

Untersuchungen zum Hüllprotein und dem Tropismus des humanen endogenen Retrovirus K

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
Philipp Kramer

Berlin, im Juli 2011

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Angefertigt unter der Betreuung von PD Dr. Norbert Bannert

Dezember 2008 bis Februar 2011

Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 21.10.2011

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	7
1.1	Retroviren (<i>Retroviridae</i>)	7
1.1.1	Historischer Hintergrund	7
1.1.2	Morphologie, Struktur und Genom des Virions	8
1.1.3	Replikationszyklus	11
1.2	Endogene Retroviren (ERV)	13
1.2.1	Humane Endogene Retroviren (HERV)	16
1.2.1.1	Pathogenese und Benefiz von HERV	17
1.2.2	Die Familie HERV-K(HML-2) und HERV-K113	19
1.2.2.1	Genomischer Aufbau des Provirus von HERV-K113	20
1.2.2.2	Das Hüllprotein (Env)	21
1.2.2.3	Rekonstruktion eines funktionellen Hüllproteins von HERV-K113	27
1.3	Retrovirale Rezeptoren, Entry-Faktoren und Tropismus	29
1.4	Antivirale Wirtsabwehr	33
1.5	Zielsetzung	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Materialien	35
2.1.1	Laborgeräte	35
2.1.2	Chemikalien, Enzyme und Größenstandards	36
2.1.3	Antibiotika	37
2.1.4	Puffer, Lösungen und Nährmedien	38
2.1.5	Kits	38
2.1.6	Bakterienstamm	39
2.1.7	Konstrukte/ Vektoren	39
2.1.8	Oligonukleotide (Primer)	40
2.1.9	Antikörper	40
2.1.10	Software	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	DNA-Analytik	42
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.2.1.1.1	Expand High Fidelity PCR	42
2.2.1.1.2	Mutagenese PCR	43

2.2.1.2	Restriktion mit Endonukleasen	44
2.2.1.3	Ligation	45
2.2.1.4	DNA-Agarosegelelektrophorese	45
2.2.1.5	Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten	46
2.2.1.6	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> One Shot Top 10	46
2.2.1.7	Transformation	47
2.2.1.8	Plasmidisolierung	48
2.2.1.9	DNA-Messung	48
2.2.1.10	Sequenzierungs PCR	49
2.2.2	Zellkultur	50
2.2.2.1	Puffer und Medien	50
2.2.2.2	Zellbiologische Verbrauchsmaterialien	51
2.2.2.3	Eukaryotische Zelllinien	51
2.2.2.4	Zellkultivierung	52
2.2.2.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	53
2.2.2.6	Zellzahlbestimmung	53
2.2.2.7	Transfektion	55
2.2.2.7.1	Transfektion mittels PolyFect	55
2.2.2.7.2	Transfektion mittels Calciumphosphat	55
2.2.2.7.2.1	Herstellung pseudotypisierter SHIV-Reporterviren	56
2.2.2.7.2.2	Herstellung pseudotypisierter HERV-Reporterviren	56
2.2.2.8	Infektion von Zellen	57
2.2.3	Protein-Analytik	57
2.2.3.1	Zellyse/ Proteinextraktion	57
2.2.3.2	Proteinaufreinigung	58
2.2.3.2.1	Proteinfällung	58
2.2.3.2.2	Immunopräzipitation	58
2.2.3.3	Deglykosylierung von Proteinen	59
2.2.3.4	Ultrazentrifugation (UZ)	59
2.2.3.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
2.2.3.6	Western Blot	61
2.2.3.7	Immunofluoreszenz Mikroskopie (cLSM)	62
2.2.3.8	FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)	63
2.2.3.9	Luziferase-Assay	64

2.2.3.10	Quantifizierung von Virusüberständen	65
2.2.3.10.1	p24 Gag-ELISA	65
2.2.3.10.2	Tritium-Assay	66
2.2.3.10.3	Cavidi-Assay	66
2.2.3.11	Interferenz-Assay	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Analyse der Glykosylierungen von HERV-K113 Env	67
3.2	Einbau von HERV-K113 Env in retrovirale Partikel	70
3.2.1	Einbau von C-terminalen Deletionsmutanten in SHIV-Partikel	71
3.2.2	Einbau in HERV-K113 Partikel	72
3.3	Infektiosität des Envs	76
3.4	Tropismusuntersuchung	82
3.5	Rezeptoruntersuchung	86
3.5.1	Expression der Rezeptoren, MMTVcoEnv und JSRVcoEnv	87
3.5.2	Einbau in retrovirale Partikel	91
3.5.3	Infektionsversuche mit oricoEnv und β -retroviralen Rezeptoren	92
3.5.4	Herstellung eines oricoEnv-Immunoadhäsins zur Rezeptoridentifizierung	95
3.5.5	Rezeptorbindungsstudie mit oricoEnv-Immunoadhäsinen	99
4	Diskussion	102
4.1	Wiederherstellung des ursprünglichen HERV-K113 Hüllproteins	102
4.2	Untersuchungen zur Funktionalität von HERV-K113 Env	103
4.2.1	Status der Glykosylierung	104
4.2.2	Env-Einbau in retrovirale Partikel und deren Infektiosität	106
4.3	Wirtsspezifität von HERV-K113 Env	110
4.4	Arbeiten zur Identifizierung eines potentiellen Rezeptors für HERV-K113	116
4.4.1	Ausblick zur Rezeptoridentifizierung	120
5	Zusammenfassung	122
6	Summary	123
7	Literaturverzeichnis	124
8	Anhang	143
8.1	Oligonukleotide	143
8.1.1	Sequenzierungsprimer	143
8.1.2	Mutageneseprimer	144
8.1.3	Klonierungsprimer	145

8.2	Sequenzen.....	146
8.2.1	oricoEnv- Sequenz	146
8.3	Abkürzungsverzeichnis	148
8.4	Publikationsliste und Kongressbeiträge	153
8.5	Danksagung	154
8.6	Erklärung	155

1 Einleitung

1.1 Retroviren (*Retroviridae*)

Retroviren (*Retroviridae*) sind membranumhüllte Viren, deren Genom aus zwei RNA-Einzelsträngen in Plusstrangorientierung besteht. Sie weisen den während der Replikation charakteristischen Schritt der reversen Transkription auf, bei dem es zu einem Umschreiben der RNA in doppelsträngige DNA, gefolgt von der Integration in das Genom der Wirtszelle kommt.

Taxonomisch sind die *Retroviridae* in zwei Unterfamilien, die *Orthoretrovirinae* und die *Spumavirinae* gegliedert [van Regenmortel, International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2000]. Wobei die *Orthoretrovirinae* aus den sechs Genera α^- , β^- , δ^- , ϵ^- , γ^- -Retroviren und Lentiviren bestehen, umfassen die *Spumavirinae* nur das eine Genus der Spumaviren zu denen Foamyviren gezählt werden. Diese Einteilung basiert auf der Sequenzverwandtschaft der reversen Transkriptase, Analysen der Virusmorphologie, ihrer Pathogenese und Wirtsspezifität. Man unterscheidet zudem zwischen endogenen und exogenen Formen. Teilungsaktive eukaryotische Zellen von Wirbeltieren sind überwiegend Ziele retroviraler Infektionen, wobei das humanpathogene HI-Virus eine Ausnahme darstellt, weil es auch ruhende Zellen infizieren kann. Die Symptome nach einer Retrovirusinfektion sind sehr variabel und reichen oft von harmlosen Infektionsverläufen bis zu schwerwiegenden Immundefizienzen, Tumorerkrankungen oder neurologischen Defekten.

1.1.1 Historischer Hintergrund

Vor über 100 Jahren gelang es den beiden dänischen Pathologen Vilhelm Ellermann und Oluf Bang die ersten Retroviren zu beschreiben, da durch zellfreie Filtrate Mäuseleukämie ausgelöst werden konnte [Ellermann und Bang, 1908]. 1911 entdeckte der Amerikaner Peyton Rous, dass die Übertragung von Ultrafiltraten aus Geflügelsarkomen auf gesunde Hühner Tumorentwicklung induzierte [Rous, 1911]. Später wurde das Tumor vermittelnde Retrovirus nach seinem Entdecker als *Rous Sarkoma Virus* (RSV) bezeichnet. Einen weiteren Beweis für die Assoziation von Viren mit Tumorerkrankungen lieferte 1936 der Biologe John Joseph Bittner, indem er die Milchdrüsenerkrankung bei Mäusen mit dem *Mouse Mammary Tumor*

Virus (MMTV) in Verbindung bringen konnte [Bittner, 1936]. Von entscheidender Bedeutung war die Identifizierung von Ribonukleinsäure in RSV-Partikeln 1961 durch Crawford [Crawford und Crawford, 1961], woraufhin onkogene Retroviren als RNA-Tumor-Viren bezeichnet wurden. Wenige Jahre später konnte die für Retroviren und ihre Vermehrungsstrategie essentielle reverse Transkriptase parallel von Howard M. Temin sowie David Baltimore entdeckt und beschrieben werden [Temin und Mizutani, 1970; Baltimore, 1970]. Die Fähigkeit der reversen Transkriptase, den genetischen Informationsfluss umzukehren, gab der Familie der Retroviren letztendlich ihren heutigen Namen. 1969 konnte auch mit der Entdeckung der Onkogene die Erklärung der tumorinduzierenden Wirkung von Retroviren erbracht werden [Huebner und Todaro, 1969]. Zehn Jahre später wurde das erste humanpathogene Retrovirus, das *Human T-Cell Leukemia Virus* (HTLV), durch den amerikanischen Virologen Robert Charles Gallo beschrieben [Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982]. Nahezu parallel gelang es den Franzosen Luc Montagnier 1983 das *Human Immunodeficiency Virus* Type 1 (HIV-1), aus Blutproben von AIDS-Patienten zu isolieren [Barré-Sinoussi *et al.*, 1983].

Die Entdeckung des ersten endogenen Retrovirus mit MMTV erfolgte bereits 1977, welches in der Lage ist sowohl exogene wie auch endogene Formen auszubilden [Van Nie *et al.*, 1977].

1.1.2 Morphologie, Struktur und Genom des Virions

In der Abbildung 1 ist der charakteristische Aufbau eines reifen Retroviruspartikels (Virion) am Beispiel des β -retroviralen HERV-K dargestellt. Das Virion weist einen Durchmesser von ca. 110 nm auf und ist von einer zellulären Lipiddoppelmembran umhüllt, in die virale Glykoproteine, die sogenannten *Envelope*-Proteinen integriert sind. Die Glykoproteine liegen als Trimere vor [Lu *et al.*, 1995], setzen sich aus der Oberflächen (SU)- und transmembranen (TM) Untereinheit zusammen und sind elektronenmikroskopisch als „Spikes“ sichtbar [Gelderblom *et al.*, 1987]. Über Myristinsäurereste sind virale Matrixproteine an der Innenseite der Hüllmembran angelagert und umschließen das im Partikelinneren befindliche Viruscapsid. Einige β -Retroviren, wie das *Mouse Mammary Tumor Virus*, weisen z. B. ein exzentrisch im Partikel ausgerichtetes Core auf. Lentiviren dagegen besitzen ein charakteristisch konisches Core [Gelderblom *et al.*, 1987], doch bei anderen Retrovirustypen kann die Morphologie des viralen Core's auch sphärisch-ikosaedrisch sein. Morphologisch werden die verschiedenen Virusstämme anhand ihrer Corestruktur und der Art ihrer

Knospung charakterisiert. Dabei unterscheidet man am endoplasmatischen Retikulum oder an der Zellmembran knospende Partikel. Das vom Capsid umgebene retrovirale Genom besteht aus zwei identischen einzelsträngigen (+)RNA-Molekülen ((+)ssRNA) mit einer Länge von ca. 7- 12 Kilobasen (kb) und ist mit Nukleocapsidproteinen komplexiert [Modrow *et al.*, 2003].

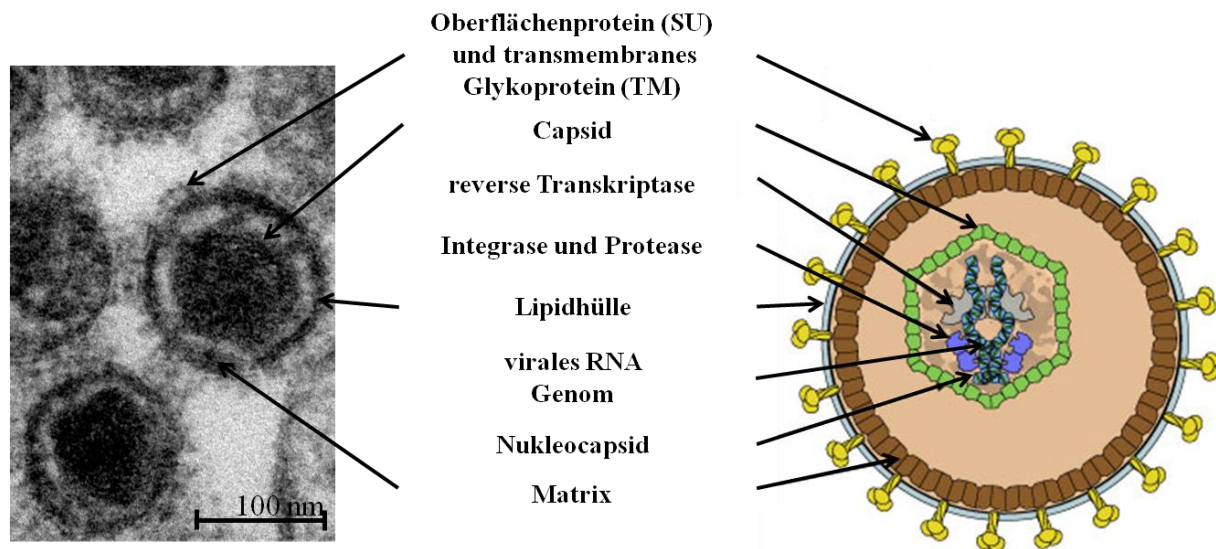


Abbildung 1: Gegenüberstellung einer Elektronenmikroskopieaufnahme und einer schematischen Darstellung eines reifen β -Retrovirus [aufgenommen von Lars Möller]. Virale Hüllproteine, bestehend aus der Oberflächen- (SU) und der transmembranen Untereinheit (TM), sind in die Lipidhülle des Virions eingelagert. Das (+)ssRNA-Genom ist weiterhin umgeben von den Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteinen. Zusätzlich dazu befinden sich im Virion noch die Integrase, Protease und reverse Transkriptase. Abbildung verändert nach ExpASy, Bioinformatics Resource Portal, Swiss Institute of Bioinformatics (https://education.expasy.org/images/betaretrovirus_virion.jpg).

Alle Retroviren enthalten mindestens die vier Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env*. *Gag* (group specific antigen) kodiert für das Hauptstrukturprotein, welches nach späterer Reifung die inneren Kernproteine bildet. Die alleinige Expression des Gag-Proteins führt zur Ausbildung von nicht-infektiösen, unreifen Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs). Das *pro*-Gen (protease) enthält die Information zur Synthese der Protease. Diese prozessiert das Gag-Vorläuferprotein in seine Matrix-, Capsid- und Nukleocapsid-Untereinheiten. Das *pol*-Gen (polymerase) kodiert sowohl für die reverse Transkriptase, Integrase, als auch die RNaseH, die weitere wichtige Bestandteile des infektiösen Virions darstellen und zusammen mit dem viralen Genom verpackt werden. Das *env* (envelope)-Gen beinhaltet die Information zur Bildung viraler Glykoproteine. Die in das Wirtsgenom integrierte virale Erbinformation, wird als Provirus bezeichnet und ist in der Abbildung 2 schematisch dargestellt. Am 5'- und 3'-Ende

werden die Virusgene von LTR's (Long Terminal Repeats) flankiert, die absolut identisch sind und in gleicher Orientierung vorliegen. Sie bestehen aus der U3-, R- und U5-Region und besitzen regulatorische Funktionen der Genexpression, wie Promoter, Enhancerelemente und cis-aktive Sequenzen. Der Transkriptionsstart sowie das Polyadenylationsignal befinden sich in der R-Region der LTR. Die Primerbindungsstelle (PBS) liegt vor dem *gag*-Leseraster. An diesem Ort bindet die spezifische, zelluläre tRNA und initiiert die RT-Polymerasereaktion. Das Ψ -Element (packaging signal) ist für die Verpackung des viralen RNA-Genoms in das infektiöse Partikel verantwortlich und interagiert mit dem Nukleocapsid. Neben den vier Hauptgenen *gag*, *pro*, *pol* und *env* besitzen komplexe Retroviren noch weitere akzessorische Gene, die beispielsweise essentielle regulatorische Gene darstellen und die Replikation verstärken können, wie es bei den Genen *tat*, *rev*, *nef* und *vpr* von HIV-1 der Fall ist [Greene, 1991]. Andere akzessorische Gene kodieren für Proteine, die direkt mit der antiviralen Wirtsabwehr interagieren um diese zu blockieren, wie z. B. *vif* und *vpu* bei HIV-1 [Cann und Karn, 1989; Neil *et al.*, 2008; Gramberg *et al.*, 2009].

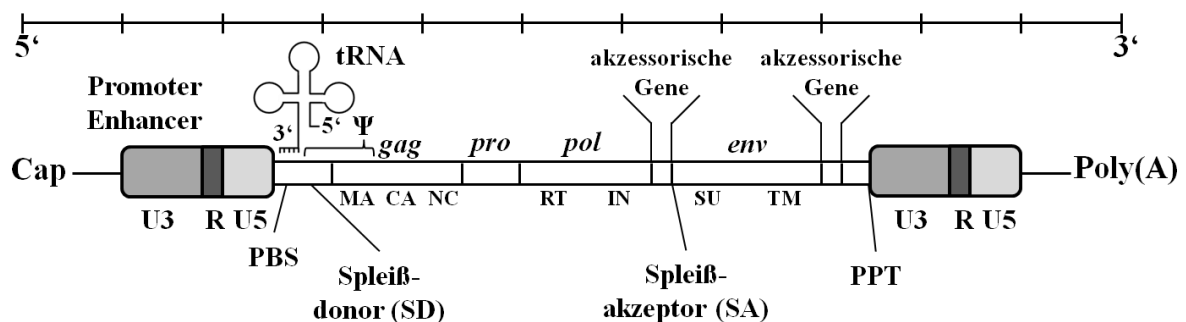


Abbildung 2: Genomischer Aufbau eines typischen Ortho-Retrovirus. Das retrovirale Genom, bestehend aus mindestens vier Leserahmen der Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env* und wird von beiden Seiten durch identische LTR's (Long Terminal Repeats) flankiert. Diese setzen sich aus der U3-, R- und U5-Region zusammen, die wichtige Elemente wie Promoter, Enhancer oder Poly(A)-Signale enthalten. Vorhandene akzessorische Gene können an den eingezeichneten Positionen lokalisiert sein. Für die Replikation wichtige Sequenzen, wie die 5'-Cap, die Primerbindungsstelle (PBS) der tRNA, das Ψ -Verpackungssignal, der Polypurin-Trakt (PPT), der Poly(A)-Schwanz, die Spleißdonor- (SD) und Spleißakzeptorstellen (SA) sind in der Abbildung vermerkt. Nach Transkription mit anschließender Translation werden die viralen Proteine in ihre jeweiligen Untereinheiten prozessiert. Das Gag-Polyprotein wird durch die virale Protease in Matrix (MA), Capsid (CA) und Nukleocapsid (NC) gespalten. Die Polymerase setzt sich aus der reversen Transkriptase (RT) mit RNaseH-Aktivität und Integrase (IN) zusammen und das virale Hüllprotein wird auf den Weg zur Zellmembran in die Oberflächen- (SU) und transmembrane Untereinheit (TM) prozessiert.

1.1.3 Replikationszyklus

Mit der Anheftung des Retrovirus an der Wirtsmembran beginnt die Infektion (Abbildung 3). Es kommt dabei zu einer hochspezifischen Bindung des viralen Hüllroteins (Env) mit dem Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle. Vermittelt durch die transmembrane Untereinheit beginnt die Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran [McCune *et al.*, 1988]. Das Nukleocapsid, welches neben den beiden viralen, einzelsträngigen (+)RNA-Molekülen auch die Enzyme reverse Transkriptase, Protease, Integrase und RNaseH enthält, gelangt ins Zytoplasma [Klasse *et al.*, 1998]. Nach der Auflösung der Capsidstruktur („uncoating“), schreibt die reverse Transkriptase das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA um. Als Primer dient hierbei eine an das Virusgenom gebundene tRNA. Die RNaseH-Aktivität hydrolysiert den RNA-Anteil des Heteroduplexes und es kommt anschließend zur Komplementierung des proviralen DNA-Stranges [Morrow *et al.*, 1994].

Die reverse Transkriptase besitzt zur Kontrolle der Lesegenauigkeit keinen Mechanismus [Preston *et al.*, 1988], was in einer großen Fehlerrate der Transkriptionsprodukte und in der relativ hohen genetischen Variabilität der Retroviren resultiert [Temin, 1989; Williams und Loeb, 1992]. Mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} kommt es bei neusynthetisierten Strängen zu einem falschen Baseneinbau und sich neu bildenden Retrovirus-Varianten.

Nach dem Transport der viralen DNA in den Zellkern katalysiert die Integrase durch seine Endonuclease- und Ligaseaktivität die Integration ins Wirtsgenom [Derse *et al.*, 2007]. Abhängig von der Position des Integrationsereignisses können dadurch zelluläre Gene zerstört oder unter der Kontrolle des viralen 3'-LTR-Promoters aktiviert werden. Flankiert von den regulatorischen LTR-Sequenzen liegt das Provirus im Wirtsgenom vor und ist je nach Aktivitätszustand der Zelle latent oder wird transkribiert [Stevenson *et al.*, 1990]. Abhängig vom Virustyp binden verschiedene zelluläre Faktoren in der U3-Region der 5'-LTR und ermöglichen die Transkription durch den zellulären RNA-Polymerase II-Komplex. Es entstehen virale mRNA-Moleküle, die der Translation der Gag-, Pol- und Env-Vorläuferproteine dienen oder ungespleißte Vollängen-RNA's, die in der späten Zyklusphase als RNA-Genome in Viruspartikel verpackt werden. Je nach Virusstamm kommt es aufgrund von differenziellem Spleißen zur Bildung von zwei bis über dreißig verschiedenen RNA-Spezies [Luukkonen *et al.*, 1995].

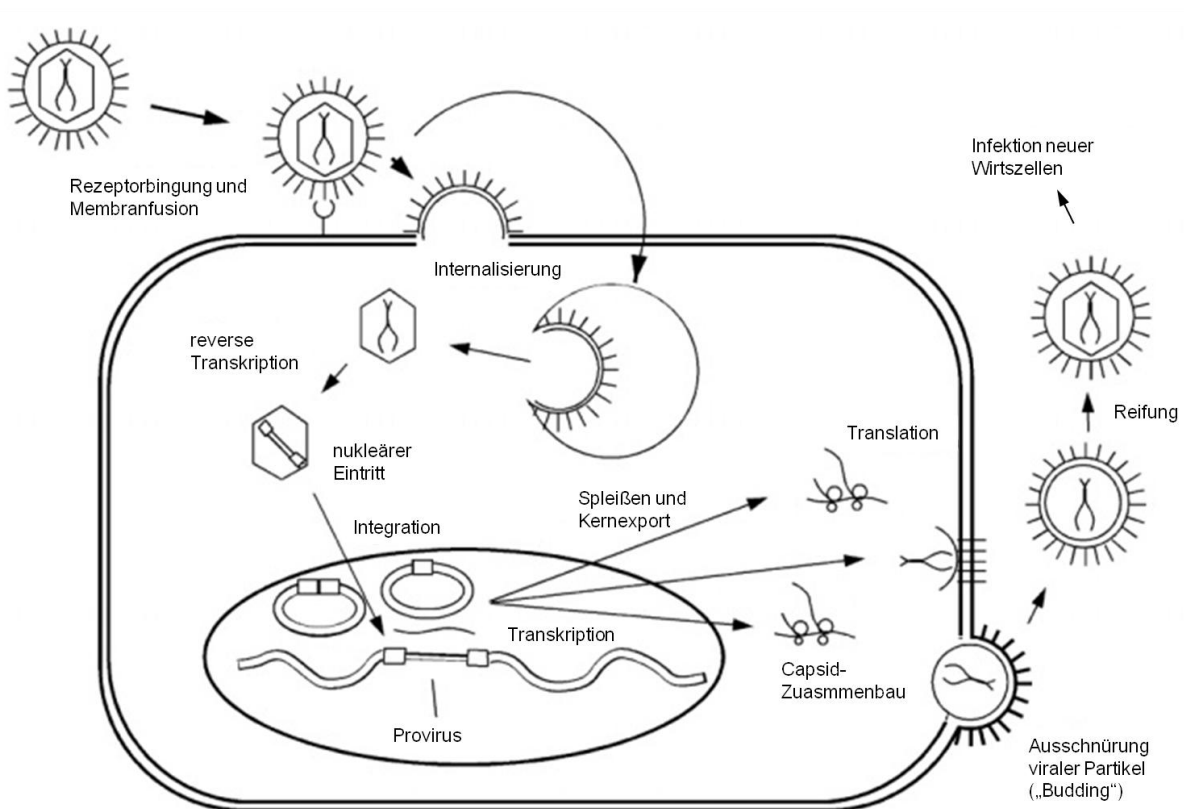


Abbildung 3: Replikationszyklus von Retroviren. In der schematischen Darstellung beginnt der Replikationszyklus von Retroviren mit der Rezeptorbindung und Verschmelzung zwischen Virus- und Wirtsmembran. Das virale Capsid mit dem Virusgenom wird internalisiert. Nach dem Auflösen der Capsidstruktur wird das RNA-Genom mittels reverse Transkriptase in doppelsträngige lineare DNA umgeschrieben, in den Nucleus transportiert und durch eine virale Integrase ins Wirtsgenom integriert. Die transkribierte provirale RNA wird entweder gespleißt und anschließend in Gag-, Pro-, Pol-, Env- und gegebenenfalls weitere akzessorische Vorläuferproteine translatiert oder als neues RNA-Genom in Viruspartikel verpackt. An der Zellmembran erfolgt der Zusammenbau der Gag-Strukturproteine, der Einbau des viralen Genoms und die Ausschnürung („budding“) des Partikels. Innerhalb der Membranhülle befinden sich die bereits eingelagerten, in ihre Untereinheiten SU und TM prozessierten Virus-Hüllproteine, die der erneuten Rezeptorbindung und Membranfusion dienen. Durch proteolytische Prozessierung des Gag-Vorläufers reifen die entlassen Virionen zu neuen infektiösen Partikeln, die in der Lage sind weitere Zellen zu infizieren. Abbildung verändert nach Knipe *et al.*, Field's Virology, 5th Edition.

Die Synthese der Env-Proteine erfolgt an der Membran des endoplasmatischen Retikulums und die Hüllproteine werden anschließend über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche geschleust. Die Aggregation der Gag-Polypeptide hängt vom Virusstamm ab und findet entweder im Zytoplasma oder an der Zellmembran statt. Über das Ψ -Verpackungssignal des RNA-Genoms wird der Transport von zwei Vollängen RNA-Molekülen zum sich abknospenden Viruspartikel sichergestellt. Dabei binden die ungespleißten RNA-Genome an

den Nukleocapsidanteilen der Gag-Vorläuferproteine. Die Gag-Proteine interagieren an der Zellmembran mit dem zytoplasmatischen Teil der dort eingebauten viralen Hüllproteine und initiieren die Knospung des noch unreifen Viruspartikels. Die verpackte virale Protease, welche erst im Viruspartikel autokatalytisch aktiviert wird, prozessiert das Gag-Vorläuferprotein in Matrix-, Capsid-, und Nukleocapsidprotein. Das charakteristische Capsid wird ausgebildet und durch die Reifung entsteht ein infektiöses Virion. Gereifte Partikel sind wieder in der Lage weitere Wirtszellen zu infizieren und der Replikationszyklus schließt sich. Gelingt es Retroviren Keimbahnzellen, wie Oozyten, Spermatozyten oder deren Vorläuferzellen zu infizieren, kann das integrierte Provirus über den Wirt an die nachfolgende Generation vererbt werden ohne dass ein Replikationszyklus durchlaufen wird.

