurth, R. and Denner, J. (2000). Porcine Endogenous Retroviruses Inhibit Human Immune Cell Function: Risk for Xenotransplantation?. *Virology* 268, 87-93.

Takashima, K., Matsunaga, N., Yoshimatsu, M., Hazeki, K., Kaisho, T., Uekata, M., Hazeki, O., Akira, S., Iizawa, Y. and Ii, M. (2009). Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br J Pharmacol.* 157, 1250-62.

Thali, M. (2009). The Roles of Tetraspanins in HIV-1 Replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 339, 85-102.

Trosse, C., Ravneberg, H., Stern, B., and Pryme, I.F. (2007). Vectors encoding seven oikosin signal peptides transfected into CHO cells differ greatly in mediating Gaussia luciferase and human endostatin production although mRNA levels are largely unaffected. *Gene Regul Syst Bio* 1, 303-12.

Zhang, B., Yin, Y., Lai, R. and Lim, S. (2014). Immunotherapeutic Potential of Extracellular Vesicles. *Front Immunol.* 5, 518.