1.2 Endogene Retroviren (ERV)

1977 gelang es Van Nie *et al.*, anhand des *Mouse Mammary Tumor Virus* einen bislang völlig unbekanntem Infektionsweg zu beschreiben. MMTV kann nicht nur als infektiöses, von der Zelle freigesetztes exogenes Viruspartikel neue Zellen infizieren (horizontale Übertragung), sondern auch als endogener Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration übertragen werden (vertikale Übertragung). Ausgehend von der Infektion einer Oozyte, Spermatozyte oder deren Vorläuferzellen durch das Retrovirus und nicht wie üblich die einer somatischen Zelle trägt jeder Nachkomme, der sich aus der Keimbahnzelle entwickelt, das Provirus in jeder einzelnen Körperzelle, an derselben chromosomalen Position und unterliegt bei Vererbung den Mendelschen Regeln.

Über Millionen von Jahren haben Vermehrungsprozesse, wie Reinfektion, Retrotransposition und Komplementation in *trans* dafür gesorgt, dass retrovirale Elemente über das gesamte Genom verteilt wurden [Boeke und Stoye, 1997]. Das endogene Retrovirus kann wie in der Abbildung 4A zu sehen während der Replikationsphase Nachkommen bilden, erneut eine Keimbahnzelle infizieren oder sich ins Genom reintegrieren. Die Reinfektion setzt jedoch ein funktionelles Hüllprotein voraus und erfolgt direkt über Keimbahnzellen oder über den Befall einer somatischen Zelle mit anschließender Infektion einer Keimbahnzelle. Für endogene Retroviren dient die Reinfektion der Erneuerung der Virus-Fitness, der der Selektionsdruck während des exogenen Replikationszyklus zugrunde liegt. Die Retrotransposition, ein alternativer Vermehrungsprozess der ERV's, läuft ausschließlich intrazellulär ab und benötigt kein funktionstüchtiges *env*-Gen [Boeke und Stoye, 1997; Gifford *et al.*, 2003;

Abbildung 4B]. Über die Komplementation in *trans* erlangt ein inaktives, endogenes Provirus seine fehlende Funktionalität durch eine Co-Infektion mit endogenen oder exogenen Formen eines sogenannten „Helfer-Virus“ wieder [Bannert *et al.*, 2006; Abbildung 4C]. Das dabei entstandene Virus ist zwar infektiös, aber nicht in der Lage weiter zu replizieren. Das *Baboon Endogenous Virus* (BaEV), welches sich aus der *gag-pol*-Region des *Papio Cynocephalus Endogenous Retrovirus* (PcEV) und dem *env*-Gen vom *Simian Endogenous Retrovirus* (SERV) zusammensetzt, liefert ein gutes Beispiel für ein replikationskompetentes, chimäres Virus [Mang *et al.*, 2000].

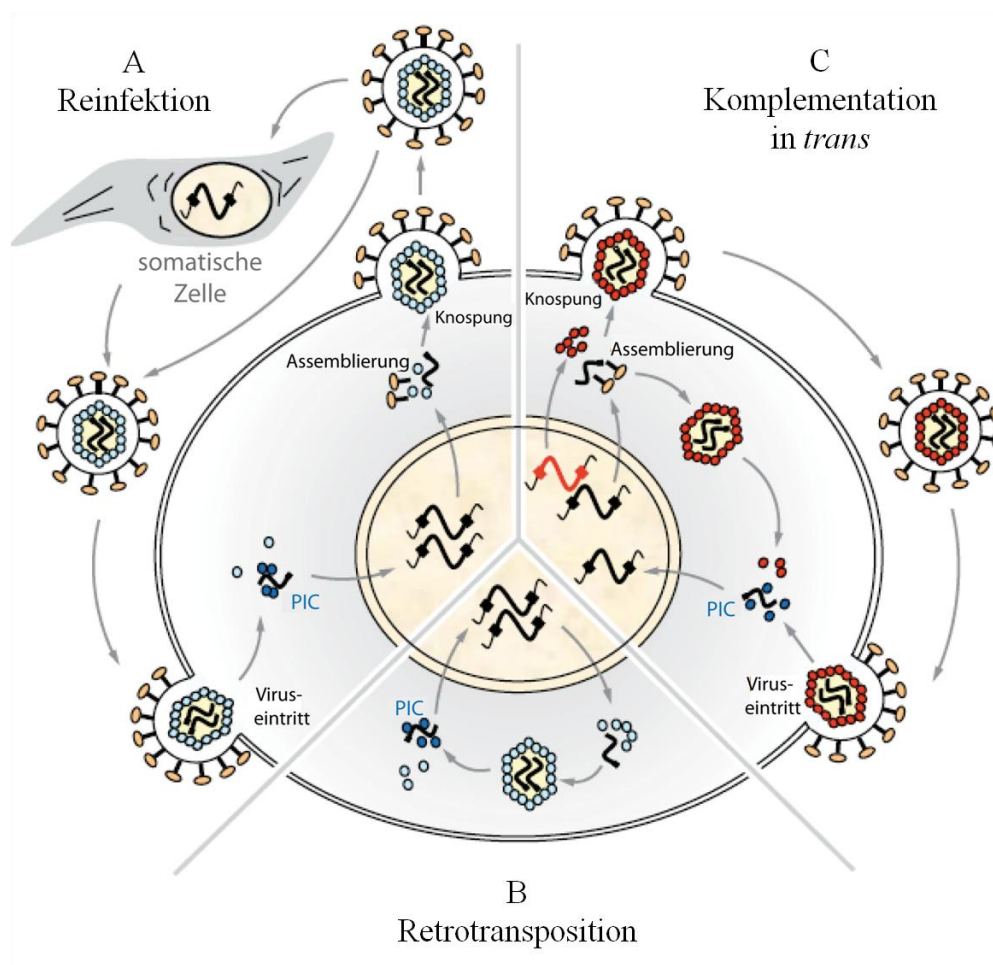


Abbildung 4: Vermehrungsmechanismen von endogenen Retroviren (ERV's). Die Reinfektion (a) setzt das Vorhandensein eines noch funktionellen Hüllproteins voraus, womit das Virus wieder in die Keimzellbahn des Wirtes eintreten kann. Die Reinfektion kann dabei auch direkt über Keimbahnzellen oder über das Befallen einer somatischen Zelle mit anschließender Infektion einer Keimbahnzelle erfolgen. Der Amplifikationsprozess der Retrotransposition (b) läuft ausschließlich intrazellulär ab und benötigt kein funktionelles *env*-Gen. Ein „Helfer-Virus“ (rote Markierung) ist für die Komplementation in *trans* (c) die Voraussetzung, um die fehlende Funktionalität des ERV's auszugleichen. Das somit entstandene chimäre Virus ist infektiös und über Reinfektion oder Retrotransposition in der Lage sich zu vermehren. Abbildung aus Bannert und Kurth, 2006.

Endogene Retroviren sind, wie in Abbildung 5 zu erkennen, weit verbreitet und konnten in verschiedenen Genomen von Vertebraten und auch Insekten nachgewiesen werden [Jern *et al.*, 2005]. Dabei schwankt der Anteil retroviraler Elemente in Wirbeltieren zwischen 5 und 10 % [Herniou *et al.*, 1998]. Die Identifizierung der ERV's erfolgte durch Sequenzvergleiche hochkonservierter Regionen innerhalb des retroviralen Genoms, speziell des Polymerasegens [Xiong *et al.*, 1990].

Im Rahmen des humanen Genomprojektes wurden bisher 31 verschiedene humane endogene Retrovirus-Familien identifiziert [Holmes, 2007], die wahrscheinlich auf unabhängige Integrationsereignisse zurückzuführen sind [Gifford, 2006]. Das menschliche Genom besteht zu etwa 8 % aus Retroelementen, die LTR's enthalten und somit Ursprung endogener Retroviren sind [Smit, 1999; Deninger und Batzer, 2002; Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001].

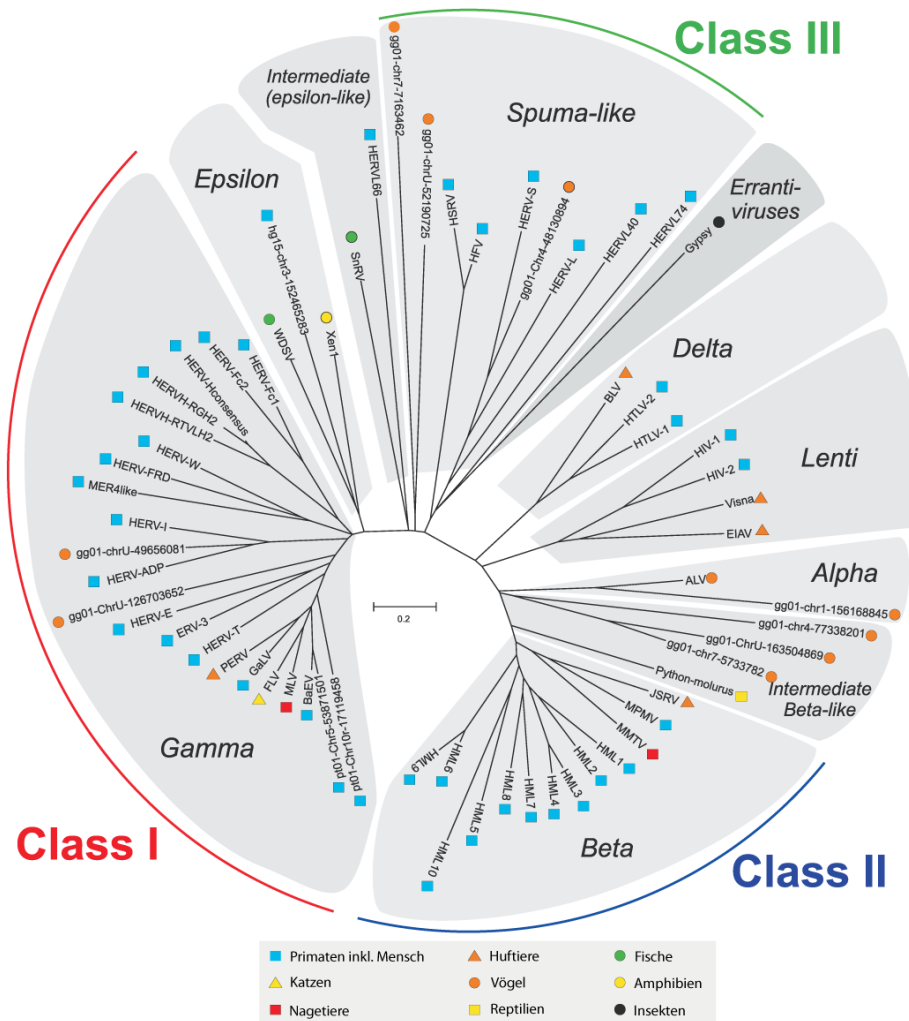


Abbildung 5: Dendrogramm endogener Retroviren (ERV). Die sieben Genera der *Retroviridae* und die darin enthaltenen ERV-Elemente wurden nach ihren *pol*-Sequenzen im Dendrogramm dargestellt. Hierfür wurde der „Neighbor-Joining“-Algorithmus verwendet. Die verschiedenen Wirtsspezies sind farblich dargestellt. Abbildung verändert nach Jern, 2005.

Während der Replikation der Wirts-DNA haben jedoch viele endogene Retroviren im Laufe der Evolution die Fähigkeit verloren exogene Formen zu bilden [Löwer *et al.*, 1995, 1996]. Mutations-, Deletions- und Rekombinationsereignisse des integrierten Virusgenoms waren dafür ursächlich. Dies kann sogar so weit gehen, dass es durch Rekombination zwischen den homologen LTR's zum Verlust der gesamten proviralen Sequenz kommt und eine einzelne LTR zurückbleibt [Stoye, 2001; Hughes und Coffin, 2004]. So konnte bislang beim *Human Endogenous Retrovirus* (HERV) noch kein aktives, funktionsfähiges Partikel beschrieben werden. Im Gegensatz dazu wurden bei vielen Säugetieren neben endogenen Elementen auch infektiöse, exogene Retroviren nachgewiesen [Boeke und Stoye, 1997; Arnaud *et al.*, 2008], wie bei Mäusen das *Murine Leukemia Virus* (MuLV) und *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV), bei Schafen das *Jaagsiekte Sheep Retrovirus* (JSRV), bei Katzen das *Feline Leukemia Virus* (FeLV) und bei Schweinen das *Porcine Endogenous Retrovirus* (PERV). Viele dieser Retroviren verursachen bei ihrem Wirt verschiedene Tumorerkrankungen und waren sogar namensgebend für das jeweilige Virus. Das wohl eindrucksvollste Beispiel für den Prozess einer aktuell ablaufenden Endogenisierung bildet das bei Koala-Bären auftretende *Koala Retrovirus* (KoRV) [Tarlington *et al.*, 2006 und 2008].

1.2.1 Humane Endogene Retroviren (HERV)

Die Einteilung der HERVs ist sehr heterogen und erfolgt nach unterschiedlichen Kriterien [Mager und Medstrand, 2003; Bannert und Kurth, 2006]. Ein wichtiges taxonomisches Merkmal ist die Sequenzidentität, die im Laufe der Evolution durch Mutationsereignisse jedoch stark voneinander abweichen kann. Zum Großteil beruht die Namensgebung der HERVs auf der zellulären, spezifischen tRNA, welche sich an die Primerbindungsstelle anheftet und die reverse Transkriptasereaktion initiiert. Beispielsweise wird ein Provirus, bei dem die tRNA an ein Lysin (K) bindet, in die Familie der HERV-K eingeordnet. Die Taxonomie und Nomenklatur der HERVs ist jedoch nicht einheitlich, so dass andere HERVs ihre genaue Bezeichnung anhand einer Klonnummer (z. B. HERV-HS49C23), eines Aminosäuremotivs (z. B. HERV-FRD) oder von nahe gelegenen Genen (z. B. HERV-ADP; auch ADP-*pol* genannt) erhielten.

Die meisten HERV-Familien sind sehr alt und waren bereits endogener Bestandteil des Genoms als sich die Linie der Altwelt- und Neuwelt-Affen trennte, was auf eine Integration der Retroviren von vor über 35 Millionen Jahren schließen lässt [Bannert *et al.*, 2006]. Neben Stammbaumanalysen bietet der Vergleich der beiden LTR's (long terminal repeats), welche

das Provirus flankieren, eine zusätzliche Möglichkeit der Altersschätzung von HERVs. Zum Zeitpunkt der retroviralen Integration in das humane Genom oder dessen Vorfahren waren die LTR's identisch [Tristem, 2000]. Statistisch gesehen findet pro Jahr ein mutierender Basenaustausch mit einer Wahrscheinlichkeit von $2,3 \times 10^{-9}$ bis 5×10^{-9} pro LTR statt [Johnson und Coffin 1999], was rechnerisch eine Veränderung der beiden LTR's alle 200,000 bis 450,000 Jahre bedeuten würde [Turner *et al.*, 2001]. Dadurch lassen sich Rückschlüsse ziehen, dass bestimmte HERV-Familien vor vermutlich 60- 70 Millionen Jahren endogene Bestandteile des Genoms von Keimbahnzellen wurden [Tristem, 2000]. HERV-L bildet eine der ältesten Familien von humanen endogenen Retroviren und bei HERV-K handelt es sich wohl um die bislang jüngste [Turner *et al.*, 2001; Belshaw *et al.*, 2004; Gifford *et al.*, 2005]. Die Altersschätzung ist jedoch schwierig, weil im Laufe der Evolution die Mutationsrate nicht immer konstant war. Ein weiterer Grund ist das Auftreten von Genkonversion, bei der es zu einer partiellen, nicht-reziproken Rekombination und Ausbildung von Heteroduplexbereichen kommt [Bollag *et al.*, 1992].

1.2.1.1 Pathogenese und Benefiz von HERV

In vielen Säugetierarten wie Katzen, Mäusen oder Schafen impliziert man die verschiedenen Retroviren mit Leukämien, Brusttumoren, Lungenkarzinomen oder Krebs. Dabei kann ein möglicher Mechanismus der Tumorgenese die provirale Integration ins Wirtsgenom darstellen, aufgrund dessen die Expression von in der Nähe befindlichen Genen empfindlich gestört ist [Landry und Mager, 2003; Landry *et al.*, 2003]. Eine weitere mögliche Ursache bieten vom Retrovirus gebildete onkogene Proteine, wie z. B. das *env*-Gen des JSRVs oder das *tax*-Gen von HTLV-1 [Zavala *et al.*, 2003; Wootton *et al.*, 2006; Albrecht und Lairmore, 2002; Mahieux und Gessain, 2003]. Onkogene Proteine interagieren mit der Wirtsmaschinerie auf eine fatale Weise, so dass Stoffwechselwege beeinflusst werden, die zu Fehlfunktionen und unkontrollierter Zellproliferation führen. Da auch HERV-Expression vermehrt in Tumoren gefunden wurde, vermutet man bei humanen endogenen Retroviren ebenfalls potentiell pathogene Verbindungen [Löwer 1999]. In menschlichen Geweben und Zelllinien wurde bereits die Aktivität von HERV nachgewiesen, da in einer Brustkrebszelllinie und Teratokarzinomzelllinien HERV-Expression gezeigt werden konnte [Kurth *et al.*, 1980; Ono *et al.*, 1987; Faff *et al.*, 1992; Boller *et al.*, 1993]. Dies drückte sich ebenfalls in Patientenmaterial von Lymphom- und Brustkrebserkrankten aus, bei denen reverse Transkriptase-Aktivität und HERV-K-RNA gemessen und Retrovirus-ähnliche Partikel in den

Monozyten gefunden wurden [Al-Sumidaie *et al.*, 1988 Contreras-Galindo *et al.*, 2008]. Auch in Melanomen und Menschen mit Brustkrebs konnten verstärkt *env*-Transkripte von HERV-K detektiert werden [Wang-Johanning *et al.* 2001 und 2003; Büscher *et al.*, 2006]. Jedoch gelang es bislang noch nicht, HERV als Risikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs zu isolieren [Burmeister *et al.*, 2004]. Bei Patienten mit Leukämie, Melanomen oder insbesondere bei testikulären Tumoren konnte sogar in einigen Fällen eine humorale Immunantwort gegen HERV-K detektiert werden [Denner *et al.*, 1995; Sauter *et al.*, 1995; Boller *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 2008]. Ebenso wurden HERV-Expressionen mit Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht. HERV-H und -K113 stehen in Verdacht, neurologische Erkrankungen, wie Multiple Sklerose oder Sjögren Syndrom zu begünstigen und konnten ebenfalls in klinischem Material nachgewiesen werden [Perron *et al.*, 1997; Christensen 2005; Krzysztalowska-Wawrzyniak *et al.*, 2011]. Dementsprechend zeigten britische Studien, dass Erkrankte durchschnittlich häufiger Träger von HERV-K113 waren als gesunde Menschen [Moyes *et al.*, 2005].

Ob es sich bei der erhöhten HERV-Expression um die Ursache oder die Folgen der Tumorerkrankung handelt muss in der Zukunft noch genauer untersucht werden. Weitere Arbeiten stärken jedoch den Verdacht von onkogenen HERV-Proteinen, wie das akzessorische Proteine Np9 und Rec, welche von HERV-K gebildet werden und mit dem Transkriptionsfaktor PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) interagieren [Boese *et al.*, 2000; Denne *et al.*, 2007]. PLZF wird bei der Spermatogenese benötigt und fungiert als Tumorchemmer. Die Beeinträchtigung der Spermatogenese führt zu erhöhten Keimzelltumoren. Durch die Interaktion des PLZF-Proteins mit HERV-K ist ein möglicher Wirkmechanismus des endogenen Retrovirus vorstellbar, der die Tumorentstehung begünstigen würde. Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion des Rec-Proteins von HERV-K113 mit hSGT, welches die Aktivität des Androgenrezeptors reguliert. Durch die Bindung von Rec an hSGT kommt es zu einer Stimulierung des Androgenrezeptors, wodurch die Zellproliferation induziert und das Tumorwachstum gefördert werden kann [Promotionsarbeit Kirsten Hanke]. In der Arbeitsgruppe von Mueller-Lantzsch konnte eine weitere Interaktion von HERV-K Rec mit TZFP (testicular zinc finger protein) identifiziert werden [Kaufmann *et al.*, 2010]. Über TZFP ist bislang nur sehr wenig bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass TZFP ein direkter Partner und Co-Repressor des Androgenrezeptors ist [Ishizuka *et al.*, 2005]. Die Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Rec als mögliches Onkoprotein fungiert, indem es zu einer Dysregulation von wichtigen Transkriptionsfaktoren, wie den Androgenrezeptor, führt.

Auf der anderen Seite haben HERV-W und HERV-FRD einen positiven Einfluss auf die Schwangerschaft und Plazentabildung [Blond *et al.*, 2000; Mangeney *et al.*, 2007]. Die viralen *env*-Gene dieser HERVs kodieren für das Syncytin-1 und Syncytin-2, welche vor allem im Syncytiotrophoblasten exprimiert werden. Syncytin-1 ist ein sehr stark fusogenes Membranprotein und vermittelt *in vivo* eine Verschmelzung des plazentalen Trophoblasten [Mi *et al.*, 2000]. Syncytin-2 hingegen besitzt immunsuppressive Eigenschaften und könnte bei der Mutter-Kind-Toleranz eine wichtige Rolle spielen.

Bei viralen Infektionen durch das *Spleen Necrosis Virus* (SNV) wird HERV-W ebenfalls eine positive Wirkung zugesagt. Zelllinien, die das HERV-W Glykoprotein exprimieren, weisen aufgrund einer Rezeptorinterferenz eine Resistenz gegenüber einer Sekundärinfektion durch SNV auf [Ponferrada *et al.*, 2003]. Dies war der erste Beweis, dass Genprodukte endogener Retroviren die Infektion eines exogenen Retrovirus blockieren.

Nicht nur virale Proteine endogener Retroviren können dem Wirt von Nutzen sein, sondern auch aktive Promotoren verschiedener HERV-LTR's, die so die Transkription von benachbarten Genen regulieren. Die Promoteraktivität einer HERV-E LTR führt z. B. zu einer starken Expression eines Amylasegens in der Speicheldrüse. Dadurch ist der Mensch in der Lage Nahrung besser als andere Säugetiere aufzuschließen [Samuelson *et al.*, 1996; Bannert und Kurth, 2004].

1.2.2 Die Familie HERV-K(HML-2) und HERV-K113

Die Familie der HERV-K(HML-2) wurde bereits 1980 durch Kurth *et al.* in humanen Teratokarzinomkulturen beschrieben und später aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem *Mouse Mammary Tumor Virus* zur Gruppe der β -Retroviren gezählt [Kurth *et al.*, 1980; Callahan *et al.*, 1982; Ono *et al.*, 1986 und 1987]. HERV-K wird in insgesamt elf Gruppen eingeteilt: human MMTV-like 1 bis 9 (HML 1-9), HERV-K(C4) und HERV-K(14C) [Bannert *et al.*, 2006]. Die Integration der HERV-K(HML-2) erfolgte vor 30 Millionen Jahren in die Keimbahnzelle der Altweltprimaten und zählt damit zu einen der wohl jüngsten und am besten charakterisierten humanen endogenen Retroviren [Reus *et al.*, 2001; Macfarlane und Simmonds, 2004; De Parseval *et al.*, 2005]. Die endgültige Fixierung von einigen Vertretern der HERV-K(HML-2) fand jedoch erst viel später statt, als sich bereits die Linie der Menschen und Schimpansen getrennt hatte. Dies lässt auf ein Alter von ca. 6 Millionen Jahren schließen [Medstrand *et al.*, 1998]. Bis auf einige wenige Mutationen sind die Sequenzen von HERV-K(HML-2)-Elementen bemerkenswert gut erhalten, was auf eine konstant andauernde

Selektion hindeutet [Gifford *et al.*, 2003]. Bis heute gelang es insgesamt 70 humanspezifische Insertionen zu identifizieren, von denen 15 bis 20 hochkonservierte provirale Genome darstellen [Belshaw *et al.*, 2004 und 2005].

2001 entdeckte Turner *et al.* in einer humanen BAC Library eines der wohl am besten erhaltenen retroviralen Elemente, das humane endogene Retrovirus K113. Dieses besitzt vollständig offene Leserahmen für alle viralen Proteine und weist innerhalb der flankierenden LTR's nur drei Sequenzunterschiede auf, welche auf ein Alter von weniger als 600,000 Jahre rückschließen lassen [Turner *et al.*, 2001]. Das Provirus ist auf Chromosom 19p13.11 integriert und kommt nur bei einem Teil der menschlichen Bevölkerung vor, was einem allelen Polymorphismus entspricht [Turner *et al.*, 2001, Moyes *et al.*, 2005, Beimforde *et al.*, 2007]. In Großbritannien beträgt die Prävalenz etwa 4 % [Moyes *et al.*, 2005], in Polen ist HERV-K113 sogar in 8 % der Bevölkerung vorhanden [Krzyszczalowska-Wawrzyniak *et al.*, 2011]. Im Gegensatz dazu findet man in der afrikanischen Population ca. 30 % Träger, die z. T. auch homozygot sind [Moyes *et al.*, 2005]. Diese hohe Prävalenz unterstützt die Hypothese, der Integration von HERV-K113 im damaligen Afrika.

Einige Mutationen in den *gag*- und *pol*-Genen von HERV-K113 führten jedoch zum Replikationsverlust [Beimforde *et al.*, 2008; Heslin *et al.*, 2009]. Bislang ist es noch niemandem gelungen ein funktionelles HERV-K(HML-2)-Provirus zu entdecken, das im Stande ist infektiöse Partikel zu bilden. Aus Sequenzvergleichen verschiedener HERV-K(HML-2) Familien gelang es jedoch Konsensussequenzen zu entwerfen, mit deren Hilfe HERV-Partikel gebildet werden konnten [Dewannieux *et al.*, 2006; Lee und Bieniasz, 2007]. Diese HERV-K(HML-2) Virionen sind infektiös und integrieren ins Wirtsgenom, aber für eine Replikation fehlt bislang noch jeder Beweis.

1.2.2.1 Genomischer Aufbau des Provirus von HERV-K113

Das Provirus von HERV-K113 kodiert für die Produkte Gag, Pro, Pol, Env und Rec [Löwer *et al.*, 1996; Bannert und Kurth, 2004]. In der Abbildung 6 ist der Aufbau des 9472 bp langen Provirus mit seinen verschiedenen Transkripten veranschaulicht. Die gruppenspezifischen Antigene setzen sich aus den Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteinen zusammen. Das *pro*-Gen ist für die Synthese der Protease zuständig. Das *pol*-Gen enthält die Information zur Synthese der reversen Transkriptase, RNaseH und Integrase. Die Prozessierung der Gag- und Pol-Vorläuferproteine erfolgt durch die virale Protease. Das virale Hüllprotein, kodiert durch das *env*-Gen, entsteht aus einem unvollständig gespleißten Transkript. Andererseits wird aus

einem vollständig gespleißten Transkriptionsprodukt das akzessorische Rec (regulator of expression encoded by *corf*)-Protein gebildet. Es ist in seiner Funktion dem Rev von HIV-1 und dem HTLV Rex-Protein sehr ähnlich und vermittelt den viralen RNA-Transport aus dem Zellkern ins Zytoplasma [Löwer *et al.*, 1995; Magin *et al.*, 1999 und 2000]. Zusätzlich tritt eine dritte 1,5 kb große Spleißvariante mit noch ungeklärter Funktion auf, die als *hel* bezeichnet wird [Löwer *et al.*, 1984; Beimforde *et al.*, 2008].

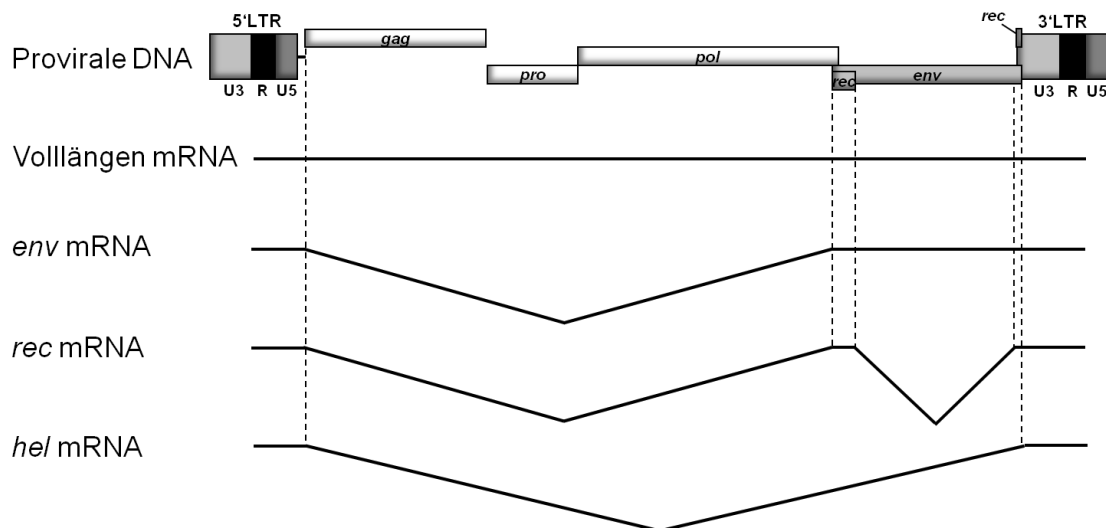


Abbildung 6: Proviralear Aufbau von HERV-K113: Die beiden LTR's flankieren die provirale Sequenz der *gag*-, *pro*-, *pol*-, *env*- und *rec*-Leserahmen. Die verschiedenen HERV-K mRNA-Spezies (Volllängentranskript, dem einfach gespleißten *env*, vollständig gespleißten *rec* und einfach gespleißten *hel*) sind unterhalb schematisch dargestellt.

Das provirale Genom von HERV-K113 wird an den 5'- und 3'-Enden von nahezu identischen LTR's flankiert, die aus der U3-, R- und U5-Region zusammengesetzt sind. Diese weisen essentielle Funktionen der Genexpression, wie Promoter, Enhancerelemente und *cis*-aktive Sequenzen auf. Innerhalb der R-Region ist der Transkriptionsstart sowie das Polyadenylationsignal lokalisiert. Die RT-Polymerasereaktion wird durch die Bindung der spezifischen, zellulären, Lysin-tragenden tRNA an der Primerbindungsstelle initiiert, welche sich vor dem *gag*-Leseraster befindet [Bannert *et al.*, 2006].

1.2.2.2 Das Hüllprotein (Env)

Die intensive Suche nach konservierten humanen endogenen Retroviren mit noch vollständig offenen Leseraster führte zur Identifizierung von insgesamt 18 *env*-Genen, von denen allein sechs aus der Familie der HERV-K(HML-2) stammen [Benit *et al.*, 2001; de Parseval *et al.*,

2003; Villesen *et al.*, 2004]. Diese Gene sind sehr gut erhalten und weisen eine hohe Aminosäureidentität von über 97 % auf [Dewannieux *et al.*, 2005], welche das junge Alter der HERV-K(HML-2) und die erst vor kurzem stattgefundenene Integration ins humane Genom verdeutlicht. Phylogenetische Analysen, basierend auf der Aminosäuresequenz verschiedener retroviraler Env-TM-Proteine, sind in Abbildung 7 dargestellt und zeigen eine nahe Verwandtschaft des HERV-K Envs zu anderen β -Retroviren, wie dem *Jaagsiekte Sheep Retrovirus*, dem *Enzootic Nasal Tumor Virus* (ENTV) oder dem *Mouse Mammary Tumor Virus* [Dewannieux *et al.*, 2005].

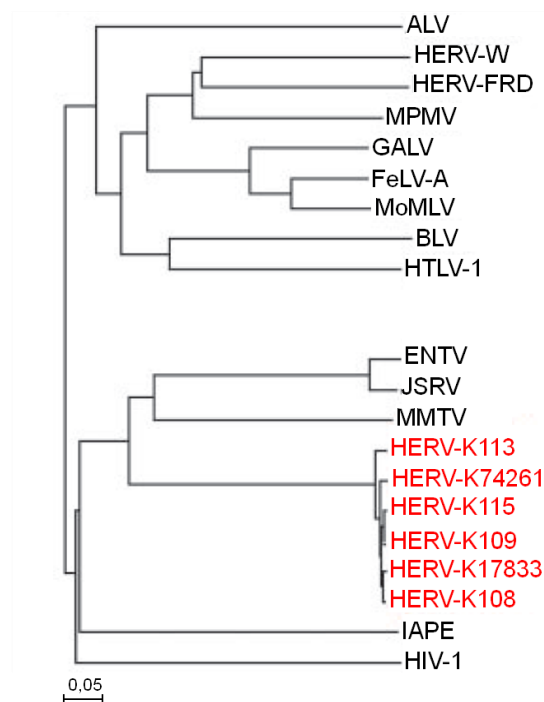


Abbildung 7: Phylogenetische Analyse retroviraler Hüllproteine. Vergleich unterschiedlicher retroviraler Env-TM-Aminosäuresequenzen mittels der „Neighbor-Joining“-Methode. Sechs HERV-K Kopien besitzen eine enge Verwandtschaft mit Hüllproteinen der β -Retrovirusgruppe. Andere Env-TM-Proteine von HERV-W oder HERV-FRD zeigen eher Ähnlichkeiten mit MPMV. ALV, *Avian Leukosis Virus*; MPMV, *Mason-Pfizer Monkey Virus*; GALV, *Gibbon Ape Leukemia Virus*; FeLV-A, *Feline LV-A*; MoMLV, *Moloney-Murine LV*; BLV, *Bovine LV*; HTLV-1, *Human T-Cell LV Type-1*; ENTV, *Enzootic Nasal Tumor Virus*; JSRV, *Jaagsiekte Sheep Retrovirus*; MMTV, *Mouse Mammary Tumor Virus*; IAPE, *Intracisternal A-Particle-Related Envelope-Encoding Element*; HIV-1, *Human Immunodeficiency Virus Typ-1*. Abbildung aus Dewannieux *et al.*, 2005.

Das unprozessierte Env-Vorläuferprotein von HERV-K113 ist ca. 80 kDa groß und besteht aus einem Oberflächenglykoprotein (SU, surface unit) mit dem theoretischen Molekulargewicht von 42 kDa, einem transmembranen Hüllprotein (TM, transmembrane unit) mit dem Molekulargewicht von 26 kDa (Abbildung 8) und einem 11 kDa großen Signalpeptid.

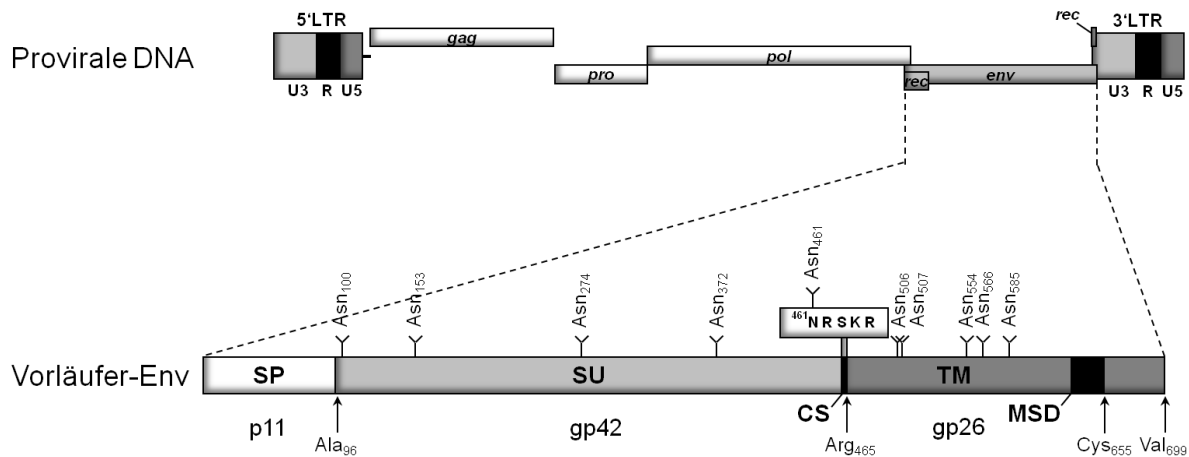


Abbildung 8: Darstellung des Env-Proteins von HERV-K113. Detaillierte Vergrößerung des Hüllproteins aus dem proviralen Aufbau von HERV-K113. Das Vorläufer-Env besteht aus einem für Retroviren sehr großen 11 kDa Signalpeptid (SP), einem 42 kDa Oberflächenglykoprotein (SU) und einer transmembranen Untereinheit (TM) mit einem molekularen Gewicht von 26 kDa. Bereits während der Translation des Env-Proteins am rauen endoplasmatischen Retikulum wird das Signalpeptid abgespalten. Die Prozessierung des Env-Vorläuferproteins in seine Untereinheiten SU und TM erfolgt durch eine zelluläre Furin-Protease innerhalb der „cleavage site“ (CS) mit dem Aminosäuremotiv R-S-K-R. Das transmembrane Hüllprotein besitzt einen stark hydrophoben Bereich, der als „membran spanning domain“ (MSD) bezeichnet wird und die Verankerung des Hüllproteins in die Wirtsmembran bewirkt. Das Env von HERV-K113 ist mit zehn potentiellen N-Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) sehr stark glykosyliert, wobei sich eine Glykosylierungsstelle direkt an der CS befindet.

Die viralen Hüllproteine von HERV-K113, deren subzelluläre Lokalisation die umgebende Plasmamembran der Wirtszelle ist, werden aufgrund einer Amino-terminalen Signalsequenz durch Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet [Walter und Lingappa, 1986; Pfeffer und Rothman, 1987; Lingappa, 1989]. Gegenüber anderen Retroviren besitzt das Hüllprotein von HERV-K113 mit 93 Aminosäuren ein außerordentlich langes Amino-terminales Signalpeptid (SP). Dieses wird bereits während der Passage des Proteins in das ER co-translational entfernt und es erfolgen erste Modifikationen des viralen Hüllproteins, wie z. B. die Verknüpfung mit Oligosacchariden [Rothman und Lodish, 1977; Kornfeld und Kornfeld, 1985].

Bereits während der Synthese wird das retrovirale Env in der Membran des Wirts verankert. Diese erfolgt am rauen ER über eine mit mehreren hydrophoben Aminosäuren umfassende Sequenz (membrane spanning site, MSD) im transmembranen Glykoprotein. Bei einigen γ -Retroviren weist der Carboxy-Terminus des transmembranen Hüllproteins am Ende eine kurze Aminosäuresequenz auf, die als R-Peptid bezeichnet wird [Green *et al.*, 1981; Henderson *et al.*, 1984; Hurtley und Helenius, 1989] und beim Einbau des Hüllproteins in die Membran hinderlich sein kann [Yang und Compans, 1996 und 1997; Merten *et al.*, 2005].

Das C-terminale Ende des TMs ist auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert und kann durch virale Proteasen abgespaltet werden. Beim *Gibbon Ape Leukemia Virus* (GaLV) [Merten *et al.*, 2005] und bei SIVmac [Shacklett *et al.*, 2000 und 2001] konnte gezeigt werden, dass durch eine C-terminale Deletion der Hüllproteine deren Einbau in die Zellmembran begünstigt wird. Zudem konnte eine verbesserte Membranfusion bei einer C-terminal verkürzten Env-Mutante des *Porcine Endogenous Retrovirus* nachgewiesen werden [Bobkova *et al.*, 2002]. Die Abspaltung des zytoplasmatischen Teils führt bei HERV-W jedoch zum Verlust der Fusogenität [Cheynet *et al.*, 2005].

Durch eine zelluläre Furin-Protease wird das Env-Vorläuferprotein noch während des Transports zur Membran proteolytisch in seine beiden Untereinheiten SU und TM gespalten [Kowalski *et al.*, 1987; Hunter und Swanstrom, 1990]. Die Furin-Protease bindet dabei spezifisch an eine vier Aminosäuren lange Sequenz mit dem Motiv Arginin-X-Lysin/Arginin-Arginin (R-X-K/R-R), die als Spaltstelle oder „cleavage site“ (CS) bezeichnet wird [Dickson und Peters, 1983; Perez und Hunter, 1987; McCune *et al.*, 1988]. Bei X handelt es sich um eine beliebige Aminosäure. Die Spaltung des Hüllproteins erfolgt nach dem letzten Arginin (R) und die beiden Untereinheiten bleiben anschließend nicht kovalent miteinander verknüpft. Während des Env-Transports durch das ER/Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran finden weitere Modifikationen, wie die Verknüpfung oder Eliminierung von Kohlenhydraten, die Ausbildung von Disulfidbrücken oder Konformationsänderungen am Protein statt [Freedman, 1984; Kornfeld und Kornfeld, 1985]. Für das virale Hüllprotein sind Glykosylierungen nicht nur für dessen Funktionalität, Faltung, Oligomerisierung und intrazellulären Transport von entscheidender Bedeutung, sondern dienen auch zur „Maskierung“ der viralen Oberflächenstrukturen vor einer wirtseigenen Immunantwort [Helenius und Aebi, 2001 und 2004; Granados-González *et al.*, 2009]. An einer Asparaginseitenkette mit der entsprechenden Aminosäuresequenz Asparagin-X-Serin/Threonin (N-X-S/T) wird die Zuckergruppe mit dem Protein über eine kovalente Bindung verknüpft. X stellt dabei erneut eine beliebige Aminosäure, mit Ausnahme von Prolin dar. Das Env-Protein von HERV-K113 besitzt insgesamt zehn potentielle N-Glykosylierungsstellen. Davon befinden sich fünf auf der extrazellulären Seite des TMs und fünf im SU, wobei eine potentielle Glykosylierung direkt an der „cleavage site“ lokalisiert ist.

Das virale Hüllprotein gelangt nach erfolgtem Transport über das trans-Golgi-Netzwerk an die Zellmembran [Vogt, 1997]. Hier erfolgt die Viruspartikelbildung, Knospung der Virionen und Inkorporation der Env-Proteine. Dazu verbindet sich das zusammengebaute Virus-Capsid mit der Wirtsmembran und den darin eingelagerten viralen Hüllproteinen [Demirov und

Freed, 2004]. Bei MPMV konnte gezeigt werden, dass die Env-Expression dabei entscheidenden Einfluss auf die subzelluläre Destination des Gags und auch auf den intrazellulären RNA-Transport hat [Sfakianos und Hunter, 2003; Cochrane *et al.*, 2006].

Bei ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen von HIV wurde bereits sehr früh die Zusammenlagerung mehrerer Hüllprotein-Monomere vermutet [Gelderblom *et al.*, 1987; Özel *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1989]. Für zahlreiche Virionen konnte später die Bildung von Oligomeren, vor allem Trimere aus prozessierten Env-Untereinheiten bestätigt werden. Dabei sind die HIV-Env-Monomere untereinander durch schwache, nicht kovalente Interaktion miteinander verbunden [Wyatt und Sodroski, 1998; Poignard *et al.*, 2001; Eckert und Kim, 2001]. In Versuchen mit HIV-Hüllproteinmutanten konnte gezeigt werden, dass nur drei vollständig prozessierte Env-Monomere die erforderliche Membranverschmelzung für den Viruseintritt in die Wirtszelle vermitteln [Welman *et al.*, 2007].

Das infektiöse Virion mit in der Virusmembran eingelagerten Hüllproteinen wird anschließend durch Knospung (Budding) freigesetzt. Wie in der Abbildung 9 zu erkennen, ist die glykosylierte SU-Untereinheit des viralen Hüllproteins außerhalb des Partikels lokalisiert. Das Oberflächenglykoprotein leitet die Adsorption bei einer späteren Zellinfektion ein, indem es spezifische Rezeptormoleküle in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle erkennt und sich an diese anheftet.

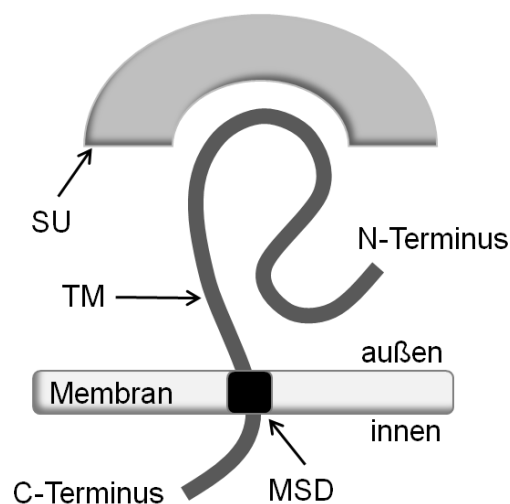


Abbildung 9: Schematische Struktur des Hüllproteins: Während des Transports des viralen Env-Proteins zur Zellmembran wird es von einer zellulären Furin-Protease in das Oberflächenglykoprotein (SU) und die transmembranäre Untereinheit (TM) gespalten, die über eine nicht kovalente Bindung zusammenlagert sind. Dabei ist SU ausschließlich extrazellulär lokalisiert, wohingegen TM über einen Bereich mit mehreren hydrophoben Aminosäuren (membrane spanning domain, MSD) in die Membran verankert ist und sowohl eine extrazelluläre-, als auch eine intrazelluläre Domäne aufweist. Der C-terminale Bereich innerhalb der Zelle oder später intrapartikuläre Bereich wird als zytoplasmatisches Ende bezeichnet. Abbildung verändert nach Gallaher *et al.*, 1989.

Das transmembrane Hüllprotein besteht aus einer extrapartikulären-, transmembranen- und intrapartikulären Domäne und vermittelt die Fusion der Virus- und Wirtszellmembran.

Der Infektionsprozess ist am Beispiel von HIV-1 in der Abbildung 10 dargestellt. Die Bindung an dem spezifischen Rezeptor CD4 wird durch das retrovirale Oberflächen-Glykoprotein gp120 vermittelt. Nach Anheftung erfolgt eine Umlagerung des gp120, welches eine konservierte Domäne im SU freilegt, die die Chemokin-Co-Rezeptorbindung von CXCR4 oder CCR5 ermöglicht [Wyatt und Sodroski, 1998; Berger *et al.*, 1999; Doms und Moore, 2000]. Diese erhaltene Region ist in der trimeren-Form des HIV-Envs durch Protein-Loops in der Tertiärstruktur verdeckt und wird erst nach initialer Bindung an CD4 nach außen präsentiert [Kwong *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 1998]. Um ein Env-Trimer zu aktivieren bedarf es jedoch mehrerer CD4-Bindungen. Nach eingesetzter Co-Rezeptor-Bindung wird der N-terminale hydrophobe Teil des transmembranen Fusionsproteins gp41 freigelegt, welcher sich in die Wirtsmembran inseriert und die sogenannte „six-helix bundle“-Formation bildet [Doms und Moore, 2000; Dwyer *et al.*, 2003]. Die extrazelluläre Domäne des HIV gp41 besteht aus einem Fusionsprotein, einer N-terminalen „heptad repeat“-Domäne (NHR), einem Loop-Bereich und einer C-terminalen „heptad repeat“-Domäne (CHR). Die helikalen CHR Domänen jeder der drei gp41-Untereinheiten werden nach außen zu den NHR-Domänen umgeklappt, was die jeweiligen Fusionspeptide und transmembranen Untereinheiten von gp41 in unmittelbarer räumlicher Nähe bringt [Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997]. Die Konformationsänderung setzt essentielle Energie frei, die letztendlich zur Ausbildung einer Zellmembranpore führt, in die das Capsid-verpackte RNA-Genom entlassen werden kann [Doms und Moore, 2000; Melikyan *et al.*, 2000]. Höchstwahrscheinlich sind mehr als zwei Env-Trimere an der Porenbildung beteiligt. Jedoch ist nicht bekannt, ob gp120 während der gesamten Verschmelzung der Membranen vorhanden ist oder von gp41 dissoziiert. Ein aktuelles Modell besagt, dass sich die Verknüpfung der SU- und TM-Untereinheit nach der Rezeptorerkennung des SU trennt und durch das Freilegen der TM-Untereinheit die Membranfusion und der Viruseintritt begünstigt werden [Sanders, 2000]. Am Beispiel des Env-Proteins des *Moloney-Murine Leukemia Virus* konnte gezeigt werden, dass die „membrane spanning“-Domäne ebenfalls an der Fusion beteiligt ist [Taylor und Sanders, 1999]. Der genau stattfindende Prozess ist bislang nur sehr wenig verstanden.

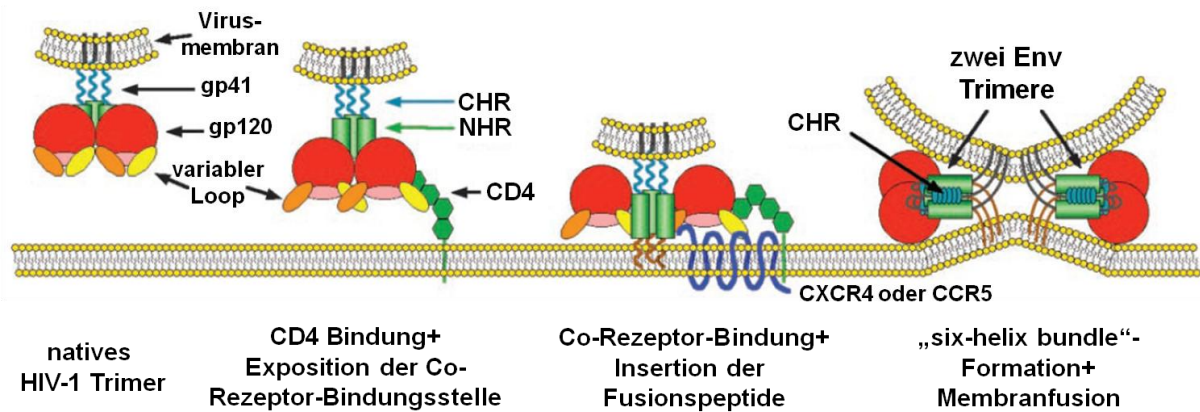


Abbildung 10: Schematische Darstellung des HIV-1-Infektionsprozesses. Der erste Kontakt zwischen Wirtsmembran und Virus erfolgt durch das virale Glykoprotein gp120 mit der Bindung an den CD4-spezifischen Rezeptor. Es kommt zur Umlagerung des variablen Loops und zur Exposition der Co-Rezeptorbindungsstelle. Nach Co-Rezeptorbindung an CXCR4 oder CCR5 wird das N-terminale Fusionspeptid von gp41 in die Zellmembran der Wirtszelle inseriert und die „six-helix bundle“-Formation ausgebildet. Durch einen Umklappmechanismus der „heptad repeat“-Domänen CHR und NHR wird Energie freigesetzt worauf es zur Membranverschmelzung und Öffnung einer Fusionspore kommt. Wie viele Env-Trimere dabei beteiligt sind ist nicht bekannt. Abbildung aus Doms und Moore, 2003.

In den letzten Jahren gelang es drei HERV *env*-Sequenzen zu identifizieren, die ein vollständig funktionelles Hüllprotein exprimieren [Blond *et al.*, 2000; Mi *et al.*, 2000; Blaise *et al.*, 2003 und 2004; Dewannieux *et al.*, 2005]. Diese viralen *env*-Gene von HERV-W, HERV-FRD und HERV-K108 blieben im Gegensatz zum HERV-K113 Hüllprotein nach erfolgter Integration in den menschlichen Vorfahren größtenteils von dramatischen, inaktivierenden Mutationen verschont.

1.2.2.3 Rekonstruktion eines funktionellen Hüllproteins von HERV-K113

Im Laufe der Evolution führten bei HERV-K113 u.a. einige Basenaustausche in der reversen Transkriptase des Provirus und eine entscheidende postinsertionale Mutation im *gag* zum Verlust der Replikationskompetenz [Turner *et al.*, 2001; Beimforde *et al.*, 2008; Heslin *et al.*, 2009]. Das Env-Protein von HERV-K113 blieb davon ebenfalls nicht verschont [Dewannieux *et al.*, 2005; Beimforde *et al.*, 2008] und erweckte das Interesse der Wiederherstellung eines funktionellen Hüllproteins das zum Zeitpunkt der Integration des HERV-K113 ins humane Genom vorlag [Hanke *et al.*, 2009]. In Säuger- und Insektenzellen konnte zwar die Env-Expression von HERV-K(HML-2) gezeigt werden, jedoch wurde das Vorläuferprotein weder prozessiert noch an die Zellmembran transportiert [Tönjes *et al.*, 1997]. Das

Hüllprotein von HERV-K113 wird ebenfalls nur sehr schwach in Säugetierzellen exprimiert und ist nicht in der Lage in retrovirale Partikel eingebaut zu werden [Hanke *et al.*, 2009].

Der geringe GC-Gehalt von 42 %, die daraus resultierende niedrige Halbwertszeit der mRNA und der Einbau von seltenen Nukleotidtripletts in humanen Zelllinien waren entscheidende Gründe für die niedrige Env-Proteinexpression. Außerdem führte alternatives Spleißen der mRNA zur Entstehung des RNA-Transportproteins Rec (siehe Abbildung 6) und erniedrigter *env*-Transkriptmenge. Eine von der Firma Geneart hergestellte codonoptimierte Sequenz (Accession Number des *wtEnv*: AY037928) beseitigte die Limitierung der niedrigen Proteinexpression durch synonymen Austausch von 71 % der Codons. Die Aminosäuresequenz des synthetischen, codonoptimierten coEnv war zu einhundert Prozent mit der *wtEnv*-Sequenz identisch. Jedoch führte die Steigerung des GC-Gehaltes auf 63 %, die Eliminierung der internen Spleißstelle und die Klonierung in einen CMV-Promoter angetriebenen Vektor zu einer über 50-fach erhöhten Proteinexpression in Western Blot- und Immunofluoreszenz-Versuchen [Hanke *et al.*, 2009].

Zur Identifizierung der postinsertionalen Mutationen, die das *env* im Laufe der Zeit im humanen Genom erfahren hat, wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Kirsten Hanke die Aminosäuresequenz von HERV-K113 Env mit zehn hochkonservierten, humanspezifischen HERV-K(HML-2) Elementen abgeglichen (Abbildung 33 in 8.2.1). Nicht-synonyme Mutationen lagen vor, wenn keine oder nur eine der proviralen Env-Sequenzen an derselben Aminosäureposition mit HERV-K113 Env identisch war. Diese wurden durch gezielte Mutagenesen revertiert. HERV-K113 spezifische Variationen blieben jedoch erhalten. Diese authentischen Polymorphismen lagen vor, wenn mindestens zwei weitere provirale Env-Sequenzen wie HERV-K113 von der Konsensussequenz abwichen. Insgesamt wurden acht putative postinsertionale Aminosäureaustausche innerhalb der HERV-K113 Env-Sequenz identifiziert, wobei sich davon jeweils vier im Oberflächenglykoprotein (SU) und der transmembranen Untereinheit (TM) befanden (Abbildung 11). Die drei HERV-K113 spezifische Polymorphismen T137, I369 und V676 konnten durch Sequenzvergleich entdeckt werden, zwei befanden sich davon in der SU- und eine in der TM-Untereinheit. Das revertierte Env-Konstrukt, namens pcDNA3oricoEnv-V5 stellt das Hüllprotein von HERV-K113, zum Zeitpunkt der viralen Integration ins humane Genom vor ca. 600.000 Jahren dar. Durch den Verbleib der drei HERV-K113 spezifischen Variationen ist es jedoch nicht mit einer Konsensussequenz, die keinen natürlichen Ursprung hat vergleichbar. Die Rekonstitution des originalen HERV-K113 Envs bewirkte jedoch die Eliminierung einer

potentiellen Glykosylierungsstelle an der Aminosäureposition Asn₅₀₆ (Abbildung 11). Somit befinden sich innerhalb der oricoEnv-Sequenz nur neun potentielle Glykosylierungsstellen.

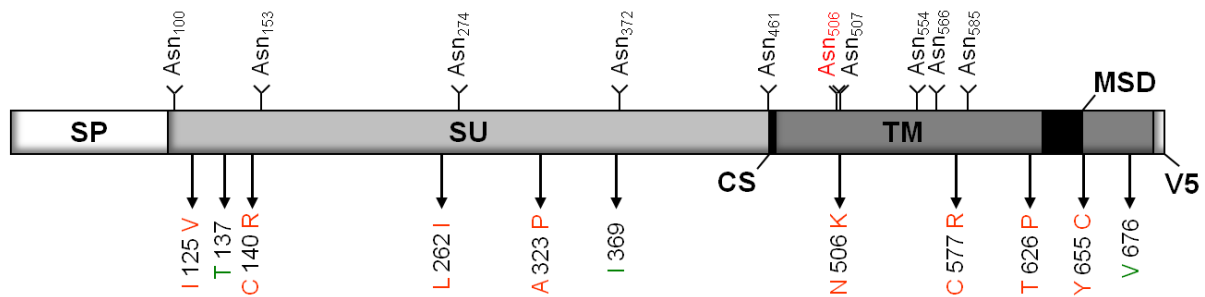


Abbildung 11: Schematische Darstellung von oricoEnv. Durch einen Sequenzvergleich 10 hochkonservierter HERV-K(HML-2) Elemente wurden insgesamt acht rot dargestellte postinsertionale Mutationen innerhalb der Env-Aminosäuresequenz identifiziert und zur Generierung von oricoEnv revertiert. Vier der Aminosäuresubstitutionen sind im SU und vier im TM lokalisiert. Drei HERV-K113 spezifische Variationen befinden sich im oricoEnv und sind grün markiert. Diese blieben unverändert und stellen den Unterschied zu einer Konsensussequenz dar. Zwei Variationen befinden sich im SU und eine in der TM-Untereinheit. Außerdem sind zehn potentielle Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) mit ihren Aminosäurepositionen und ein am TM befindlicher C-terminaler V5-Tag dargestellt. Die Rekonstitution der originalen HERV-K113 Env-Sequenz führte jedoch zur Eliminierung der rot markierten potentiellen Glykosylierungsstelle Asn₅₀₆.

Mit Hilfe dieses wiederhergestellten oricoEnvs liegt nun vermutlich das ursprünglich funktionelle Hüllprotein von HERV-K113 vor, welches die Infektion in Keimbahnzellen vermittelte und es uns nun ermöglicht Versuche zur Funktionalität, Fusogenität und Infektiosität zu unternehmen.

1.3 Retrovirale Rezeptoren, Entry-Faktoren und Tropismus

In den vergangenen Jahren war die Interaktion zwischen Retroviren und ihrer Wirtszelle Gegenstand intensiver Forschung, weil deren Infektionen zu Krankheiten wie Krebs oder Immunschwächen in ihrem Wirt führen könnten. Desweiteren versucht man Retroviren als Vehikel des Gentransfers zu verwenden, weil die verpackte RNA ein integrierter Bestandteil des Genoms wird. Schnell stellte sich jedoch heraus, dass eine Vielzahl von verschiedenen aufgebauten Zelloberflächenmolekülen als retrovirale Rezeptoren fungieren können. Innerhalb der sieben *Retroviridae*-Genera ähneln sich die spezifischen Rezeptormoleküle jedoch in ihrer Struktur und Funktion.

Zur initialen Infektion interagiert das virale Hüllprotein mit mindestens einem Oberflächenmolekül der Wirtszelle. Bei Alpha- und Gammaretroviren zum Beispiel bedarf es vorwiegend nur eines Rezeptormoleküls, welches sowohl den ersten Kontakt zwischen Virus und Zielzelle herstellt, als auch die Verschmelzung beider Membranen initiiert. Anders bei HIV-Infektionen, die wie in Kapitel 1.2.2.2 beschrieben, zuerst an CD4-Rezeptoren binden und zur Membranfusion CXCR4- oder CCR5-Co-Rezeptoren benötigen (Abbildung 10). Eine weitere Ausnahme stellt das feline Leukämie Virus Typ T (FeLV-T) der *Gammaretroviridae* dar, das durch die Bindung an dem Phosphattransportmolekül Pit1 den Rezeptor-induzierten Zellkontakt herstellt. Es ist jedoch noch ein zweites Protein, namens FeLIX (*Feline Leukemia Virus infection X-cessory protein*), im Infektionsprozess von entscheidender Bedeutung, ohne das FeLV-T nicht in der Lage ist in Wirtszellen einzudringen [Anderson *et al.*, 2000; Laming *et al.*, 2001]. Die Expression dieser Bindungs- und Fusionsrezeptoren definiert die Wirtszellspezifität des Retrovirus.

Bei vielen Retroviren ist der Eintritt in die Wirtszelle pH-Wert unabhängig oder erfolgt bei neutralem pH-Wert. Neueste Studien besagen jedoch, dass die Verschmelzung der Wirtszell- und Virusmembran einiger Retroviren, wie z. B. ecotrope MuLV [McClure *et al.*, 1990; Nussbaum *et al.*, 1993], Avian Sarcoma und Leukosis Virus Typ A und B [Mothes *et al.*, 2000; Diaz-Griffero *et al.*, 2002], Foamy-Viren [Picard-Maureau *et al.*, 2003], beim Virus der equinen infektiösen Anämie [Brindley und Maury, 2005], MMTV [Redmond *et al.*, 1984; Ross *et al.*, 2002] und JSRV [Bertrand *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2008] erst in Endosomen oder anderen intrazellulären Zellkompartimenten bei saurem pH-Wert erfolgt. Abhängig vom Virusstamm und des Zelltyps konnte gezeigt werden, dass andere Retroviren, sowohl einen pH-abhängigen als auch -unabhängigen Weg der Zellfusion und des Eintritts in die Zellen verwenden [McClure *et al.*, 1990; Nussbaum *et al.*, 1993; Katen *et al.*, 2001].

Ist das Virus jedoch in der Lage die Zelle über einen spezifischen Rezeptor zu infizieren und sich innerhalb der Zelle zu vermehren, indem es die Wirtsabwehr unterläuft oder ausschaltet, wird durch die Wirtszellspezifität der retrovirale Tropismus definiert. Isolate der MuLV weisen eine stark unterschiedliche Wirtsspezifität auf. Ecotrope MuLV infizieren primär Spezies eigene Nagetierzellen, wogegen 10A1 MuLV und amphotrope MuLV viele verschiedene Zellen unterschiedlicher Spezies infizieren können, eingeschlossen murine Zellen. Das xenotrope MuLV hat ein ähnliches Wirtsspektrum wie amphotrope Viren, ist aber nicht in der Lage Mäusezellen zu infizieren. Polytrope MuLV-Isolate hingegen infizieren wie amphotrope MuLV, lösen jedoch einen einzigartig zytoplasmatischen Effekt in Nerzzellen aus, der zum Zelltod führt.

Sobald ein Retrovirus seine Zielzelle produktiv infiziert hat, wird diese für weitere Infektionen von Viren („Superinfektionen“), die denselben Rezeptor verwenden resistent. Die Ursache hierfür liegt in der Rezeptorinterferenz des Retrovirus der bereits infizierten Zelle [Steck und Rubin, 1966]. Die Rezeptorinterferenz kann durch Internalisierung des Rezeptors von der Zelloberfläche, Unterbrechung des Rezeptortransports zur Membran und/ oder Konkurrenz-Inhibition der Rezeptor-Bindungs-Domäne hervorgerufen werden [Hunter, 1997]. Tiere, die das Glykoprotein eines endogenen felines Leukämie Virus Typ A (enFeLV-A) exprimieren, bildet eine natürliche Barriere durch FeLV-B infiziert zu werden, welches an den gleichen Rezeptormolekülen bindet [McDougall *et al.*, 1994]. Bevor die ersten Rezeptoren identifiziert werden konnten, wurden viele Retroviren nach ihren Rezeptorinterferenz-Gruppen, als Viren die denselben Rezeptor verwenden, klassifiziert. In den letzten Jahrzehnten gelang es für mehr als die Hälfte dieser Gruppen ihren spezifischen Rezeptor zu entdecken. In der Tabelle 1 ist eine Liste der bereits identifizierten Rezeptoren mit ihrer Funktion beschrieben. Viele der Rezeptoren sind Oberflächenmoleküle, die nur einfach in der Membran verankert sind (CD4) oder mehrere Membran-durchlaufende Domänen (CAT-1 oder Pit1) besitzen. Andere Rezeptorproteine besitzen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- Anker und sind so an der Außenseite der Plasmamembran fest gebunden.

Das *Jaagsiekt Sheep Retrovirus*, ein β -Retrovirus und naher Verwandter von HERV-K (Abbildung 7), ist das erste beschriebene Retrovirus, welches die Hyaluronidase 2 (Hyal2) als ein GPI-verankertes Rezeptormolekül verwendet [Rai *et al.*, 2001; Dirks *et al.*, 2002]. Hyaluronidasen sind Enzyme, die Hyaluronsäure abbauen. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -migration [Lepperdinger *et al.*, 1998]. Ein anderes β -Retrovirus, das *Mouse Mammary Tumor Virus* verwendet den Transferrin Rezeptor 1 (TfR1) als spezifisches Oberflächenprotein für Infektionen [Golovkina *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2002]. Er ist ein wichtiger Bestandteil im Eisenstoffwechsel und so gut wie in allen Säugetierzellen vorhanden [Shih *et al.*, 1990].

Der spezifische Rezeptor für HERV-K113 ist bis heute noch völlig unbekannt. Jedoch würde die Identifizierung des Rezeptormoleküls, mit dem es HERV-K113 vor ca. 600.000 Jahren geschafft hat sich ins humane Genom zu integrieren, neue Erkenntnisse in die kritischen Eigenschaften der Interaktion zwischen viralen Hüllprotein und Wirtsrezeptor geben. Außerdem würde unser Verständnis für Anforderungen des Zelleintritts und der Evolution der Retroviren zur Verwendung verschiedener Rezeptoren erweitert werden.

Tabelle 1: Retrovirale Rezeptoren und ihre Funktion.

Retrovirus	Rezeptor	Type	Funktion	Referenzen
HIV-1 und -2, SIV	CD4 und CXCR4, CCR5, andere	TM1, TM7	Immunerkennung, G-Protein gebundene Chemokin Rezeptoren	Dalgleish <i>et al.</i> , 1984; Klatzmann <i>et al.</i> , 1984; Broder und Collman, 1997; Simmons <i>et al.</i> , 2000
HTLV-1 und -2	GLUT-1, HSPGs und NRP-1		Glukose Transporter, Heparansulfat-Proteoglykane, Neurophilin-1	Manel <i>et al.</i> , 2003; Jin <i>et al.</i> , 2006; Jones <i>et al.</i> , 2005 und 2006; Ghez <i>et al.</i> , 2006
ecotrope-MuLVs	CAT-1 (SLC7A1)	TM14	basischer Aminosäure Transporter	Albritton <i>et al.</i> , 1989; Wang <i>et al.</i> , 1991
GALV, 10A1 MuLV, MuLV, FeLV-B	Pit1 (SLC20A1)	TM10-13	Phosphat Transporter	Kavanaugh <i>et al.</i> , 1994; Olah <i>et al.</i> , 1994
amphotrope MuLV, 10A1 MuLV, FeLV-B	Pit2 (SLC20A2)	TM10-13	Phosphat Transporter	Takeuchi <i>et al.</i> , 1992; Miller und Miller, 1994
xenotrope und polytrope MuLVs	XPR1	TM8	nicht bekannt (G-verbundener Rezeptor?)	Taylor <i>et al.</i> , 1999; Yang <i>et al.</i> , 1999
M813 MuLV	SMIT1	TM14	Natrium <i>Myo</i> -Inositol Transporter 1	Hein <i>et al.</i> , 2003
McERV	PLLP (TM4SF11)	TM4	Plasmolipin, Hauptkomponente von Myelin	Miller <i>et al.</i> , 2008
MMTV	TfR1	TM1	Transferrin-Rezeptor für Eisenstoffwechsel	Golovkina <i>et al.</i> , 1998; Ross <i>et al.</i> , 2002
ASLV-A	Tva	TM1	LDL (low density lipoprotein) Rezeptor-ähnliches Protein	Weiss, 1982
ASLV-B, ASLV-D, ASLV-E	Tvb	TM1	Fas/NFR-ähnlicher Rezeptor	Weiss, 1992
ASLV-C	Tvc	TM1	LDL (low density lipoprotein)	Weiss, 1992
ALV-J	chNHE1	TM12	Na ⁺ /H ⁺ -Austauschprotein Typ1	Chai und Bates, 2006; Orłowski und Grinstein, 2004
RD-114, SRV1-5, BaEV,	ASCT2 (SLC1A5) oder	TM9-10	neutraler Aminosäure Transporter	Rasko <i>et al.</i> , 1999; Taylor <i>et al.</i> , 1999
HERV-W, REV, SNV, M-PMV	ASCT1 (SLC1A4)	TM9-10	Glutamat bzw. neutraler Aminosäure Transporter	Marin <i>et al.</i> , 2000; Lavillette <i>et al.</i> , 2002
FeLV-C	FLVCR	TM12	organischer Anionen Transporter	Taylor <i>et al.</i> , 1999; Quigley <i>et al.</i> , 2000
FeLV-T	Pit1 (SLC20A1) und FeLIX	löslich TM10-13	Env-ähnliches Protein Phosphat Transporter	Anderson <i>et al.</i> , 2000
JSRV, ENTV	Hyal2	GPI-Anker	Hyaluronidase	Rai <i>et al.</i> , 2001; Dirks <i>et al.</i> , 2002
PERV-A	HuPAR1 und 2	TM11	nicht bekannt (G-verbundener Rezeptor?)	Ericsson <i>et al.</i> , 2003
BLV	BLVR	TM1	nicht bekannt (ähnlich mit AP-3 delta)	Ban <i>et al.</i> , 1993 und 1994

HIV-1, *Human Immunodeficiency Virus Typ-1*; HTLV-1 und -2, *Human T-Cell Leukemia Virus Type 1, -2*; MuLV, *Murine Leukemia Virus*; GALV, *Gibbon Ape Leukemia Virus*; FeLV-B, *Feline Leukemia Virus Typ B*; McERV, *Mus caroli Endogenous Retrovirus*; MMTV, *Mouse Mammary Tumor Virus*; ASLV, *Avian Sarcoma and Leukosis Virus Typ A, -B, -D, -E*; ALV-J, *Avian Leukosis Virus Typ J*; RD-114, *Feline Endogenous Virus*; SRV, *Simian Retrovirus Typ-D 1 bis 5*; BaEV, *Baboon Endogenous Virus*; HERV-W, *Human Endogenous Retrovirus W*; REV, *Avian Reticuloendotheliosis Virus*; SNV, *Avian Spleen Necrosis Virus*; M-PMV, *Mason Pfizer Monkey Virus*; JSRV, *Jaagsiekte Sheep Retrovirus*; ENTV, *Enzootic Nasal Tumor Virus*; PERV-A, *Porcine Endogenous Retrovirus A*; BLV, *Bovine Leukemia Virus*.

1.4 Antivirale Wirtsabwehr

Obwohl einige Zellen den spezifischen Rezeptor für eine retrovirale Infektion exprimieren können darauffolgende Restriktionen der Wirtszelle eine produktive Vermehrung der Retroviren blockieren. Zu diesen Restriktionsfaktoren zählen Mitglieder der APOBEC3-Familie (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic Polypeptide 3), die Deaminaseaktivität besitzen [Ross, 2009]. Speziell für APOBEC3G und APOBEC3F wurden antiretrovirale Aktivitäten gezeigt, indem sie Nukleinsäuren dC zu dU deaminieren, was anschließend zu einer G- zu A-Hypermuation führt, die das Genom schädigt und eine fehlerhafte Informationsweitergabe bewirkt [Esnault *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2006; Lee und Bieniasz, 2007; Lovsin und Peterlin, 2009]. Retrovirale Faktoren wie das HIV-1 *vif* wirken der APOBEC3-Funktion wiederum entgegen [Goila-Gaur *et al.*, 2008]. Ein anderes Beispiel für einen retroviralen Restriktionsfaktor ist das Trim5 α (tripartite motif protein 5 alpha), welches die HIV-1-Aktivität während der reversen Transkription und des nukleären Imports inhibiert [Li und Sodroski, 2008; Nakayama und Shioda, 2010]. Das als antiviraler Faktor identifizierte transmembrane Glykoprotein Tetherin oder BST-2 (bone marrow stromal cell antigen 2) besitzt neben einer N-terminalen Membrandomäne noch einen C-terminalen GPI-Anker [Ishikawa *et al.*, 1995]. Dadurch ist Tetherin in der Lage Virionen an der Membran der Virus-produzierenden Zelle zu bindet und verhindert so die Partikelfreisetzung [Neil *et al.*, 2007 und 2008]. Das akzessorische Protein Vpu von HIV-1 bindet an Tetherin, führt es der Internalisierung und dem Abbau in den Endosomen zu und fungiert somit als Gegenspieler der retroviralen Wirtsabwehr [Neil *et al.*, 2007 und 2008].

1.5 Zielsetzung

Das humane Genom besteht zu etwa 8 % aus endogenen Retroviren, von denen einige Integrate sehr hoch konserviert sind, so dass funktionelle Proteine und virale Partikel generiert werden. Die wohl am besten erhaltenen Proviren gehören zur Familie HERV-K(HML-2). Für die Virusinfektion ist die Expression funktioneller HERV-K(HML-2)-Hüllproteine von entscheidender Bedeutung. Diese vermitteln nicht nur den ersten Zellkontakt, initiieren die Verschmelzung von Virus- und Wirtsmembran, sondern bestimmen auch die Wirtsspezifität für die Infektion eines bestimmten Gewebes, Zelltyps oder Organismus. Endogen exprimierte HERV-K(HML-2)-Hüllproteine sind zudem in der Lage in fremde Retroviren eingebaut zu werden und somit deren Zelltropismus zu verändern.

Postinsertionale Mutationen und eine geringe Expression verhinderten bisher generelle Aussagen zu funktionellen Eigenschaften der Proteine. Durch eine Identifizierung und Revertierung dieser postinsertionalen Mutationen im HERV-K113 Element konnte das ursprüngliche HERV-K113 Hüllprotein mit der Sequenz wiederhergestellt werden, die es zum Zeitpunkt der Virusintegration in den menschlichen Vorfahren besaß.

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung des rekonstituierten HERV-K113 Hüllproteins. Zunächst soll die N-Glykosylierung hinsichtlich des Einbaus in virale Partikel und deren Infektiosität untersucht werden. Hierbei sollen vergleichende Studien mit dem heutigen, nicht rekonstituierten Hüllprotein erfolgen. Da das Carboxy-terminale Ende retroviraler Hüllproteine beim Partikeleinbau eine kritische Rolle spielt, sollen Effekte C-terminaler Trunkierungen des rekonstituierten HERV-K113 Hüllproteins analysiert werden. Im Zuge dieser Arbeit soll zudem, der noch vollständig unbekannt virale Tropismus von HERV-K113 aufgeklärt werden. Dazu soll eine große Anzahl verschiedener Zelllinien aus unterschiedlichen Spezies und Geweben auf Permissivität für HERV-K113 Infektionen getestet werden. Hierzu sollen verlässliche Reportervirussysteme auf Basis lentiviraler- und HERV-K113-Vektoren etabliert werden.

Die daraus resultierenden generellen Erkenntnisse zur HERV-K(HML-2)-Wirtsspezifität sollen für erste Experimente zur Rezeptoridentifizierung verwendet werden. Hierfür sollen bereits bekannte Rezeptormoleküle von nahe verwandten β -Retroviren wie dem *Mouse Mammary Tumor Virus* oder *Jaagsiekte Sheep Retrovirus* auf die Vermittlung des Eintritts von HERV-K(HML-2) in Wirtszellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
AlphaImager 2200 MultiImage Light Cabinet	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
CO ₂ -Inkubator C 200 für eukaryotische Zellen	Labotect, Göttingen, Deutschland
Coulter-Counter Z2	Coulter Electronics Inc., Miami, USA
Kryo-Einfriergerät	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Digital Grafic Printer UP-D895	Sony Corporation, USA
DNA Engine Thermocycler	BioRad, Hercules, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Gelelektrophoresekammern:	
1. Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	BioRad, Hercules, USA
2. Mini-Protean 3 Electrophoresis	BioRad, Hercules, USA
Gene Pulser XCell + Shock Pod	BioRad, Hercules, USA
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Hybridisierungsöfen Minidizer HB-500	UVP, Upland, USA
Inkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühl-Heiz-Thermomixer KTMR-133	HLC, Bovenden, Deutschland
Liquid Scintillation Counter, Wallac 1409	Perkin Elmer, Waltham, USA
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Oak Ridge, USA
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskope:	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
1. Inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
2. Axiovert 100 M	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
3. Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 META (cLSM)	
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
pH-Meter	Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Photometer UV-1202	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Power Pac HC	BioRad, Hercules, USA
Rocking Platform Shakers	VWR, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, USA

Gerät	Hersteller
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
UV-Transilluminator	BioView, Billerica, USA
Zentrifugen:	
1. Multifuge 1S-R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
2. Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
3. Heraeus Sepatech Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Ultrazentrifugen:	
1. L8-70M	Beckman Coulter, Fullerton, USA
2. XL-90	Beckman Coulter, Fullerton, USA
3. Optima L100K	Beckman Coulter, Fullerton, USA
SW 28 Rotor	Beckman Coulter, Fullerton, USA
SW 32Ti Rotor	Beckman Coulter, Fullerton, USA
4. Centrikon T-1055	Kontron AG, München, Deutschland
TST 28.38 Rotor	Kontron AG, München, Deutschland
Ultrazentrifugen-Tubes:	
1. Thinwall Ultra-Clear™ Tubes	Beckman Coulter, Fullerton, USA
2. Thinwall Polyallomer konical Tubes	Beckman Coulter, Fullerton, USA

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte mit ihrer entsprechenden Bezugsquelle.

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Chemikalien/ Enzyme	Hersteller
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BigDye 3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
dNTP's	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Generuler 1 kb Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Generuler 100 bp Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Glutaraldehyd (GA), 25 %	TAAB Laboratories Equipment Ltd, Berkshire, UK
Glycerin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Isoporpanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

Chemikalien/ Enzyme	Hersteller
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
PNGaseF (N-Glycosidase F)	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Polybrene®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Complete Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ultima Gold XR- liquid scintillation cocktail	Perkin Elmer, Waltham, USA
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Enzyme mit der jeweiligen Bezugsquelle

2.1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Bezugsquelle
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Geneticindisulfat (G418 Sulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin 100x	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Zeocin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antibiotika und der entsprechenden Bezugsquelle

2.1.4 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Puffer und Medien	Zusammensetzung
2x YT-Medium	1 % Bacto-Trypton; 1 % Bacto Hefe Extrakt; 0,5 NaCl
DNA Ladepuffer, 6x	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0,4 % Orange-G (w/v) (Sigma) in H ₂ O
LB-Medium	1 % Bacto Hefe Extrakt; 1 % NaCl, pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar
Low Salt-LB-Medium	10 g Trypton, 5 g NaCl, 5 g Hefe Extract, Lösung ad. 1 l, pH 7,5 mit 5 M NaOH
Low Salt-LB-Agar	Low Salt-LB-Medium mit 15 g/l
Ligationspuffer, 1x	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, 25 µg/ml BSA
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Bacto Hefe Extract, 0,186 g KCl bzw. 2,5 ml 1 M KCl-Lösung, 0,584 g NaCl bzw. 10 ml 1 M NaCl-Lösung ad. 970 ml H ₂ O, pH 7,0
SOC-Medium	9,7 Teile SOB, 0,1 Teil Mg-Mix, 0,2 Teile Glukose
TAE, 1x	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
TE, 1x	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien.

LB- und 2x YT-Medien wurden mit dem Antibiotikum Kanamycin oder Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Bakterien im Low-Salt LB Medium wurden mit einer finalen Konzentration von 50 µg/ml selektioniert.

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
Dual-Glo [®] Luciferase Assay System	Promega Corporation, Madison, USA
ECL Plus Western Blot Detection System	GE Healthcare, Fairfield, USA
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
HS-Mg RT Activity Kit	Cavidi, Uppsala, Schweden
Luciferase 1000 Assay System	Promega Corporation, Madison, USA
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Quan-T-RT Assay	Perkin Elmer, Waltham, USA

Kit	Hersteller
QuikChange [®] Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Rodeo Sensitive Western Blot Detection	USB, Cleveland, USA
<i>S.cerevisiae</i> Easycomb Transformation Kit	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Logan, USA
Super Signal West Femto Max. Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Logan, USA

Tabelle 6: Bezeichnung und Herstellerangaben der verwendeten Kits

2.1.6 Bakterienstamm

Es wurde mit elektrokompenten *Escherischia coli* (*E.coli*) One Shot Top 10 von der Firma Invitrogen und chemisch-kompenten *E.coli* XL10-Gold[®] Ultracompetent Cells von Stratagene Europe gearbeitet. Letztere wurden generiert, um mit hoher Effizienz besonders große ligierte DNA-Fragmente aufzunehmen.

2.1.7 Konstrukte/ Vektoren

Konstruktnamen	Vektor	Bezugsquelle/ Publikation
wtEnv_V5	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
coEnv_V5	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoEnv_V5	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoEnv_Stopp	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoEnvCS ⁻	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoEnvGly ⁻	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoEnvΔ ₆₅₉₋₆₉₉	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoEnvΔ ₆₈₀₋₆₉₉	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoEnvΔ ₆₉₃₋₆₉₉	pcDNA3	Hanke <i>et al.</i> , 2009
oricoRec	pcDNA3	Dissertation Kirsten Hanke, 2010
CMVoriLuzi	pTH	Philipp Kramer, n.p.
CMVoriEGFP	pTH	Philipp Kramer, n.p.
CMVoriNeo	pTH	Philipp Kramer, n.p.
CMVoriZeo	pTH	Philipp Kramer, n.p.
CMVoricoGPP	pcDNA3	George <i>et al.</i> , 2011
hsTfR1	pcDNA3	Sandra Seeher, n.p.
fcTfR1	pcDNA3	Sandra Seeher, n.p.
mmTfR1	pcDNA3	Ross <i>et al.</i> , 2002
cfHyal2	pcDNA3	Sandra Seeher, n.p.
hsHyal2	pETE	Eugene Zabarovsky (Wang <i>et al.</i> , 2008)

Konstruktname	Vektor	Bezugsquelle/ Publikation
MMTVcoEnv_V5 (C3H)	pcDNA3.1(+)	Philipp Kramer, n.p.
MMTVcoEnvF138A_V5	pcDNA3.1(+)	Philipp Kramer, n.p.
JSRVcoEnv_V5	pcDNA3.1(+)	Philipp Kramer, n.p.
XMRVcoEnv_V5	pTH	Oliver Hohn (Hong <i>et al.</i> , 2009)
pSIvec1envLuc	v653rtatpC	Bannert <i>et al.</i> , 2000; Hofmann <i>et al.</i> , 1999
pSIvec1envGFP	v653rtatpC	Bannert <i>et al.</i> , 2000; Hofmann <i>et al.</i> , 1999
pCMV-Rev (HIV-1 Rev)	-	Bannert <i>et al.</i> , 2000
pSVIII-KS (HIV-1 Env ΔKS)	-	Bannert <i>et al.</i> , 2000; Helseth <i>et al.</i> , 1990
VSV-G	-	Bannert <i>et al.</i> , 2000; Hofmann <i>et al.</i> , 1999
oricoEnvSU-IgG	pcDNA3.1	Philipp Kramer, n.p.
oricoEnvTM-IgG	pcDNA3.1	Philipp Kramer, n.p.
SCF-IgG	-	Bannert <i>et al.</i> , 2001
-	pUC19	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

Tabelle 7: verwendete Konstrukte und ihre Vektoren mit Angaben der Bezugsquelle; n.p. nicht publiziert

2.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Die Anwendung der Oligonukleotide bezog sich auf Sequenzierungen, Amplifikations- und Mutagenese-PCR-Reaktionen. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt. Nach der Lieferung wurden die gefriergetrockneten Primer auf eine Konzentration von 100 µM gebracht und bei 4 °C in einem Kühlblock für 15 min geschüttelt. Anschließend wurden die Primer auf die einsatzfähige Endkonzentration von 10 µM verdünnt und bei -20 °C gelagert. Eine detaillierte Auflistung mit der jeweiligen Primersequenz und Verwendung ist im Anhang 8.1 zu finden.

2.1.9 Antikörper

Mittels spezifischer Antikörper erfolgte der Proteinnachweis. Hierzu wurde ein am Antikörper gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, der im Fluoreszenzmikroskop sichtbar oder per FACS gemessen wurde. Alternativ wurde die Antikörperdetektion mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt. Bei ungekoppelten primären Antikörpern erfolgte die Proteindetektion durch Inkubation mittels eines gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Informationen der verwendeten Antikörper (AK) sind nachfolgend (Tabelle 8) aufgelistet:

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
HERV-K _Env (A-h HERV K envp79kDa IgG2a 100)	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA
α Gag-HERV-K	Ratte	Hohn <i>et al.</i>
α Human TfR1 (CD71)	Maus	eBioscience, Inc., San Diego, USA
α Mouse TfR1 (CD71)	Ratte	eBioscience, Inc., San Diego, USA
α Hyal2	Kaninchen	Abcam plc, Cambridge, UK
AG3.0 (α SIV-Gag)	Maus	Norley <i>et al.</i>
Polyklonales Poolplasma	Mensch	Norley <i>et al.</i>
α V5	Maus	AbD Serotec, Raleigh, USA
α V5-HRP	Maus	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
α V5-HRP	Ziege	Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA
α V5-Sepharose	Maus	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
α V5-Sepharose	Ziege	Novus Biologicals, Inc., Littleton, USA
α V5-Cy3	Maus	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
AlexaFluor [®] 488 α Human-IgG	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor [®] 488 α Rat-IgG	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor [®] 568 α Mouse-IgG	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor [®] 568 α Rabbit-IgG	Ziege	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
α Mouse-IgG-Cy3	Ziege	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
α Mouse-IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
α Rat-IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
α Rabbit-IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland
α Human-IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Antikörper mit ihren Bezugsquellen

2.1.10 Software

Software	Hersteller
Adobe [®] Photoshop [®] 7.0	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Adobe [®] Illustrator [®]	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Berthold Luminometer Analysis Software	Berthold Technologies, Oak Ridge, USA
BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0	Tom Hall (1999)
Clone Manager 9 Professional Edition	Sci-Ed Software, Cary, USA
Nanodrop ND-1000 v3.3	Nanodrop, Wilmington, USA
CellQuest Research Software	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Analytik

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (engl. polymerase chain reaction) dient der *in vitro* Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnitts. Das verwendete Standard-PCR Programm besteht aus sich wiederholenden Zyklen der drei Phasen: Denaturierung, Annealing und Elongation.

2.2.1.1.1 Expand High Fidelity PCR

Das Expand High Fidelity PCR System (Tabelle 6) setzt sich aus einem Gemisch der Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase und dem Tgo (*Thermococcus gorgonarius*) Polymeraseenzym zusammen. Tgo Polymerase besitzt eine „proofreading“ Funktion und erhöht damit die Genauigkeit der Amplifikation. Um eine Degradierung des Templates und der Primer zu vermeiden, wurde die Expand High Fidelity PCR-Reaktion in zwei unterschiedlichen Reaktionsgefäßen angesetzt (Tabelle 10). Die beiden Ansätze wurden anschließend vermischt und die Reaktion gestartet. Die Elongationstemperatur beträgt für Template DNA < 3 kb 72 °C. Die restlichen Werte sind aus der Tabelle 11 zu entnehmen.

Reaktionsansatz 1		Reaktionsansatz 2	
Reagenzien	Konzentration	Reagenzien	Konzentration
dNTP-Mix	800 µM	Expand High Fidelity	1x
Primer_F	300 nM	Puffer 10x	
Primer_R	300 nM	Expand High Fidelity	2,5 Units
Template-DNA	200 ng	Enzym Mix	

Tabelle 10: Expand High Fidelity PCR-Reaktionsansätze

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	15 sec	} 10
Annealing	53 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	15 sec	} 20
Annealing	53 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	2 min+5 sec/Zyklus	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1

Tabelle 11: Expand High Fidelity PCR-Bedingungen

2.2.1.1.2 Mutagenese PCR

Mittels einer *in vitro* Mutagenese PCR erfolgte die Erzeugung gezielter Mutationen innerhalb der Konstrukte. Hierfür wurde das QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Tabelle 6) verwendet. Die bei Invitrogen bestellten spezifischen Primer (siehe 8.1) weisen folgende Charakteristika auf: Die ein bis zwei Basen lange Mutationsstelle befand sich in der Mitte des ca. 31- 46 bp langen Primers. Bis zu fünf Primer konnten gleichzeitig eingesetzt werden, die bei erfolgreichen Mutagenesen zur Generierung von fünf potentiellen DNA-Veränderungen führen. Die Schmelztemperatur (T_m) des Mutagenese-Primers sollte nach Stratagene-Herstellerangaben ≥ 75 °C betragen und wurde mit der folgenden Formel bestimmt:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% GC) - 675 / N - \% mismatch$$

Der prozentuale Guanin und Cytosin-Anteil ist mit %GC anzugeben und für die Primergesamtlänge steht N . Für eine optimale Bindung soll der GC-Gehalt des Primers bei mindestens 40 % liegen. Aufgrund der fehlerfreieren Arbeitsweise wurde für die Mutagenese PCR bei der Amplifizierung des gesamten Vektors die Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Aus der Tabelle 13 sind die entsprechenden *in vitro* Mutagenese PCR-Bedingungen und aus der Tabelle 12 der Reaktionsansatz zu entnehmen.

Komponente	Konzentration	Typischer Reaktionsansatz
10x QuickChange® Multi Reaction Buffer, 10x	1x	2,5 µl
Quick Solution, 25x	1x	0,5 µl
Template-DNA	100 ng	2 µl
Mutagenese Primer	1-3 Primer (100 ng), 4-5 Primer (50 ng)	0,5-1,5 µl (je nach Primerlänge)
dNTP Mix, 25x	1x	1 µl
QuickChange® Multi Enzyme Blend	2,5 Units	1 µl
A. bidest		ad. 25 µl
Endkonzentration	4 %	

Tabelle 12: *in vitro* Mutagenese PCR-Ansatz

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 30
Annealing	55 °C	1 min	
Elongation	65 °C	16 min (2 min/ kb Plasmidlänge)	

Tabelle 13: *in vitro* Mutagenese PCR-Bedingungen

Die alte, methylierte Template-DNA aus *E.coli* wurde nach der PCR mit 1 µl DpnI (10 Units) für zwei Stunden verdaut. 1 µl der neu-amplifizierten DNA mit der potentiellen Mutation wurde in elektrokompetente *E.coli* Top 10 transformiert und diese auf Selektionsplatten ausplattiert. Im Restriktionsverdau, der Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung wurde später die Qualität der Mutagenesereaktion überprüft.

2.2.1.2 Restriktion mit Endonukleasen

Zur Überprüfung von Klonierungen, Vektoren oder Genen wurde eine Restriktion mit spezifischen bakteriellen Typ-2-Endonukleasen durchgeführt. Palindromartige Sequenzen werden durch die Restriktionsendonukleasen erkannt, spezifisch geschnitten und somit ein Überhang an den 5'-Enden erzeugt. Für die maximale Wirksamkeit wurden die Restriktionsenzyme nach NEB-Herstellerangaben unter Verwendung geeigneter Puffer eingesetzt. Ein Restriktionsverdau belief sich auf ca. 1 bis 2 Stunden bei 37 °C. Die Qualität des Verdaus wurde anschließend in einer Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe 2.2.1.4).

2.2.1.3 Ligation

Bei der Ligation wurden mittels der T4-DNA-Ligase (100 Units) die freien 3'-Hydroxy- und die 5'-Phosphat-Enden des Inserts und Vektors verbunden. Bei der Ligation wurden 20 ng Vektor-DNA eingesetzt und die Insert-Menge nach folgender Formel berechnet:

$$Insert_{DNA} = 3 \text{ bis } 5 \times 20 \text{ ng Vektor}_{DNA} \times \text{Basenpaaranzahl}_{Vektor} / \text{Basenpaaranzahl}_{Insert}$$

Die DNA-Konzentrationen wurden mittels Nanodrop (Tabelle 2) gemessen oder anhand der Agarosegelelektrophoresebilder abgeschätzt. Der Ligationsansatz (Tabelle 14) wurde für 1 h bei Raumtemperatur oder im Kühlblock bei 16 °C über Nacht inkubiert. Die DNA wurde anschließend in elektrokompente *E.coli* One Shot Top 10 oder chemisch kompetente *E.coli* XL10-Gold® Zellen transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Komponente	Eingesetztes Volumen/ Konzentration
Vektor-DNA	20 ng
Insert-DNA	siehe Formel
Ligationspuffer, 1x	1 µl
T4-DNA-Ligase	0,5 µl (100 Units)
A. bidest.	ad. 10 µl

Tabelle 14: Ligationsansatz

2.2.1.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Diese analytische Methode diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe und Ladung und wurde für Qualitäts- und Größenkontrollen der DNA eingesetzt. Dazu wurde Agarose mit 1x TAE-Puffer auf eine Endkonzentration von 0,8- 1,5 % verdünnt, in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erhitzt und mit 0,5 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt [Sambrook *et al.*, 1989]. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (Tabelle 5) versetzt und abhängig vom DNA-Volumen der DNA-Ladepuffer auf eine einfache Endkonzentration eingestellt. Bei einer angelegten Spannung zwischen 70- 110 V wurden die DNA-Fragmente im 0,8- 1,5 % Agarosegel mit 1x TAE-Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenstandards dienten der Generuler 100 bp Ladder oder Generuler 1 kb Ladder Plus

(Fermentas). Mit Hilfe des mit Nukleinsäuren interkalierenden Ethidiumbromids, wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und im AlphaImager 2200 fotografiert.

2.2.1.5 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäure-Isolierung aus PCR-Ansätzen

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus PCR-Reaktionen wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Tabelle 6) verwendet. Die Durchführung entspricht den Herstellerangaben und basiert auf einer DNA-bindenden Säule. Die Elution erfolgte in 50 µl A. bidest.

Nukleinsäure-Isolierung aus Agarosegelen

Das QIAquick Gel Extraction Kit (Tabelle 6) wurde für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen eingesetzt. Mit einem Skalpell wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel unter dem UV-Transilluminator ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die folgende Aufreinigung entspricht den Herstellerangaben und die Elution erfolgte in 30- 50 µl A. bidest.

2.2.1.6 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* One Shot Top 10

Aus den bei -80 °C gelagerten *E.coli* Top 10-Zellen wurden Bakterien für Kolonien auf einer 2x YT-Platte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden 10 ml 2x YT-Medium mit einer Einzelkolonie der Platte beimpft und über Nacht im Inkubator bei 37 °C geschüttelt. Die 10 ml wurden 24 h später gleichmäßig auf vier Kolben mit Schikane und vorgelegten 250 ml 2x YT-Medium verteilt. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C im Inkubator geschüttelt. Mit Hilfe des Photometers UV-1202 wurde die OD des beimpften Mediums bei 600 nm mit einer Einwegküvette ermittelt. Nach optimaler Bakteriendichte wurden die vier Kolben vereinigt, für 15- 30 min auf Eis gestellt und anschließend in vier Zentrifugenbecher überführt, die im Voraus mit 0,1 N HCl desinfiziert und mit A. bidest ausgespült wurden. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und

4 °C wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 250 ml eiskaltem 1 mM HEPES resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut bei 4000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Pellet in 125 ml eiskaltem 1 mM HEPES resuspendiert. Vier Zentrifugenbecher wurden auf zwei vereint und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nun wurden die Bakterienpellets in je 25 ml 1 mM HEPES/ 10 % Glycerin aufgenommen, in ein 50 ml Falcon überführt und bei 5000 rpm, 4 °C und 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nochmals für 5 min zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer Pipette abgenommen. Das finale Bakterienpellet wurde in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, à 55 µl aliquotiert und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die gefrorenen kompetenten *E.coli*-Zellen wurden danach bei -80 °C gelagert. Die Effizienz der elektrokompenten *E.coli* One Shot Top 10 wurde durch Transformation des pUC19-Kontrollvektors überprüft und betrug ca. 10^9 Kolonien pro µg Vektor-DNA.

2.2.1.7 Transformation

Um DNA zu vervielfältigen, wurde diese in elektrokompente *E.coli* One Shot Top 10 transformiert. Dafür wurde 1 µl der DNA (5- 50 ng) zu 55 µl elektrokompenten *E.coli*-Zellen pipettiert und das DNA/Bakterien-Gemisch in eine vorgekühlte Küvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Elektroporation der kompetenten *E.coli* One Shot Top 10 Zellen erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF, 200 Ohm und befähigt die Bakterien zur Aufnahme der DNA. Im Anschluss wurden die *E.colis* in 200 µl SOC-Medium (Tabelle 5) aufgenommen, bei 37 °C für 1 Stunde geschüttelt und auf Selektionsplatten mit Ampicillin-, Kanamycin- oder Zeocin-Antibiotikazusatz ausplattiert.

Alternativ dazu wurden große DNA-Fragmente in chemisch kompetente *E.coli* XL10-Gold[®] Zellen (Stratagene) transformiert. Die Durchführung entsprach den Stratagene Herstellerangaben. Nach zehnminütigen Hitzeschock bei 42 °C wurde das DNA/Bakterien-Gemisch nochmals für 2 min in ein Eisbad gestellt und anschließend 200 µl SOC-Medium (Tabelle 5) hinzugegeben. Die weitere Durchführung entsprach der Transformation in elektrokompente *E.colis*.

2.2.1.8 Plasmidisolierung

Die Anzucht der *E.coli*-Bakterien erfolgte in 5 ml 2x YT-, LB- oder Low Salt-LB-Medium, welches vorher mit Ampicillin, Kanamycin (je 100 µg/ml) oder Zeocin (50 µg/ml) versetzt wurde. Die Plasmidisolierung wurde mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Tabelle 6) durchgeführt, basiert auf einer Säulenaufreinigung und erfolgte nach Qiagen-Herstellerangaben. Die DNA wurde in 50 µl A. bidest. von der Säule eluiert und die Ausbeute lag zwischen 100- 500 ng DNA pro Mikroliter.

Für höhere Ausbeuten wurde das Endo-free Plasmid Maxi Kit (Tabelle 6) eingesetzt. Eine ü. T. Kultur von 5 ml 2xYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz wurde mit einer *E.coli*-Einzelkolonie beimpft und bei 37 °C für ca. acht Stunden im Inkubator geschüttelt. Anschließend wurde die ü. T. Kultur in einen 2 l Kolben mit Schikane und 250 ml vorgelegtem LB oder Low Salt-LB-Medium mit Antibiotikazusatz überführt, der über Nacht im Inkubator bei 37 °C geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurde die Präparation nach Qiagen-Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 250 µl endotoxinfreiem A. bidest. eluiert und betrug zwischen 1,5- 3,5 µg DNA pro Mikroliter. Die isolierte DNA wurde im Kontrollverdau (siehe 2.2.1.2) oder der Sequenzierung (siehe 2.2.1.10) kontrolliert und für spätere Arbeiten bei -20 °C gelagert.

2.2.1.9 DNA-Messung

Die Messung der Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (Tabelle 2). Zuvor wurde die Leerwerteinstellung des Gerätes mit A. bidest. bestimmt und anschließend 1 µl der isolierten Plasmid-DNA auf das Messfeld pipettiert. Die photometrische Konzentrationsmessung wurde automatisch bei den eingestellten Wellenlängen von 260 und 280 nm durchgeführt und der Wert ermittelt.

2.2.1.10 Sequenzierungs PCR

Die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte mittels der Didesoxymethode oder auch Kettenabbruchmethode [Sanger *et al.*, 1977]. Die Sequenzierungs PCR wurde zur Überprüfung von Mutageneseversuchen und Klonierungsexperimenten eingesetzt. Die Sequenzierungsprimer (siehe 8.1.1) sind zwischen 18- 25 Nukleotide lang, weisen einen GC-Gehalt von über 40 % auf und wurden bei Invitrogen synthetisiert. Der Reaktionsansatz ist der Tabelle 15 zu entnehmen und enthält ein BigDye Premix (ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems), der aus einer *AmpliTaq* DNA-Polymerase, dNTP's und einen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten 2', 3'-Didesoxynucleotidtriphosphat-Mix (ddNTP's) zusammengesetzt ist. Die *in vitro* Sequenzierungs-PCR-Bedingungen sind der Tabelle 16 aufgelistet.

Die Sequenzanalyse wurde im hauseigenen Sequenzierungslabor durchgeführt und mit BioEdit Sequence Alignment Editor [Hall, 1999] ausgewertet.

Komponente	Eingesetztes Volumen/ Konzentration
ABI-Puffer	1 µl
Big-Dye®	2 µl
Template-DNA	1 µl (150- 300 ng)
Sequenzierungs-Primer	0,5 µl (10 µM)
A. bidest	ad. 10 µl

Tabelle 15: Sequenzierungs-PCR-Ansatz

	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	96 °C	2 min	1
Denaturierung	96 °C	10 sec	} 25
Annealing	53 °C	10 sec	
Elongation	60 °C	4 min	

Tabelle 16: Sequenzierungs-PCR-Bedingungen

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Puffer und Medien

Puffer und Medien	Zusammensetzung/ Bezugsquelle
Cell Dissociation Buffer, enzyme free, PBS-based	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
CIP Waschpuffer	1 % Triton-X 100, 20 mM Tris (pH 7,7), 150 mM NaCl, 0,1 % SDS
DAPI (4',6-Diamidin-2'-henylindoldihydrochlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
Dodecyl- β -D-maltosid (DDM), 0,3 % in PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EBSS (Earle's Balanced Salt Solution)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
Elutionspuffer	0,1 M Glycerin (pH 2,7)
FKS (Fetales Kälberserum)	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
Ham F-12 Medium	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
HBS (HEPES buffer saline), 2x	5,6 ml 5 M NaCl, 10 ml 0,5 M HEPES (pH 7,1), 1 ml 0,15 M Na ₂ HPO ₄ , ad. 100 ml A. bidest.
HEPES-Puffer	1 M HEPES (pH 7,2), 0,1 % NaN ₃
Isoton [®] II Diluent (20 l)	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
L-Glutamin (L-Gln), 200 mM	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
Lysispuffer	1 % Triton-X 100, 20 mM Tris (pH 7,7), 150 mM NaCl
Marvel, 1 %	0,5 g Milchpulver, ad. 50 ml PBS
MEM (Minimum Essential Media)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
NEAA (Non Essential Amino Acids)	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
Neutralisationspuffer	1 M Tris (pH 9,0)
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,2, ad. 1 l A. bidest
Penicillin/ Streptomycin, 100x	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI Medium 1640	Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)
Trypanblau, 0,4 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	0,25 % Trypsin (pH 7,2) in PBS
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin (pH 7,2), 0,02 % EDTA in PBS (TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland)

Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien für zellbiologische Arbeiten

2.2.2.2 Zellbiologische Verbrauchsmaterialien

Apparatur	Hersteller
6 Well-Plates	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
24 Well-Plates	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
100 mm Platten	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
Filter für Spritzen, 0,45 µm	Whatman Schleicher & Schuell, Springfield Mill, UK
Kryo-Röhrchen, 2 ml	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
Lab-Tek II Chamber Slides Glas/Permanose	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Spritzen, Injekt 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, UZ, Ultra-Clear	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Zentrifugenröhrchen, UZ, konical Polyallomer	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen, 150 cm ²	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber	TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle 18: Auflistung der zellbiologischen Verbrauchsmaterialien

2.2.2.3 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Ursprungsgewebe	Wachstumsmedium	Bezugsquelle
22Rv1	Mensch	Prostata	RPMI, 10 % FKS,	Bannert <i>et al.</i>
A549	Mensch	Lunge	RPMI, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Heuner <i>et al.</i>
CaCo2	Mensch	Dickdarm	EBSS, 10 % FKS, 2 mM L-Gln, 1 % NEAA	Heuner <i>et al.</i>
DU 145	Mensch	Prostata	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
GH	Mensch	Niere	Ham F-12, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
HeLa	Mensch	Gebärmutterhals	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
HEK 293T	Mensch	Niere	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
Hep-2	Mensch	Kehlkopf	DMEM, 5 % FKS, 2 mM L-Gln	Nitsche <i>et al.</i>
Huh-7	Mensch	Leber	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
LNCaP	Mensch	Prostata	RPMI, 10 % FKS	Bannert <i>et al.</i>
RD	Mensch	Muskel	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Heuner <i>et al.</i>
SK-Mel28	Mensch	Haut	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln, 1 % NEAA	Bannert <i>et al.</i>
SW 1783	Mensch	Gehirn	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Beekes <i>et al.</i>
T24	Mensch	Harnblase	Ham F-12, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Heuner <i>et al.</i>
Tera-1	Mensch	Hoden	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
THP-1	Mensch	Makrophage	RPMI, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Heuner <i>et al.</i>
Cf2Th	Hund	Thymus	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
MDCK	Hund	Niere	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Norley <i>et al.</i>

Zelllinie	Organismus	Ursprungsgewebe	Wachstumsmedium	Bezugsquelle
Vero	Affe	Niere	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
Cos-7	Affe	Niere	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
CrFK	Katze	Niere	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Norley <i>et al.</i>
FEA	Katze	Fibroblast	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Fiebig <i>et al.</i>
BHK21	Hamster	Niere	EBSS, 10 % FKS, 2 mM L-Gln, 1 % NEAA	Bannert <i>et al.</i>
CHO	Hamster	Eierstock	Ham F-12, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Niedrig <i>et al.</i>
L-929	Maus	Fibroblast	RPMI, 10 % FKS	Schäfer <i>et al.</i>
NIH3T3	Maus	Fibroblast	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Bannert <i>et al.</i>
RAW	Maus	Makrophage	RPMI, 10 % FKS	Schäfer <i>et al.</i>
T145	Ratte	Fibroblast	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Fiebig <i>et al.</i>
T85	Ratte	Fibroblast	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Fiebig <i>et al.</i>
REF	Ratte	Fibroblast	DMEM, 5 % FKS, 2 mM L-Gln	Brune <i>et al.</i>
JH4	Meerschwein	Fibroblast	RPMI, 10 % FKS	Schäfer <i>et al.</i>
104C1	Meerschwein	Fibroblast	RPMI, 10 % FKS	Schäfer <i>et al.</i>
RK13	Kaninchen	Niere	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Niedrig <i>et al.</i>
PK15	Schwein	Niere	DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Gln	Denner <i>et al.</i>

Tabelle 19: Eukaryotische Zelllinien mit Angaben zur Herkunft und Kultivierung und ihre Bezugsquelle

2.2.2.4 Zellkultivierung

Die Kultivierung der verschiedenen eukaryotischen Zelllinien (Tabelle 19) wurden in separaten 75 cm² Zellkulturflaschen durchgeführt und erfolgte bei konstanten 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit in ihren entsprechenden Kultivierungsmedien, welche der Tabelle 19 zu entnehmen sind. Diese wurden vor der Benutzung mit spezifischen Zusätzen wie FKS, Penicillin/ Streptomycin, L-Glutamin oder nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) komplementiert. Bei den Zelllinien handelte es sich vorwiegend um adhärenente und einige wenige Suspensions-Zelllinien, wie die humane Makrophagen-Zelllinie THP-1. Mediumkomplementierung und Zellkulturarbeit fanden stets bei sterilen Bedingungen statt. Um eine konstant gute Vitalität der eukaryotischen Zellen zu gewährleisten wurden tote, gelöste Zellreste mit dem alten Medium abgenommen und die adhärenenten Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Für die Passage wurden die Zellen durch proteolytischen Verdau der Adhäsionsproteine mit 2 ml Trypsin bzw. Trypsin/EDTA (Tabelle 17) vom Kulturflaschenboden gelöst, mit der Pipette vereinzelt und in frischem Medium aufgenommen. 6/7 der Zellsuspension wurde verworfen, 1/7 weiter kultiviert und mit 20 ml frischem Medium aufgefüllt. Je nach Zellwachstum und Konfluenz der Zellen wurde die

Prozedur alle 3- 4 Tage wiederholt. Für experimentelle Untersuchungen wurde die Zellzahl mittels Coulter-Counter Z2 oder Neubauer Zählkammer bestimmt und entsprechend ihrer Wachstumsrate in 24 Well-Plates, 6 Well-Plates, 100 mm Platten oder Chamber Slides überführt.

2.2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Mindestens 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in ein kältestabiles Kryo-Röhrchen mit Schraubverschluss (TPP/ Biochrom, Berlin, Deutschland) überführt und möglichst schonend eingefroren. Hierfür diente eine mit Isopropanol gefüllte Kryo-Einfrierbox (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), die mit den Zellen ü. N. bei -80 °C platziert wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen in -195 °C flüssigen Stickstoff überführt.

Die Zusammensetzung des Einfriermediums entsprach:

- 90 % FKS und 10 % DMSO oder
- 70 % komplementiertes Zellkultivierungsmedium, 20 % FKS, 10 % DMSO

Für den erneuten Gebrauch wurden die Zellen möglichst schonend aufgetaut, mit 20 ml komplementierten Medium in eine Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung

Für eine optimale Transfektion oder Infektion ist es erforderlich die Zellzahl zu ermitteln und pro Fläche des Reaktionsgefäßes eine bestimmte Anzahl von Zellen auszusäen (Tabelle 20). Dazu wurden die eukaryotischen Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin bzw. Trypsin/EDTA (Tabelle 17) vom Zellkulturflaschenboden gelöst und in ein 50 ml Falcon überführt. In diesem wurden sie bei 1200 rpm für 4 min bei RT pelletiert und anschließend in 8 ml frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellzahl der Suspension wurde mittels Coulter Counter Z2 (Tabelle 2) bestimmt. 10 μl der Zellsuspension wurden in einem Messbecher mit 10 ml Isoton (1:1000 Verdünnung) gegeben, gemischt und gemessen. Nach Coulter Electronics-Herstellerangaben (Tabelle 2) wurde je nach Größe der Zellen ein bestimmtes Messprofil eingerichtet. Alternativ wurden Zelllinien auch per visueller Auszählung in der Neubauer Zählkammer (Tabelle 2) bestimmt. Zur Vitalfärbung

eukaryotischer Zellen wurden 50 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit einer 0,4 %igen Trypanblaulösung vermischt. Trypanblau färbt nur tote Zellen an, weil bei lebenden der Farbstoff aufgrund der noch intakten Zellmembran nicht eindringen kann. 10 µl der Trypanblau-Zellsuspension wurde zwischen das Deckgläschen auf die Zählkammer pipettiert, die Zellzahl jedes der vier Großquadrate mit Hilfe eines Mikroskops ausgezählt und mit folgender Formel die Konzentration der lebenden Zellen bestimmt:

$$C_{\text{Zellen/ml}} = \text{Großquadrate}_{\text{Mittelwert}} / \text{Vorverdünnung} \times 10^4$$

Die erforderlichen Zelldichten pro spezifische Fläche des Kultivierungsformates und Zelltyps sind aus der Tabelle 20 zu entnehmen. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei konstanten 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit war somit eine mögliche Transfektion oder Infektion am nächsten Tag sichergestellt. Die optimale Konfluenz der adhärennten Zellen betrug zwischen 40- 60 %.

Kultivierungsformat	Anzahl der Zellen zum Aussäen/ Well			Volumen des Mediums/ Well
	HEK 293T	CrFK	Zellen für Tropismus- untersuchungen	
Lab-Tek II Chamber Slides	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	-	800 µl
24 Well-Platten	9 x 10 ³	4,5 x 10 ³	1,5- 3 x 10 ⁴	500 µl
6 Well-Platten	6 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵	-	3 ml
100 mm Platten	4 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶	-	8 ml
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	5,5 x 10 ⁶	-	-	15 ml
Zellkulturflaschen, 150 cm ²	7,5 x 10 ⁶	-	-	25 ml

Tabelle 20: Anzahl der eukaryotische Zellen zum Aussäen in verschiedenen Kultivierungsformaten mit dem entsprechenden Volumen des Mediums.

Für Tropismusuntersuchungen wurden die verschiedenen eukaryotischen Zellen am Vortag in der Konzentration zwischen 1,5 bis 3 x 10⁴ je nach Zelllinie in 24 Well Platten ausgesät, so dass sie am Folgetag zur Infektion eine Konfluenz von ca. 60 % aufwiesen. Dies wurde in einem Vorversuch überprüft und es war gewährleistet, dass am Tag der Infektionen etwa gleich viele Zellen jeder eukaryotischen Zelllinie infiziert wurden.

2.2.2.7 Transfektion

Um Fremd-DNA in eukaryotische Zellen zu inserieren, wurde die Transfektion eingesetzt. Die eingebrachte Plasmid-DNA wird in der Folge exprimiert und es kommt zur Proteinsynthese.

2.2.2.7.1 Transfektion mittels PolyFect

Die transiente Transfektion von unterschiedlichen DNA-Konstrukten erfolgte mit dem PolyFect Transfection Reagent Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und beruht auf dem Prinzip von Dendrimeren umschlossener DNA, die eine positive Ladung aufweisen. Diese PolyFect-DNA-Komplexe fusionieren mit der eukaryotischen Zellmembran nach erfolgter Bindung an negativ geladene Rezeptoren, wie z. B. mit Sialinsäure gekoppelte Glykoproteine. Vor der eigentlichen Transfektion wurden HEK 293T- oder CrFK-Zellen ausgezählt (siehe 2.2.2.6) und in 24 Well-Plates, 6-Well-Plates oder 10 cm Platten überführt. Die Präparation wurde nach Qiagen-Herstellerangaben durchgeführt. 24- 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Proteine extrahiert (siehe 2.2.3.1) und in weiteren Versuchen untersucht.

2.2.2.7.2 Transfektion mittels Calciumphosphat

Zur Herstellung großer Mengen von pseudotypisierten Viruspartikeln für die Tropismusuntersuchung wurde die Calciumphosphat-Methode angewendet [Chen und Okayama, 1988]. Hierfür wurden große DNA-Mengen und mehrere unterschiedliche Konstrukte in HEK 293T-Zellen transient transfiziert. Die zu übertragende DNA bindet an ausfallendes Calciumphosphat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] und die entstandenen Kristalle werden von eukaryotischen Zellen über Endozytose aufgenommen.

Für die unterschiedlichen Kultivierungsformate sind die Volumina des Transfektionsansatzes und maximalen DNA-Mengen aus der Tabelle 21 zu entnehmen. Die Expressionsplasmide wurden mit A. bidest auf ein bestimmtes Endvolumen gebracht, 2,5 M Calciumchlorid (Tabelle 17) hinzugegeben, gemischt und anschließend tropfenweise auf 2x HBS (Tabelle 17) pipettiert.

Kultivierungsformat	2x HBS (µl)	Max. DNA (µg)	ad. H ₂ O (µl)	CaCl ₂ (µl)	Medium (ml)
Lab-Tek II Chamber Slides	31	2	28	3	0,5
24 Well-Plates	16	1	14	2	0,3
6 Well-Plates	75	3- 4	67	8	1,2
100 mm Platten	500	25- 30	450	50	8
Zellkulturflaschen, 150 cm ²	1250	60- 63	1125	125	20

Tabelle 21: Ansätze für die Transfektion mittels Calciumphosphat im jeweiligen Kultivierungsformat

Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die mit PBS gewaschenen, mit vorgelegtem Medium (Tabelle 20) versehenen Zellen gegeben und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium mit dem Transfektionsansatz nach Waschen der Zellen mit PBS durch frisches Medium ersetzt und bis zur gewünschten Expressionsstärke kultiviert.

2.2.2.7.2.1 Herstellung pseudotypisierter SHIV-Reporterviren

Der Reaktionsansatz bestand insgesamt aus 63 µg DNA und setzte sich aus 50 µg SHIV_Luziferase-/ GFP-Konstrukt (pSIvec1envLuc/ pSIvec1envGFP), 11 µg HIV_Rev (pCMV-Rev) und 2 µg Hüllprotein zusammen (siehe 2.1.7). Als Positivkontrolle diente das Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) und als negative Kontrolle wurde stets das nicht funktionelle HIV-1 Env_KS (pSVIII-KS) verwendet. Noch enthaltene Zellreste im Virusüberstand wurden durch Zentrifugieren (1500 rpm, 10 min, RT) und dem anschließenden Abfiltrieren durch einen 0,45 µm Filter beseitigt. Die aufgereinigten Virus-haltigen Zellkulturüberstände wurden entweder für die Infektion (siehe 2.2.2.8) von Zellen verwendet und dafür in 1 ml Aliquots sofort bei -80 °C eingefroren oder mittels Ultrazentrifugation direkt im Anschluss konzentriert (siehe 2.2.3.4).

2.2.2.7.2.2 Herstellung pseudotypisierter HERV-Reporterviren

HEK 293T-Zellen wurden zur Herstellung von HERV-Luziferase- oder eGFP-Reporterviren mit 60 µg DNA aus vier verschiedenen Konstrukten cotranfiziert. 36 µg CMVoriLuzi/ EGFP, 10 µg CMVoricogpp, 10 µg oricoRec_V5 und 4 µg Hüllprotein wurden eingesetzt (siehe 2.1.7). Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und der Viruspartikelüberstand

abgenommen und auf die gleiche Weise wie zur Herstellung pseudotypisierter SHIV-Partikel verfahren (siehe 2.2.2.7.2.1)

2.2.2.8 Infektion von Zellen

Die Infektion von eukaryotischen Zellen mit Luziferase-Reporterviren (SHIV/ HERV) erfolgte stets in 24 Well-Platten und sechs parallelen Experimenten. Infektionsversuche mit GFP-Reporterviren wurden sowohl in 24 Well-, als auch im 6 Well-Format durchgeführt und es fanden zwei bis vier parallele Infektionen statt. Eingefrorene Virusüberstände wurden vorab mittels p24 Gag-ELISA (siehe 2.2.3.10.1), Tritium-Assay (siehe 2.2.3.10.2) oder Cavid-Assay (siehe 2.2.3.10.3) normalisiert um zu gewährleisten, dass gleiche Viruskonzentrationen bei der Infektion auf die Zellen gegeben werden. Es wurden maximal 2/3 des normalisierten Virusüberstandes und mindestens 1/3 frisches Medium auf die zu infizierenden Zellen gegeben, die im Voraus mit PBS gewaschen wurden. Zur Erhöhung der Adsorption von Viruspartikeln an der Zelloberfläche [Xu *et al.*, 2000] wurden 8 µg/ ml Polybrene[®] pro infiziertes Well hinzugegeben. Maximal vier Stunden nach der Infektion wurden die Virusüberstände abgenommen, die Zellen erneut mit PBS gewaschen, frisches Medium hinzugegeben und die Zellen für zwei bis drei Tage inkubiert. 48 Stunden nach der Infektion erfolgte die Auswertung der Luziferase-Reporterviren im Luziferase-Assay (siehe 2.2.3.9). Mit GFP-Reporterviren infizierte Zellen wurden am zweiten und dritten Tag im Fluoreszenzmikroskop (Tabelle 2) visuell hinsichtlich der Expressionen des GFP-Gens untersucht und gegebenenfalls mittels FACS (siehe 2.2.3.8) ausgewertet.

2.2.3 Protein-Analytik

2.2.3.1 Zellyse/ Proteinextraktion

Zur Aufreinigung und Untersuchung von Proteinen, wurden die transfizierten, adhärenen Zellen erst vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend mit detergentzhaltigem Puffer lysiert (Tabelle 17), welcher die Zellmembranintegrität zerstört. In 6 Well-Plates wurden 100 µl und auf 100 mm Platten 200 µl mit Protease-Inhibitor-Tablette komplementierter Lysispuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gegeben. Für eine

schonendere Lyse der Zellen und zur Aufreinigung noch funktioneller Membranproteine wurde in den gleichen Volumina 0,3 % Dodecyl- β -D-maltosid (DDM, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, welches ebenfalls mit einer Protease-Inhibitor-Tablette komplementiert wurde. Die Proteine und restlichen Zellbestandteile wurden in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Nach Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min und 4 °C wurde der Proteinüberstand vorsichtig von den verbleibenden Zelltrümmern abgenommen und zur weiteren Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.2 Proteinaufreinigung

2.2.3.2.1 Proteinfällung

Proteine, die in den Zellkulturüberstand transfizierter Zellen sezernieren, wurden zur späteren Verwendung möglichst schonend gefällt. Als nicht denaturierendes Fällungsverfahren wurde Ammoniumsulfat eingesetzt, welches den im Mediumüberstand gelösten Proteinen die Hydrathüllen entzieht. Der Kulturüberstand wurde von den Zellen abgenommen, in ein 50 ml Falcon überführt und bei 1200 rpm für 4 min bei RT von Zelltrümmern befreit. Dazu wurde 4 M Ammoniumsulfat zum Zellkulturüberstand im Verhältnis von 1:1 gegeben. Zusätzlich wurde die Lösung mit einer Protease-Inhibitor-Tablette komplementiert und für 2 h bei 4 °C über Kopf geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen, die gefällten Proteine anschließend direkt in PBS aufgenommen und mit Protein A-Sepharose inkubiert.

2.2.3.2.2 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation diene der Anreicherung eines spezifischen Proteins aus Zelllysaten. Hierfür wurden an Sepharose gekoppelte Antikörper (siehe 2.1.9) verwendet, die spezifisch an zu untersuchenden und isolierenden Protein binden.

Vor Gebrauch der α V5-Sepharose oder Protein A-Sepharose wurden beide mit CIP-Puffer gewaschen und aliquotiert. 10 μ l der spezifischen α V5-Sepharose (20 μ g) wurden zu 30 μ l Protein A-Sepharose (60 μ g) gegeben und anschließend mit Proteinen des Lysats für 4 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler gemischt. Nach der spezifischen Antikörperbindung an die zu isolierenden Proteine, wurden die restlichen Proteine des Zelllysats über mehrere Waschschrte herausverdünnt. Hierfür wurden die an den Antikörpern gekoppelten Proteine

in dem Reaktionsgefäß für 2 min bei 4 °C und 4000 rpm pelletiert, der Überstand abgenommen und anschließend mit frischen 500 µl CIP Waschpuffer (Tabelle 17) resuspendiert. Diese Prozedur wurde bis zu fünf Mal wiederholt. Der letzte Zentrifugationschritt erfolgte bei 13.000 rpm, 4 °C für 5 min, der Überstand wurde erneut abgenommen und die präzipitierten Moleküle direkt in einer SDS-PAGE eingesetzt oder für den weiteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

Alternativ wurden gefällte Proteine aus Zellkulturüberständen mit Protein A-Sepharose für 4 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler gemischt und anschließend wie bereits beschrieben fünf Mal mit PBS auf Eis gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden nach der Waschprozedur von der Sepharose mittels 0,1 M Glycerinpuffers (pH 2,7) eluiert. Der acide pH-Wert wurde mittels 1 M Trispuffers (pH 9,0) neutralisiert, die ungekoppelten Protein A-Sepharosen abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand für Interferenzassays (siehe 2.2.3.11) eingesetzt.

2.2.3.3 Deglykosylierung von Proteinen

Für Deglykosylierungen von Proteinen wurde das Enzym PNGaseF (N-Glycosidase F, aus *Flavobacterium meningosepticum*) eingesetzt, welches spezifisch Glykosylierungen an Asparaginseitenketten entfernt.

Die Durchführung der Deglykosylierung erfolgte nach Zellyse (siehe 2.2.3.1) und Proteinaufreinigung (siehe 2.2.3.2) und wurde nach NEB-Herstellerangaben durchgeführt. 3 µl PNGaseF (entspricht 1500 Units) wurden für 20 µg des Glykoproteins verwendet. Durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 (Tabelle 23) wurde nach einer Stunde die Deglykosylierungsreaktion gestoppt. Die deglykosylierten Proteine wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetragen (siehe 2.2.3.5).

2.2.3.4 Ultrazentrifugation (UZ)

Für die Virus-Pelletierung aus Zellkulturüberständen wurde die Ultrazentrifugation benutzt. Dafür wurde stets ein SW 28-, SW 32Ti- (beide Beckman/Coulter) oder ein TST 28.38-Ausschwingrotor (Kontron AG, München, Deutschland) verwendet. Bei den Tubes handelte es sich um Thinwall Ultra-ClearTM- oder Thinwall Polyallomer konical Tubes.

Der Virus-haltige Zellkulturüberstand wurde durch Zentrifugieren (1500 rpm, 10 min, RT) und anschließendem Filtrieren mit einem 0,45 µm Filter von Zelltrümmern befreit. Die UZ-Röhrchen wurden in 70 % Ethanol desinfiziert, 2x mit sterilem PBS gewaschen und mit 15 ml 20 % Sucrose vorgelegt. In dem Ultrazentrifugationsröhrchen wurde die Virussuspension vorsichtig auf das Sucrosekissen geschichtet. Die Viruspartikel wurden für 3 h, 4 °C und 28.000 rpm in der Ultrazentrifuge (Tabelle 2) pelletiert. Nach Beendigung des UZ-Laufes wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und damit je nach weiterer Verwendung wie folgt verfahren. Für die Einbettung und anschließende Elektronenmikroskopie der Viren wurde das Viruspellet in 20 µl vorgewärmte 3 % Agarose aufgenommen. Für eine bessere Erkennung des Viruspellets wurde dafür vor dem UZ-Lauf 30 µl Goldpartikel (Tracer) hinzugegeben. Anschließend wurde das Viruspellet in der erhärteten Agarose in 2,5 % Glutaraldehyd/ 0,05 M Hepes zur weiteren Präparation fixiert.

UZ-Pellets für Infektionsversuche wurden in 500 µl 0,05 M Hepes aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 70 µl des resuspendierten Viruspellets wurde zur Quantifizierung der Viruslast mittels p24 Gag-ELISA (siehe 2.2.3.10.1), Tritium-Assay (siehe 2.2.3.10.2) oder Cavid-Assay (siehe 2.2.3.10.3) verwendet. Danach wurden alle Virus-Aliquots direkt bei -80 °C bis zum Infektionsversuch (siehe 2.2.2.8) eingefroren.

Viruspellets für Untersuchungen im Western Blot wurden in 150 µl 0,05 M Hepes für 30 min auf Eis inkubiert, resuspendiert, mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20 °C zur Auftrennung in der SDS-PAGE (siehe 2.2.3.5) gelagert.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE [Laemmli, 1970] ermöglicht es, Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen.

Sie besteht aus einem 5 %igem Sammelgel und einem Trenngel, dessen Konzentration von der Größe der aufzutrennenden Proteine abhängt und aus der Tabelle 22 zu entnehmen ist. Große Proteine werden besser in einem niedrigprozentigen Gel und Proteine mit einem geringen Molekulargewicht in einem hochprozentigen Gel aufgetrennt. Zur Vernetzung der Acrylamid-Monomere wurde N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) hinzugefügt (Tabelle 23). Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden die Proteine zu gleichen Volumenteilen mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt, welcher 5 % β-Mercaptoethanol enthält und somit die Disulfidbrücken

zwischen und innerhalb der Proteine reduziert. Um Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zu unterbrechen und ein Strecken der Moleküle zu bewirken wurden die Proteine bei 95 °C für 5 min im Heizblock denaturiert. Zusätzlich beinhaltet das Polyacrylamidgel denaturierendes SDS. Für eine scharfe Bandenauftrennung wurden dünne Gele mit einer Stärke von 0,75 mm oder 1,0 mm Dicke verwendet. Die Proteinauftrennung im Sammelgel erfolgte bei einer Spannung zwischen 80- 100 V. Später wurde die Spannung auf 120- 180 V erhöht, bis die Lauffront begann aus dem Gel zu laufen und die SDS-PAGE gestoppt wurde. Als Größenstandard wurde der kommerziell erhältliche Pageruler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas eingesetzt.

Komponenten	2x Sammelgel	1x Trenngel			
	5 %	7,5 %	10 %	12 %	15 %
optimaler Bereich der Auftrennung		170- 55kDa	95- 43kDa	72- 34kDa	43- 11kDa
A. bidest	5,7 ml	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
Acrylamid, 30 %	1,7 ml	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml	-	-	-	-
SDS, 10 %	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS, 10 %	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 22: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels unterschiedlicher Konzentrationen mit Angabe des optimalen Bereiches der Bandenauftrennung.

2.2.3.6 Western Blot

Im Western Blot werden die mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.3.5) aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine proteinbindende Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, die es ermöglicht, aus einem Proteingemisch spezifische Proteine zu identifizieren und quantifizieren.

Zu Beginn wurde das SDS-Gel für 10 min im Transferpuffer inkubiert und anschließend auf eine Roti®-PVDF-Membran (Porengröße betrug 0,45 µm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren in die Blotting-Apparatur eingelegt. Die Zusammensetzung der verwendeten Western-Blot-Puffer ist aus der Tabelle 23 zu entnehmen. Zur Aktivierung der PVDF-Membran für eine optimale Proteinbindung wurde diese im Voraus für 5 min in Methanol inkubiert. Für 30 min bei einer

Spannung von 20 V wurden nun die Proteine aus dem Gel auf die Membran im Semi-Dry-Blot-Verfahren übertragen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Membran eine Stunde im Blockingpuffer bei RT auf dem Horizontalschüttler geschwenkt. Die Membran wurde anschließend eine Stunde im ersten Antikörper (siehe 2.1.9) bei RT oder ü. N. bei 4 °C inkubiert. Um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran drei Mal für je 5 min mit PBS/ Tween 0,1 % auf dem Schüttler gewaschen und falls nötig mit einem sekundären, indirekten Antikörper für 1 h bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Die Detektion der geblotteten Proteine erfolgte mittels eines an Meerrettich-Peroxidase (Horseradishperoxidase, HRP) gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz-Reaktion (Enhanced chemiluminiscence, ECL) mit dem Super Signal Kit (Thermo Scientific, Logan, USA) oder dem ECL Plus Western Blot Detection System (GE Healthcare, Fairfield, USA, Tabelle 6). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Antikörper-gekoppelten Proteine wurden nun durch Schwärzung eines Röntgenfilms (X-Ray Retina, Fotochemische Werke Berlin GmbH) nachgewiesen.

Puffer und Medien	Zusammensetzung
APS, 10 %	10 % Ammoniumpersulfat in A. bidest. gelöst und steril filtriert
Blockingpuffer	5 % Milchpulver (Sucofin, TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland) in PBS/ 1 % Tween
Blot Processing Buffer	1 Teil 10x Tris/ Glycin/ SDS Buffer (BioRad), 9 Teile H ₂ O
Blot Transfer Buffer	1 Teil premixed 10x Tris/ Glycin Buffer (BioRad), 2 Teile Methanol, 7 Teile H ₂ O
Laemmli Sample Buffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS, 25 % Glycerol, 0,01 % Bromophenol Blue (BioRad)
PBS/Tween 0,1 %	0,1 % Tween 20 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in PBS
Probenpuffer	Laemmli Sample Buffer (BioRad), 5 % β-Mercaptoethanol
Stripping Buffer	1 Teil PBS, 1 Teil Wasserstoffperoxid, 30 %
TEMED	BioRad, Hercules, USA

Tabelle 23: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien für das Arbeiten mit Proteinen.

2.2.3.7 Immunfluoreszenz Mikroskopie (cLSM)

Die Immunfluoreszenz ermöglicht es über spezifische mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper (siehe 2.1.9), ein bestimmtes Protein in der Zelle sichtbar zu machen und es mittels Mikroskop zu untersuchen.

Transient transfizierte HEK 293T- oder CrFK- Zellen wurden hierfür in Chamber Slides (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) passagiert. Bei der gewünschten Expressionsstärke wurden die adhärenen Zellen mit 800 µl 2 % Formaldehyd für 30 min bei RT oder ü. N. bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden 3x mit 1 ml PBS gewaschen und für eine intrazelluläre Antikörpermarkierung mit 800 µl 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Sollen ausschließlich an der Zelloberfläche präsentierte Proteine detektiert werden, wurde auf die Pemeabilisierung der Membran verzichtet. Die unspezifischen Bindungen wurden mit 1 ml 1 % Blockingpuffer für 15- 30 min nach einem weiteren Waschschrift blockiert. Nun erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem primären Antikörper oder mit einem direkt Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper für 60 min bei RT. Um die am Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zu schonen wurden die folgenden Arbeiten im abgedunkelten Zustand durchgeführt. Die Zellen wurden erneut 3x mit PBS gewaschen und es erfolgte die Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der ungekoppelten Antikörper für weitere 60 min bei RT. Die verwendeten Fluoreszenzantikörper sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Bei den Fluoreszenzfarbstoffen handelte es sich um Cy3, AlexaFluor® 488 oder AlexaFluor® 568. Die Zellen wurden ausgiebig mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) in einer Konzentration von 0,2 ng/ ml für 5 min bei RT angefärbt. Durch die Bindung von DAPI an doppelsträngige DNA, bilden sich fluoreszierende Komplexe im Zellkern aus. Für deutliche Fluoreszenzsignale wurde überschüssiges DAPI gründlich mit PBS gewaschen, die Restflüssigkeit abgezogen, die Kammern vom Objektträger vorsichtig entfernt und die Zellen in Mowiol luftblasenfrei mit einem Deckgläschen eingebettet. Bis zur Untersuchung der Präparate am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM-510 wurden sie im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Erste Bildaufnahmen erfolgten stets an mit Leervektor transfizierten Zellen der Negativkontrolle, um schwache unspezifische Fluoreszenzsignale, bei denen es sich um das sog. „Hintergrundrauschen“ handelt herunterzuregeln. Diese Aufnahme- und Bildeinstellungen wurden als Grundeinstellungen für die Auswertung der transfizierten Zellen gespeichert, womit für eine objektive Bildbetrachtung gesorgt war.

2.2.3.8 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Die FACS-Messung wurde zur Quantifizierung der mit GFP-Reporterviren infizierten Zellen eingesetzt und erfolgte am FACSCalibur-Gerät. Vorab wurden die infizierten Zellen auf ihre

GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nur bei einer ausreichenden Infektion wurden die Zellen zur FACS-Messung präpariert.

Hierfür wurden die CrFK-Zellen möglichst schonend mit dem Cell Dissociation Buffer (Tabelle 17) aus der Kultivierungsschale gelöst und in ein 25 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 4 min bei RT pelletiert, in PBS resuspendiert und die Zellzahl im Coulter Counter Z2 (siehe 2.2.2.6) bestimmt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 1×10^6 Zellen, die erneut pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde zur Fixierung in 250 μ l Aldehyd-haltigen CellFix resuspendiert und die Proben anschließend im FACSCalibur-Gerät gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Research Software und die verwendeten Puffer wurden von Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

2.2.3.9 Luziferase-Assay

Ein Biolumineszenz hervorrufendes Gen dient als Reporter im Luziferase-Assay und kann quantitativ im Luminometer (Tabelle 2) gemessen werden. Die *Firefly* Luziferase des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) befähigt den Organismus zur Lichterzeugung.

Dem Luziferase-Assay ging immer die Infektion mit *Firefly* Luziferase-Reporterviren im 24 Well-Format voraus (siehe 2.2.2.8). Die Menge an *Firefly* Luziferase im Zelllysate ist proportional zur gemessenen Lichtemission. Dadurch können indirekt Rückschlüsse auf die Transkriptionsrate des Reportergens und somit auch auf die Infektionsrate gezogen werden. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen mittels 100 μ l 1x Reporter Lysis Buffer (Promega Corporation, Madison, USA) lysiert. 10 μ l des Lysates wurde auf eine 96 Well-Luminometer-Platte pipettiert. Die weitere Durchführung und die Messeinstellungen des Luminometers entsprachen bis auf eine Ausnahme den Promega-Herstellerangaben. Pro Well wurde an Stelle von 100 μ l nur 50 μ l Luciferase Assay Reagent (Promega Corporation, Madison, USA) automatisch hinzugegeben. Eine Mehrfachbestimmung der Luziferaseaktivität eines infizierten Wells erfolgte nicht. Hierfür erfolgten 4 bis 6-fach Infektionen des gleichen pseudotypisierten Reportervirus.

2.2.3.10 Quantifizierung von Virusüberständen

Zur Quantifizierung von pseudotypisierten Virusüberständen wurden drei verschiedene Assays verwendet, die unterschiedlich sensitiv gegenüber SHIV- oder HERV-Reporterviren sind. Durch die Messung der mit unterschiedlichen Hüllproteinen pseudotypisierten viralen Partikel war es möglich diese für Infektionsversuche (siehe 2.2.2.8) zu normalisieren.

2.2.3.10.1 p24 Gag-ELISA

Mit Hilfe des p24 Gag-ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay) [Engvall *et al.*, 1971] ist es immunologisch möglich das SIV Gag nachzuweisen. Der ELISA wurde ausschließlich zur Quantifizierung pseudotypisierter SHIV-Virusüberstände zur Tropismusuntersuchung verwendet. Am Vortag wurde eine transparente 96 Well Mikrotiterplatte (Becton Dickinson, San Jose, USA) mit dem monoklonalen α SIV Gag-Antikörper AG 3.0 (siehe 2.1.9) beschichtet. Die Platte wurde am nächsten Tag für eine Stunde mit 2 % Milchpulver in PBS bei 37 °C blockiert. Die zu untersuchenden viralen Überstände wurden mit 0,2 % Tween für 10 min inaktiviert und anschließend in Doppelbestimmungen und mehreren Verdünnungsschritten auf die ELISA-Platte pipettiert. Die Verdünnungen erfolgten in bereits vorgelegtes 2 % Milchpulver/ 0,1 % Tween/ PBS (PMT). Als Positivkontrolle diente ein inaktivierter SIVmac Standard (Norley *et al.*) und als negative Kontrolle Virus-freies Zellkulturmedium. Nach einer Stunde bei 37 °C wurden die Platten zweimal mit 0,05 % Tween in PBS gewaschen. Nun wurde ein HIV-Pool-Plasma (1:500, Norley *et al.*) in PMT aufgetragen und die Platten damit für 30 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Platten für 30 min mit dem α human-IgG-Sekundärantikörper (1:1000 in PMT, siehe 2.1.9) versetzt. Der gebundene Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper konnte nach erneutem Waschen in einer Nachweisreaktion quantifiziert werden. Hierfür wurden eine OPD-Tablette entsprechend den Sigma-Herstellerangaben in PBS pH 6,0 gelöst und die Reaktion mit 30 % Wasserstoffperoxid gestartet. Durch Umsatz der farblosen OPD-Lösung zu einem gelben Substrat konnte die SIV Gag-Proteinmenge quantifiziert werden. Die Nachweisreaktion wurden durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und im Microplate Reader Sunrise (Tabelle 2) bei einer Wellenlänge von 492/ 570 nm ausgelesen.

2.2.3.10.2 Tritium-Assay

Der *Quan-T-RT* Assay (Tabelle 6) wurde eingesetzt um über die reverse Transkriptaseaktivität im Zellkulturüberstand die Virusmenge zu quantifizieren. Der radioaktive Tritium-Assay wurde ausschließlich für pseudotypisierte SHIV-Viruspartikel angewendet. Über die virale RT-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand wird radioaktivmarkiertes [³H]TPP in einer Primer/ Template- Reaktion eingebaut. Die eingebaute und zu messende Tritiummenge ist somit proportional zur Enzymaktivität und damit auch zur Virusmenge im Kulturüberstand.

Die Durchführung des *Quan-T-RT* Assays erfolgte nach Perkin Elmer-Herstellerangaben. Es wurden 70 µl eines mit 0,2 % Tween inaktivierten Virusüberstandes in jeweils Doppelbestimmungen gemessen. Die RT-Reaktion erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C und die Messung der Proben im Liquid Scintillation Counter (Tabelle 2).

2.2.3.10.3 Cavid-Assay

Der HS-Mg RT Activity Kit (Tabelle 6) ist sehr sensitiv und ermöglichte es auch kleinste Mengen von HERV-Reporterviren, die im Tritium-Assay nicht mehr quantifiziert werden konnten, mittels der reverse Transkriptaseaktivität zu detektieren. Die virale RT der Probe ermöglicht die Synthese eines DNA/ RNA-Stranges, der im zweiten Schritt über alkalische Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper spezifisch nachgewiesen werden kann. Die AP-Quantifizierung ist wiederum proportional zur RT-Aktivität in der Probe und somit zur Virusmenge. Die Durchführung entsprach den Cavid-Herstellerangaben. 10 µl der viralen Probe wurden in Doppelbestimmungen auf die Cavid-Platte aufgetragen.

2.2.3.11 Interferenz-Assay

Für den Interferenz-Assay wurden einen Tag im Voraus CrFK-Zellen in 24-Well Platten ausgesät (siehe 2.2.2.6). Am Folgetag wurden die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit präzipitierten Proteinen (siehe 2.2.3.2) für 1,5 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut vorsichtig mit PBS gewaschen und es erfolgte die Infektion (siehe 2.2.2.8) mit normalisierten SHIV-Luziferase-Reporterviren.

3 Ergebnisse

Die Codonoptimierung und Rekonstitution des originalen Hüllproteins von HERV-K113 waren Grundvoraussetzung für die in dieser Promotionsarbeit durchgeführten, funktionellen Studien (siehe 1.2.2.3). Durch Codonoptimierung der *env*-Sequenz von HERV-K113 (coEnv) wurde der geringe GC-Gehalt von 42 % auf 63 % gesteigert, die Halbwertszeit der daraus resultierenden mRNA erhöht und ein alternatives Spleißen zur Entstehung des RNA-Transportproteins Rec eliminiert. Dies alles resultierte in einer über 50-fach erhöhten Proteinexpression von coEnv in Western Blot- und Immunofluoreszenz-Versuchen gegenüber dem wtEnv [Hanke *et al.*, 2009]. Durch die Identifizierung und anschließende Rückmutation von insgesamt acht postinsertionalen Mutationen wurde das ursprüngliche HERV-K113 Env (oricoEnv) zum Zeitpunkt der Integration in den menschlichen Vorfahren wiederhergestellt [Promotionsarbeit Kirsten Hanke]. Zu diesem Zeitpunkt war das Hüllprotein vollständig funktionell und hat die Infektion in humane Keimbahnzellen vermittelt. Drei HERV-K113 spezifische Variationen blieben jedoch innerhalb des *env*-Gens erhalten, wovon es sich von einer Konsensussequenz unterscheidet [Hanke *et al.*, 2009; siehe auch Abbildung 33 in 8.2.1].

3.1 Analyse der Glykosylierungen von HERV-K113 Env

Bisherige Western Blot Ergebnisse im Rahmen meiner Diplomarbeit [Diplomarbeit Philipp Kramer] haben etwa gleich starke Proteinexpressionen des heutigen Hüllproteins von HERV-K113 (coEnv) und des originalen, ursprünglichen HERV-K113 Env-Proteins (oricoEnv) gezeigt. Jedoch waren zwischen coEnv und oricoEnv prägnante Unterschiede im Bandenmuster und bei der Prozessierung in die beiden Hüllprotein-Untereinheiten SU und TM sichtbar. Zudem liegt das Molekulargewicht deutlich über dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht.

Glykosylierung des viralen Hüllproteins ist eine essentielle Modifikation für die spätere Funktionalität und gleichzeitig auch eine Möglichkeit für die Abweichung im Molekulargewicht. Insgesamt konnten zehn potentielle N-Glykosylierungen mit dem Aminosäuremotiv (N-X-S/T) innerhalb der coEnv-Sequenz identifiziert werden (Abbildung 11). Zwei dieser Glykosylierungsmotive befinden sich dabei in unmittelbarer, räumlicher Nähe (Asn₅₀₆ und Asn₅₀₇). Die Rekonstitution der originalen HERV-K113 Env-Sequenz führte

jedoch zur Rückmutation eines Asparagins an der Aminosäureposition 506 zu einem Lysin und der folgenden Eliminierung einer potentiellen Glykosylierung Asn₅₀₆ (Abbildung 11). Somit besitzt oricoEnv nur neun potentielle Glykosylierungsstellen, was jedoch noch immer auf ein stark glykosyliertes Env-Protein schließen lässt [Hanke *et al.*, 2009]. Vier der Glykosylierungsstellen von oricoEnv befinden sich auf der extrazellulären Seite des TMs und fünf im SU, wobei davon eine potentielle Glykosylierungsstelle direkt an der „cleavage site“ (CS) lokalisiert ist (Asn₄₆₁, Abbildung 11) und für die Prozessierung in die Env-Untereinheiten hinderlich sein könnte. In weiterführenden Deglykosylierungs-experimenten soll nun der große Unterschied der im Immunoblot auftretenden Proteinbanden mit dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht geklärt werden.

HeLa-Zellen wurden dazu mit dem heutigen coEnv-V5, dem originalen oricoEnv-V5 oder mit pcDNA3-Leervektor transfiziert. Die Env-Proteine aus den Zelllysaten wurden präzipitiert und für 1 h mit PNGaseF behandelt. PNGaseF ist eine Amidase, die die Bindung zwischen dem innersten N-Acetylglucosamin (GlcNAc) der N-verknüpften Oligosaccharidketten und dem Asparaginrest des Proteins abspaltet. Zur Detektion der Proteine diente ein am C-terminalen V5-Tag bindender α V5-HRP Antikörper.

Unbehandelte coEnv-Proteine weisen im Immunoblot eine Bande des Vorläuferproteins mit der Größe von 95 kDa und ein Duplett der transmembranen Untereinheit zwischen 33 und 35 kDa auf (Abbildung 12). Bei oricoEnv ist neben des 95 kDa großen Vorläuferproteins nur eine zusätzliche TM-Bande bei 43 kDa zu detektieren. Anhand des Proteinverhältnisses zwischen Vorläufer und TM fällt auf, das coEnv gegenüber oricoEnv wesentlich schlechter in seine beiden Untereinheiten prozessiert wird. Die Zugabe von PNGaseF bewirkt eine signifikante Verringerung des Molekulargewichtes von coEnv und oricoEnv gegenüber den unbehandelten Proben. Nach PNGaseF-Behandlung konnte sowohl bei coEnv und oricoEnv ein Proteinshift des glykosylierten Vorläufers von 95 kDa auf 70 kDa detektiert werden, was genau dem theoretischen Molekulargewicht des unglykosylierten Vorläuferproteins von 70 kDa (ohne Signalpeptid) entspricht. Die Deglykosylierung von oricoEnv erniedrigt das Molekulargewicht der transmembranen Untereinheit auf 27 kDa, was mit der theoretischen Molekularmasse des unglykosylierten TMs übereinstimmt. Das erwartete TM-Duplett von coEnv wird nach PNGaseF-Behandlung ebenfalls im Molekulargewicht erniedrigt. Jedoch läuft das unglykosylierte coEnv TM deutlich oberhalb der 27 kDa Bande, was eine weitere N-terminale Spaltungsstelle vermuten und auf einen geringeren Glykosylierungsstatus oder eine unvollständige Glykosylierung der TM Untereinheit im Vergleich zu oricoEnv schließen

lässt. Der am TM fusionierte V5-Tag erhöht das molekulare Gewicht um ca. 1,7 kDa. Die Detektion konnte neben einem C-terminal bindenden α V5-Antikörper auch noch mit einem kommerziell erwerblichen α TM-Antikörper bestätigt werden, der innerhalb der extrazellulären Domäne der transmembranen Untereinheit bindet. Es sind jedoch keine spezifischen Antikörper gegen das Oberflächenglykoprotein SU verfügbar.

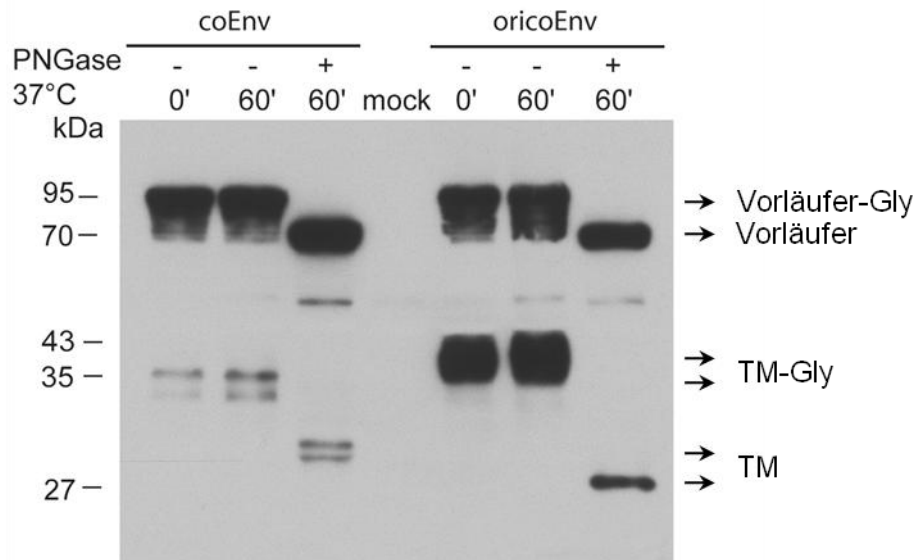


Abbildung 12: Deglykosylierungsexperimente des heutigen coEnvs und des ursprünglichen oricoEnvs.

HeLa Zellen wurden mit pcDNA3coEnv-V5, pcDNA3oricoEnv-V5 und pcDNA3-Leervektor transfiziert, die Env-Proteine präzipitiert, für eine Stunde mit und ohne PNGaseF behandelt und im Western Blot anschließend untersucht. Ein Proteinshift des glykosylierten Env-Vorläufers mit 95 kDa und der unglykosylierten Form mit 70 kDa ist zu erkennen. Das transmembrane Hüllprotein von oricoEnv weist einen Shift von 43 kDa des glykosylierten TMs zu unglykosylierten 27 kDa Bande auf. Das deglykosylierte coEnv TM läuft deutlich oberhalb, was auf eine zusätzliche N-terminale Prozessierungsstelle schließen lässt. Gegenüber oricoEnv besitzt das TM von coEnv außerdem einen geringeren Glykosylierungsstatus. Die Detektion aller Proteine erfolgte mittels eines α V5-HRP-Antikörpers [Hanke *et al.*, 2009].

Die weiterführenden Glykosylierungsexperimente bestätigen erste Versuche im Rahmen meiner Diplomarbeit [Diplomarbeit Philipp Kramer] mit Tunicamycin behandelten Zellen und der Glykosylierungs-Minus-Mutante oricoEnv_{Gly⁻}. Tunicamycin ist ein Antibiotikum, welches die Reaktion des UDP-GlcNAc und Dolicholphosphat (Dol-P) bereits im ersten Schritt der Synthese hemmt [Hirschberg und Snider, 1987; Abeijon und Hirschberg, 1990] und zur Inhibition der Synthese von allen N-verknüpften Glykosylierungen führt. Zur Herstellung der Glykosylierungs-Minus-Mutante oricoEnv_{Gly⁻} wurden sämtliche Serine oder Threonine aller neun putativen Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) innerhalb der oricoEnv-Sequenz gegen Alanine ausgetauscht (N-X-A).

Schlussfolgernd zeigen alle Glykosylierungsexperimente eine starke Glykosylierung der Hüllproteine von HERV-K113. Durch Deglykosylierung mittels PNGaseF, Inhibition der Glykosylierung durch Tunicamycin oder einer Glykosylierungs-Minus-Mutante wird das Molekulargewicht des glykosylierten Vorläuferproteins und der glykosylierten transmembranen Untereinheit drastisch gesenkt. Zusätzlich konnte in Tunicamycin-Experimenten und Versuchen mit oricoEnv_{Gly⁻} gezeigt werden, dass Glykosylierungen eine kritische Rolle beim Transport und der Prozessierung des Vorläufer-Envs in SU und TM spielen [Diplomarbeit Philipp Kramer; Hanke *et al.*, 2009]. Das heutige coEnv mit noch vorhandenen postinsertionalen Mutationen weist gegenüber dem ursprünglichen oricoEnv eine wesentlich schlechtere Prozessierung in seine Untereinheiten auf. Zusätzlich besitzt coEnv vermutlich einen geringeren Glykosylierungsstatus als oricoEnv oder wird nur unvollständig glykosyliert.

3.2 Einbau von HERV-K113 Env in retrovirale Partikel

Um die Funktionalität des stark glykosylierten Hüllproteins zu untersuchen, soll nun der Einbau von HERV-K113 Env in retrovirale Partikel überprüft werden. Dafür wird ein lentivirales SHIV-Konstrukt verwendet, das die Bildung von hohen Virustitern ermöglicht. Die SHIV-Vektoren sind stark deletiert, so dass ausschließlich nicht replikationskompetente „Single Round“-Viren gebildet werden. Diese exprimieren nach erfolgter Infektion ein Luziferasegen und stellen somit ein sehr gutes lentivirales Reportervirussystem dar [Hofmann *et al.*, 1999; Bannert *et al.*, 2000]. Das ausgeschaltete *env*-Gen ermöglicht es SHIV mit unterschiedlichen Hüllprotein-Mutanten zu pseudotypisieren. Sie sind jedoch nach möglichem Eintritt in die Zielzelle und Integration ins Wirtsgenom nicht in der Lage neue Zellen zu infizieren, weil die Erbinformation zur Bildung neuer Hüllproteine nicht in virale Partikel verpackt wird.

Es konnte für mehrere Retroviren gezeigt werden, dass das C-terminale, zytoplasmatische Ende des TMs einen entscheidenden Einfluss auf den Einbau und die Fusogenität hat [Cheynet *et al.*, 2005; Celma *et al.*, 2007; Côté *et al.*, 2008]. Aus diesem Grund wurden, wie in der Abbildung 13 zu sehen, bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit [Diplomarbeit Philipp Kramer] drei verschiedene oricoEnv-Mutanten mit unterschiedlich C-terminal deletierten Enden generiert. Neben dem Volllängen oricoEnv, den C-terminalen Deletionsmutanten oricoEnv $\Delta_{693-699}$, oricoEnv $\Delta_{680-699}$ und oricoEnv $\Delta_{659-699}$ sollen auch coEnv, die

Glykosylierungs-Minus-Mutante oricoEnv_{Gly}⁻ und eine oricoEnv_{CS}⁻-Mutante, dessen Spaltstelle („cleavage site“) eliminiert wurde, nun auf ihren Einbau in virale Partikel getestet werden.

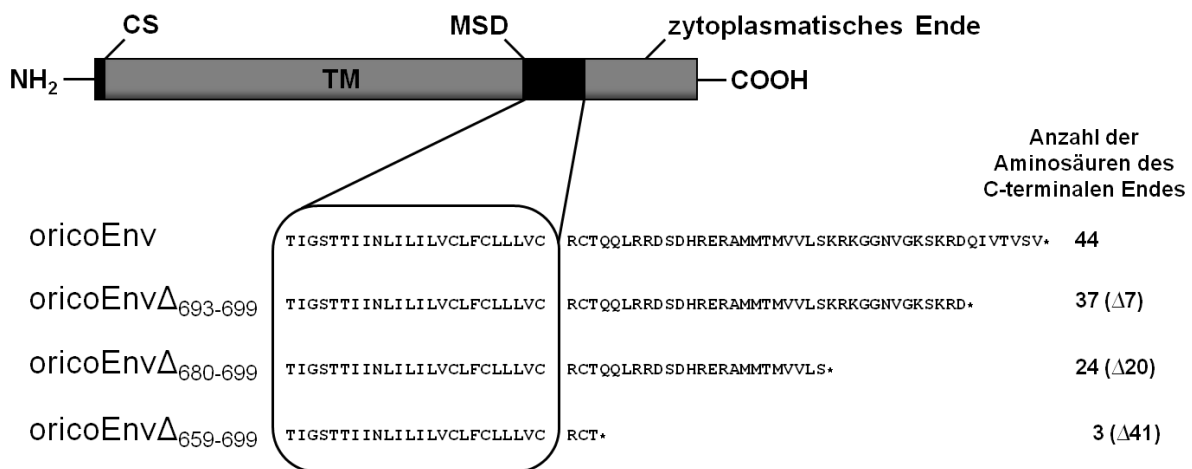


Abbildung 13: C-terminale oricoEnv-Mutanten. Aminosäuresequenzen der Membran durchziehenden Domäne (MSD) und des zytoplasmatischen Endes des Vollängen oricoEnv und der drei C-terminal verkürzten Mutanten oricoEnv $\Delta_{693-699}$, oricoEnv $\Delta_{680-699}$ und oricoEnv $\Delta_{659-699}$. Die Anzahl der verbliebenen und der entfernten Aminosäuren des zytoplasmatischen Endes sind vermerkt.

3.2.1 Einbau von C-terminalen Deletionsmutanten in SHIV-Partikel

HEK 293T-Zellen wurden mit SHIV-Vektoren und jeweils einem der Hüllprotein-Mutanten co-transfiziert (siehe 2.2.2.7.2.1). Die Zellysate wurden im Immunoblot unter der Verwendung eines TM-spezifischen Antikörpers detektiert. Virusüberstände der pseudotypisierten SHIV-Partikel wurden über ein 20 %iges Sucrosekissen per Ultrazentrifugation (siehe 2.2.3.4) aufkonzentriert und anschließend im Immunoblot analysiert. Hierfür wurde sowohl der α TM- als auch ein SHIV-Gag-spezifischer-Antikörper eingesetzt.

In der Abbildung 14A sind die Env-Lysate der Virus-produzierenden Zellen in etwa gleich großen Konzentrationen sichtbar. Die Größenunterschiede der C-terminal verkürzten oricoEnvs sind deutlich zu erkennen, besonders von den stark verkürzten oricoEnv $\Delta_{659-699}$ - und oricoEnv $\Delta_{680-699}$ -Mutanten. Auffällig ist die mangelnde Prozessierung des mit nur sieben Aminosäuren trunkeierten oricoEnv $\Delta_{693-699}$ gegenüber den erwartet unprozessierten Hüllproteinmutanten von oricoEnv_{Gly}⁻ und oricoEnv_{CS}⁻. Im Western Blot der Viruspellets in Abbildung 14B ist der Env-Einbau in SHIV-Partikel gezeigt. Für oricoEnv $\Delta_{693-699}$, oricoEnv_{CS}⁻ und oricoEnv_{Gly}⁻ ist kein Einbau in SHIV-Viren nachweisbar. Das

ursprüngliche Vollängen-oricoEnv und oricoEnv $\Delta_{680-699}$ ist sehr gut detektierbar, wohingegen das am stärksten verkürzte oricoEnv $\Delta_{659-699}$ bis zu fünf Mal besser in lentivirale Partikel eingebaut wird. Zudem wird die Mutante oricoEnv $\Delta_{659-699}$ mit fast vollständig deletiertem Ende ausschließlich als prozessiertes Hüllprotein eingefügt. Dass gleiche Mengen an Viruspartikeln im Immunoblot aufgetragen wurden, konnte mittels α SIV-Gag-Antikörpers gezeigt werden.

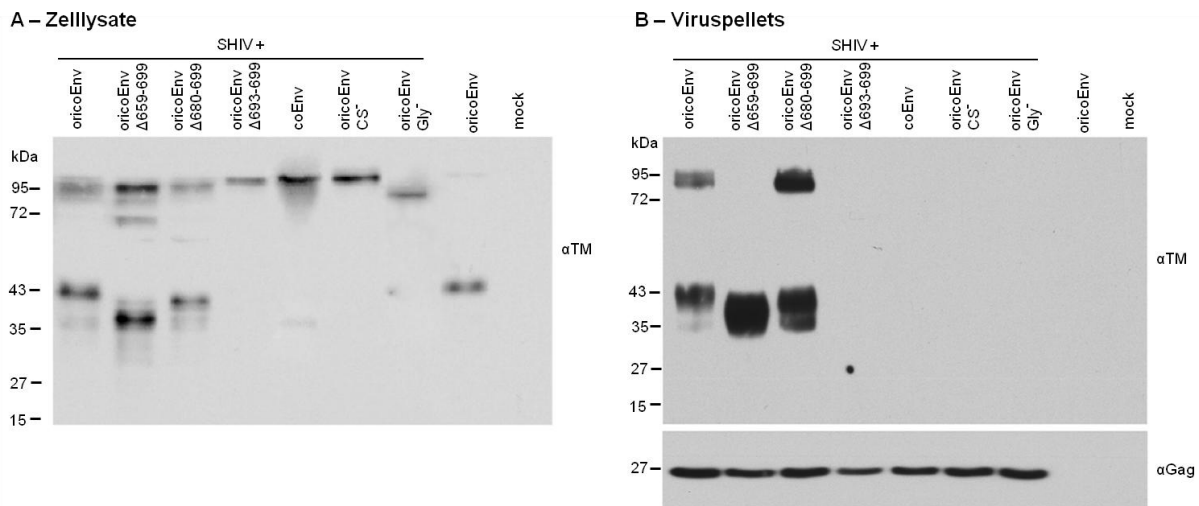


Abbildung 14: Einbau von oricoEnv und C-terminal verkürzten Mutanten in lentivirale SHIV-Partikel.

(A) Lysate der mit SHIV-Luzi, HIV-1 Rev und verschiedenen Env-Mutanten transfizierten HEK 293T-Zellen. Die Detektion der Hüllproteine erfolgte durch einen α TM-Antikörper. (B) Ultrazentrifugation der entsprechenden Virusüberstände durch ein 20 %iges Sucrosekissen. Die Viruspellets wurden anschließend im Immunoblot mittels TM- und SIV-Gag-spezifischen Antikörpers analysiert. Als negative Kontrollen wurden Zellen ausschließlich mit oricoEnv ohne Plasmidvektoren zur Herstellung pseudotypisierter SHIVs oder pcDNA3-Leervektor transfiziert. Im Gegensatz zum originalen oricoEnv, wird das am stärksten C-terminal verkürzte oricoEnv $\Delta_{659-699}$ bis zu fünf Mal besser in lentivirale Partikel inkorporiert [Hanke *et al.*, 2009].

3.2.2 Einbau in HERV-K113 Partikel

Lentivirale Vektoren wie SHIV sind vermutlich nicht das beste System um den Einbau des β -retroviralen Hüllproteins von HERV-K113 zu untersuchen. Jedoch konnte aufgrund sehr schwacher Expressionsraten und inaktivierenden Mutationen bislang kein HERV-K basiertes Reportersystem generiert werden.

Die Wiederherstellung des vermutlich ursprünglichen HERV-K113 Virus zum Zeitpunkt der Integration in den menschlichen Vorfahren im Rahmen der Promotionsarbeit von Nadine Beimforde ermöglichte es auf ein nun funktionelles HERV-K113 Provirus zurückzugreifen

[Promotionsarbeit Nadine Beimforde]. Aus Sequenzvergleichen verschiedener HERV-K Elemente gelang es bereits anderen Gruppen eine Konsensussequenz zu entwerfen, die bei Expression HERV-Partikel bilden [Dewannieux *et al.*, 2006; Lee und Bieniasz, 2007]. Auf die gleiche Weise wurde die Provirus-Sequenz von HERV-K113 (Genbank-Nr.: AY037928) mit hochkonservierten, humanspezifischen HERV-K(HML-2) Elementen verglichen. Sechszwanzig postinsertionale Mutationen, besonders der reversen Transkriptase und des Gag-Polyproteins wurden revertiert, jedoch blieben im Gegensatz zu einer HERV-Konsensussequenz sieben HERV-K113 spezifische Variationen erhalten. Mit Hilfe des neu hergestellten ori HERV-K113 war aufgrund zu geringer Expressionsraten kein Nachweis der Replikationskompetenz möglich [Beimforde *et al.*, 2008]. Eine deutliche Steigerung der Expression konnte durch den Austausch der U3-Promoterregion der viralen 5'LTR gegen die Promotersequenz des Cytomegalovirus erzielt werden. Wie in der Abbildung 15 zu erkennen, ist das CMVori HERV-K113 nun in der Lage virale HERV-Partikel zu bilden.

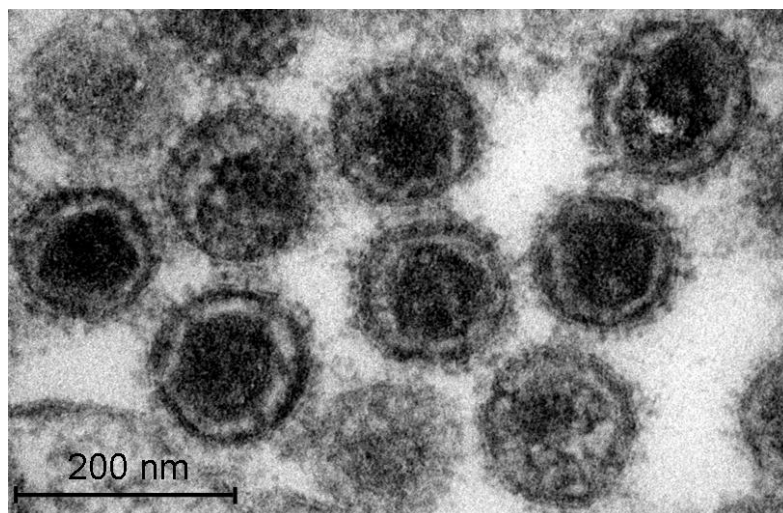


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme von CMVori HERV-K113. Innerhalb der reifen viralen Partikel ist das elektronendichte für β -Retroviren typische hexagonale Capsid zu erkennen. Das Capsid ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in der die viralen Hüllproteine eingelagert und elektronenmikroskopisch als kleine „Spikes“ auf der Partikeloberfläche sichtbar sind (Partikel wurden hergestellt von Nadine Beimforde und aufgenommen von Lars Möller).

Zur Untersuchung möglicher CMVori HERV-K113-Infektionen bedarf es eines Reportergens, wie Antibiotikaresistenzen, Fluoreszenzproteine oder Luziferasen, welche es ermöglichen zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen zu selektieren. Diese besitzen jedoch Vor- und Nachteile in der Handhabung der Zellen, der Sensitivität und bei der Klonierung ins provirale Genom. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche HERV-K113-Vektoren hergestellt, die jeweils ein spezifisches Reporthergen besitzen und einer bestimmten

Zielstellung dienen (Abbildung 16). Die verwendeten Gene sind das *enhanced green fluorescent protein (eGFP)*, *Luziferase*-, *Neomycin*- und *Zeocin*-Reportergerne. Die Reportergerne-Sequenz wurde mittels der Endonuklease *AgeI* an die Position des *env*-Gens kloniert. Dieser Austausch bewirkt zusätzlich eine Deletion des akzessorischen Rec-Leserahmens. Spleißdonor und -akzeptor des deletierten *env*'s wurden eliminiert, sodass kein Spleißen des Reportergerne an der *env*-Position mehr erfolgt. Die Expression der Reportergerne treibt der „human elongation factor 1 α “ (EF1 α)-Promoter an, der eine hohe und effiziente Proteinexpression in eukaryotischen Zellen gewährleistet [Mizushima und Nagata, 1990; Goldman *et al.*, 1996].

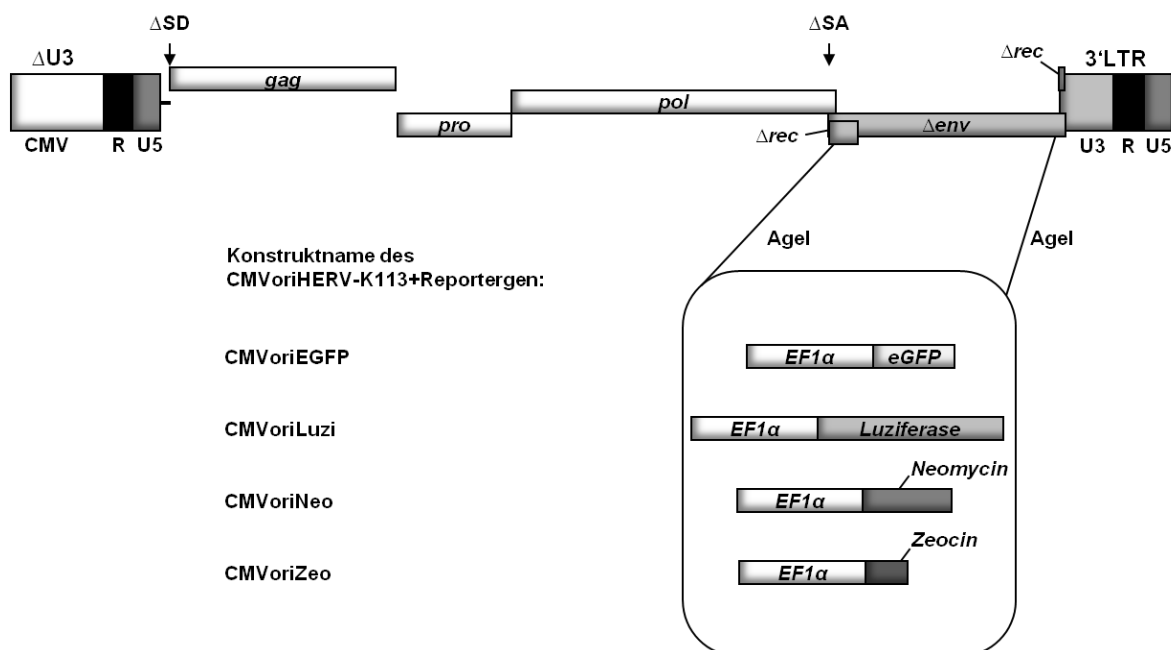


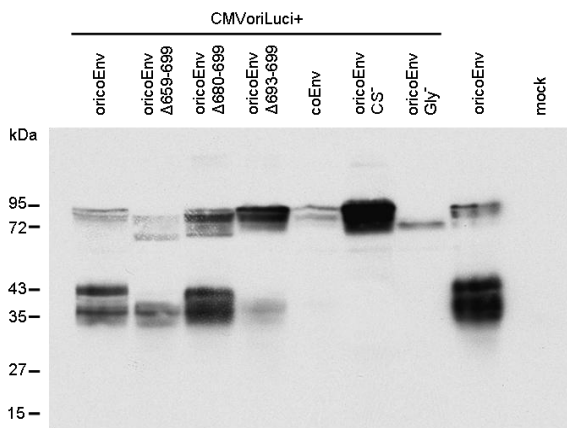
Abbildung 16: HERV-K113 Reporterkonstrukte. Schematische Darstellung des proviralen Aufbaus von HERV-K113. Durch Reversion der postinsertionalen und inaktivierenden Mutationen wurde die originale Sequenz zum Zeitpunkt der Integration in die Keimbahnlinie wiederhergestellt. Die Expression des ori HERV-K113 wurde durch Austausch des U3-Promoterbereichs in einen CMV-Promoter erhöht und die Spleißdonor (Δ SD) und -akzeptorstellen (Δ SA) zur Bildung der *env* mRNA eliminiert. Aus diesem Ausgangskonstrukt CMVori HERV-K113 wurden vier verschiedene Reportergernekonstrukte hergestellt, die an der *env*-Position ein EF1 α -Promoter-angetriebenes Reportergerne tragen. Auch der Leserahmen des akzessorischen Rec-Proteins wurde dabei deletiert. Die vier Viruskonstrukte wurden benannt nach ihrem Reportergerne und lauten: CMVoriEGFP (enhanced GFP-Gen), CMVoriLuzi (Luziferasegen), CMVoriNeo (Neomycin-Gen) und CMVoriZeo (Zeocin-Gen).

Zur Herstellung von HERV-K113-Reportergerne und Untersuchung des oricoEnv-Einbaus wurden HEK 293T-Zellen mit insgesamt vier unterschiedlichen Vektoren transfiziert (siehe 2.2.2.7.2.2). Neben dem CMVori-Reportergernekonstrukt wurde in *trans* ein

codonoptimiertes *gag-pro-pol* Expressionsplasmid (CMVoriGPP), ein oricoRec- und oricoEnv-Vektor gegeben. Auf diese Weise konnten die gebildeten „Single Round“-Viren durch co-Transfektion des Hüllproteinkonstruktes mit unterschiedlichen oricoEnv-Mutanten pseudotypisiert werden. Die Zelllysate und Viruspellets wurden nach Ultrazentrifugation im Immunoblot mittels TM- und Gag-spezifischen Antikörper analysiert.

Wie in der Abbildung 17A zu sehen, ist auch hier der Unterschied im Molekulargewicht zwischen den verkürzten oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -, oricoEnv $\Delta_{680-699}$ -, oricoEnv $\Delta_{693-699}$ -Mutanten zum Vollängen oricoEnv deutlich zu erkennen. Wie erwartet werden die oricoEnv_{Gly}⁻ und oricoEnv_{CS}⁻ sehr schwach bis gar nicht prozessiert, was auch bei oricoEnv $\Delta_{693-699}$ zu beobachten ist. Das mit 41 Aminosäuren am stärksten deletierte oricoEnv $\Delta_{659-699}$ wird von allen Mutanten am besten in HERV-K113-Partikel inkorporiert, einschließlich dem Vollängen Env (Abbildung 17B). Dagegen wird das in den Zelllysaten nur sehr schwach prozessierte oricoEnv $\Delta_{693-699}$ wie coEnv, oricoEnv_{CS}⁻ und oricoEnv_{Gly}⁻ gar nicht in HERVs eingebaut. Mit Hilfe des monoklonalen α SIV-Gag-Antikörpers wird gezeigt, dass gleichmäßige Proteinmengen aufgetragen wurden.

A – Zelllysate



B – Viruspellets

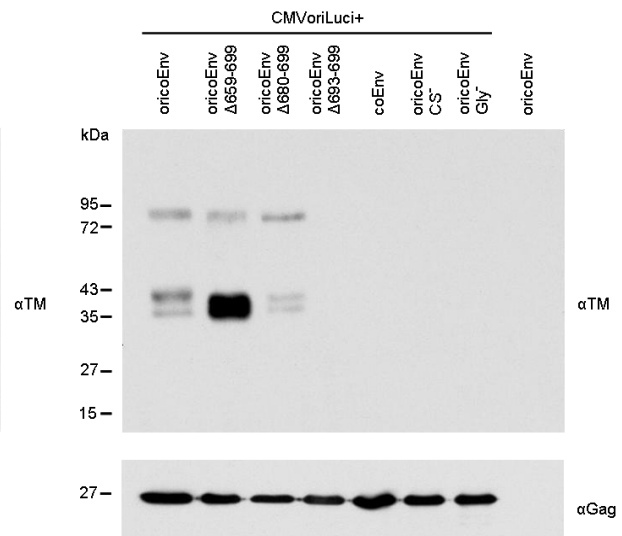


Abbildung 17: Einbau von oricoEnv und C-terminal verkürzten Mutanten in HERV-K-Reporterviren.

CMVoriEGFP, CMVoriGPP, oricoRec und verschiedene Env-Mutanten (oricoEnv, oricoEnv $\Delta_{659-699}$, oricoEnv $\Delta_{680-699}$, oricoEnv $\Delta_{693-699}$, coEnv, oricoEnv_{CS}⁻ und oricoEnv_{Gly}⁻) wurden in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die Zelllysate (A) und die jeweiligen Viren der Zellkulturüberstände (B) wurden durch ein 20 %iges Sucrosekissen mittels Ultrazentrifuge pelletiert und zusammen im Immunoblot analysiert. Die Detektion erfolgte durch einen α TM- und α Gag-spezifischen Antikörper. Wie beim Einbau des am stärksten C-terminal verkürzten oricoEnv $\Delta_{659-699}$ in SHIV-Partikel wird diese Mutante auch in HERVs am besten eingebaut.

Die Ergebnisse des Einbaus von oricoEnv und der C-terminal verkürzten Mutanten in HERVs bestätigen den Einbau der Hüllproteine in SHIV-Viren. Sowohl in lentivirale SHIV und β -retrovirale HERV-K-Partikel konnte gezeigt werden, dass die C-terminal verkürzte Mutante mit 41 fehlenden Aminosäuren, was nahezu dem kompletten zytoplasmatischen Ende entspricht, am besten in virale Partikel eingebaut wird. Das Vollängen oricoEnv und oricoEnv $\Delta_{680-699}$ werden ca. 5-10x schlechter in Partikel inkorporiert, als oricoEnv $\Delta_{659-699}$. Eine Verkürzung des zytoplasmatischen Endes um nur sieben Aminosäuren bewirkt den Verlust von oricoEnv $\Delta_{693-699}$ vollständig prozessiert und sowohl in SHIV als auch in HERV-Partikel eingetragen zu werden.

3.3 Infektiosität des Envs

Nach dem bestätigten Einbau der HERV-K Hüllproteine in retrovirale Partikel ist es nun möglich die Env-Funktionalität und Eigenschaften der Infektiosität zu untersuchen. Hierfür wurden wie für den Env-Einbau mit oricoEnv-Mutanten pseudotypisierte SHIV-Luziferase-Partikel in HEK 293T-Zellen hergestellt. Zellreste der Virus-haltigen Kulturüberstände wurden abfiltriert und die Virustiter anschließend in einem quantitativen Tritium-Assay (siehe 2.2.3.10.2) oder p24Gag-ELISA (siehe 2.2.3.10.1) für die Infektion auf Zielzellen normalisiert. In einem Vorversuch haben sich feline CrFK (Crandell feline kidney)-Zellen im Gegensatz zur humanen 293T-Standardzellline als wesentlich permissiver gegenüber oricoEnv tragenden Reporterviren erwiesen und wurden vorwiegend eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein deletiertes nicht mehr funktionelles HIV-1 Hüllprotein (Δ KS) eingesetzt. Zum Nachweis positiver Infektionen wurden SHIV-Partikel generiert, die das Glykoprotein vom Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) auf der Oberfläche tragen. Das Vesicular Stomatitis Virus weist ein sehr breites Wirtsspektrum auf und ist in der Lage viele verschiedene Zellen unterschiedlicher Spezies und Gewebetypen zu infizieren.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, konnte keine spezifische Infektion mit coEnv oder oricoEnv $\Delta_{693-699}$ pseudotypisierten SHIV-Virionen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu sind mit dem ursprünglichen oricoEnv signifikante Infektionsraten sichtbar, die 100-fach oberhalb des Hintergrundes liegen, welcher mit dem nicht funktionellen HIV-Env Δ KS bestimmt wurde. SHIV-Pseudotypen mit oricoEnv $\Delta_{680-699}$ und oricoEnv $\Delta_{659-699}$ infizieren interessanter Weise sogar um eine bis zwei Zehnerpotenzen besser als das Vollängen oricoEnv.

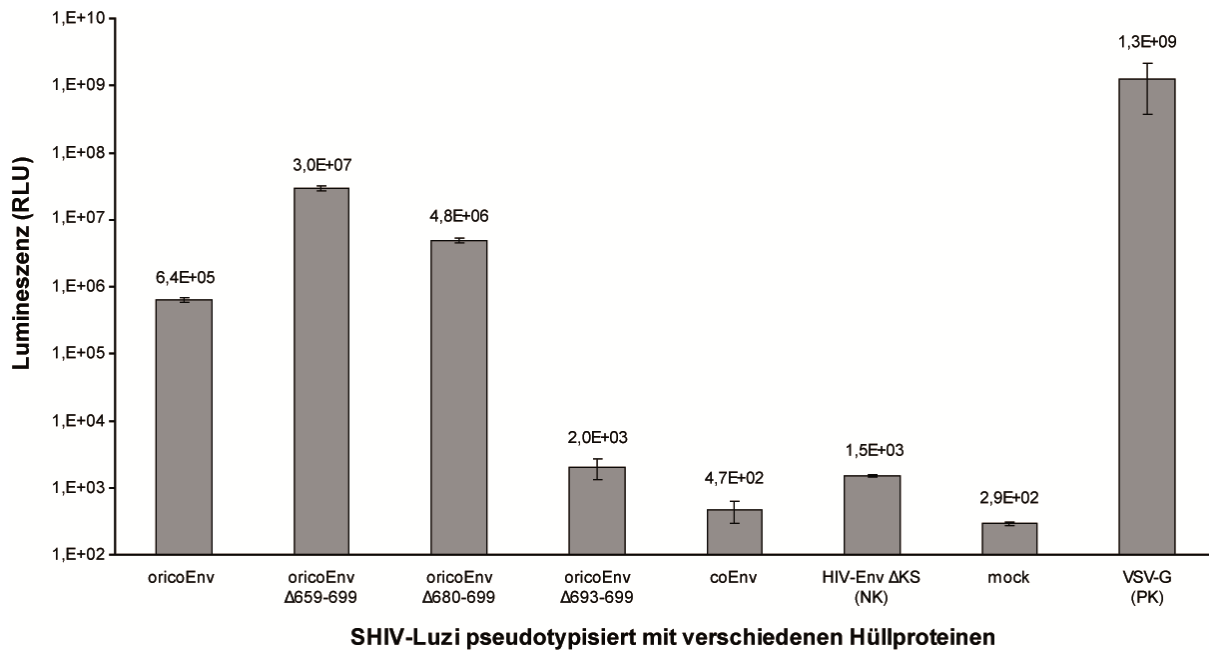


Abbildung 18: Infektiosität von oricoEnv und C-terminal verkürzten Mutanten tragenden SHIV-Luziferase-Reporterviren. Zur Produktion lentiviraler Partikel wurden HEK 293T-Zellen mit einem SHIV-Luziferase-Reporterkonstrukt, HIV-1 Rev und verschiedenen Hüllprotein-Mutanten transfiziert. Die Virionen wurden anschließend normalisiert und zur Infektion auf feline CrFK-Zellen gegeben. 48 h später wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz (in „relative light units“, RLU) im Luziferase-Assay ermittelt. Als Negativkontrolle (NK) zur Bestimmung der Hintergrund-Luziferaseaktivität diente die Infektion mittels eines nicht funktionellen HIV-Envs (Δ KS) und als positive Kontrolle (PK) wurde ein VSV-Glykoprotein eingesetzt. Das am stärksten verkürzte oricoEnv Δ ₆₅₉₋₆₉₉ vermittelt SHIV-Partikeln den besten Eintritt in CrFK-Zellen.

Pseudotypen, die im Gegensatz zum Luziferase- ein GFP-Gen exprimieren, wurden in parallelen Experimenten eingesetzt und nach anschließender Infektion von CrFK-Zellen mittels FACS analysiert (siehe 2.2.3.8). Die Infektionsraten der SHIV-GFP-Virionen konnte durch Viruspelletierung mittels Ultrazentrifugation noch wesentlich gesteigert werden. Wie in Abbildung 19 dargestellt, weisen über die Hälfte der gemessenen Zellen nach Infektion mit oricoEnv Δ ₆₅₉₋₆₉₉ tragenden Pseudotypen eine grün fluoreszierende Markierung auf. Der Zelleintritt mit oricoEnv Δ ₆₈₀₋₆₉₉ pseudotypisierten Viren erfolgt bei 8,3 % und des ursprünglichen oricoEnvs nur bei 2,4 % aller gemessenen Zellen. Jedoch sind die Infektionsraten deutlich höher gegenüber coEnv oder oricoEnv Δ ₆₉₃₋₆₉₉ tragenden SHIV-Virionen, für welche keinerlei spezifische Infektiosität gezeigt werden konnte.

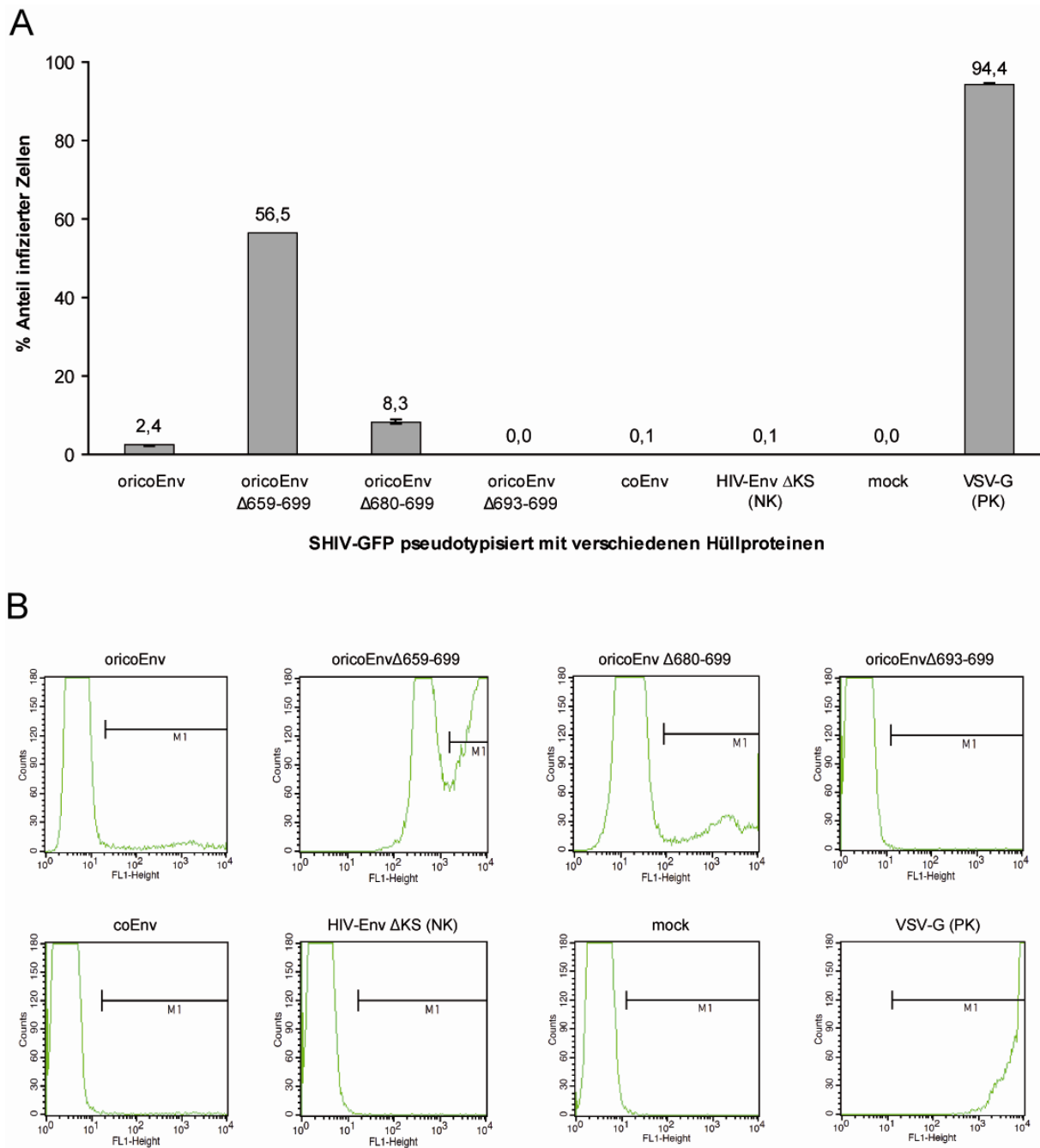


Abbildung 19: Infektiosität von oricoEnv und C-terminal verkürzten Mutanten tragenden SHIV-GFP-Reporterviren. Zur Produktion lentiviraler Partikel wurden HEK 293T-Zellen mit einem SHIV-GFP-Reporterkonstrukt, HIV-1 Rev und verschiedenen Hüllprotein-Mutanten transfiziert. Die Virionen wurden anschließend normalisiert und zur Infektion auf feline CrFK-Zellen gegeben. 48 h später wurden die Zellen fixiert, die Fluoreszenz durch FACS ermittelt und im Diagramm (A) aufgeführt. Die FACS-Analyse der Infektion einer jeweiligen Hüllprotein-Mutante ist in (B) dargestellt. Ein nicht funktionelles HIV-Env Protein (Δ KS) diente als Negativkontrolle (NK). Die Positivkontrolle (PK) mit VSV-G pseudotypisierten Virionen war in der Lage nahezu alle CrFK-Zielzellen zu infizieren. Gegenüber dem Vollängen oricoEnv ermöglicht die am stärksten verkürzte C-terminale oricoEnv Δ ₆₅₉₋₆₉₉-Mutante den besten Zelleintritt von SHIV-GFP-Virionen.

Zu niedrige Virustiter stellten ein großes Problem bei der Untersuchung von Infektionen durch pseudotypisierte HERV-K Partikel dar. Um die Herstellung von HERV-K Virionen zu steigern wurde wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben ein codonoptimiertes CMVoricoGPP co-transfiziert, welches genetische Informationen zur Bildung von Gag, Pro und Pol enthält. Jedoch besitzt dieses Konstrukt weder eine HERV-K 5'LTR mit Verpackungssignal noch ist es in der Lage Env zu bilden oder Infektionen durch ein Reporter-gen zu detektieren. Hierfür wurden HEK 293T-Zellen zusätzlich mit CMVoriLuci, Env und Rec-Expressionsvektoren transfiziert. In der Abbildung 20 ist ein Vorversuch dargestellt, bei dem HERV-K-Luziferase Virionen mit VSV-G pseudotypisiert und anschließend CrFK-Zellen damit infiziert wurden. Zur Produktion der optimalen Virustiter wurden die Zellen mit unterschiedlichen Verhältnissen von CMVoriLuzi und CMVoricoGPP transfiziert. Der oricoRec-Vektor wurde immer in gleichen Mengen, wie das CMVoricoGPP hinzugegeben. Als Hüllprotein wurde 1 µg VSV-G co-transfiziert und als Negativkontrolle 1 µg von HIV-Env ΔKS verwendet. Nach Ultrazentrifugation der Viruspellets wurden sie über die reverse Transkriptase in einem quantitativen Cavid-Assay (siehe 2.2.3.10.3) normalisiert und zur Infektion auf CrFK-Zellen gegeben.

Wie in der Abbildung 20 zu erkennen, steigt die Luziferaseaktivität bis zu einem Verhältnis von vier zu eins (CMVoriLuzi zu CMVoricoGPP) deutlich an. Werden größere CMVoriLuzi-Mengen und weniger CMVoricoGPP transfiziert, sinkt die Anzahl infektiöser Viren jedoch wieder. Das Optimum zur Herstellung reifer HERV-K-Reporterviren liegt also in dem Verhältnis von vier Teilen CMVoriLuzi zu einem Teil CMVoricoGPP. Dieses am besten geeignete Transfektionsverhältnis wurde für alle weiteren Infektionsversuche mit HERV-Virionen eingesetzt.

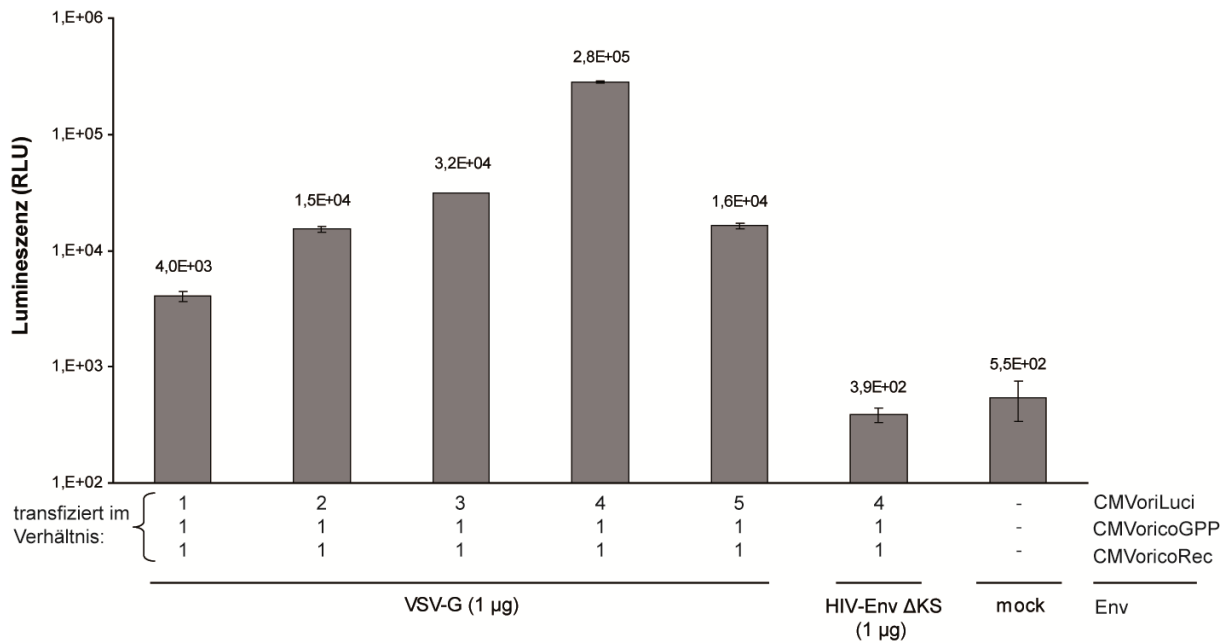


Abbildung 20: Herstellung optimaler HERV-K-Virustiter für Infektionsversuche. HEK 293T-Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit CMVoriLuzi und CMVoricoGPP transfiziert. Der oricoRec-Vektor wurde in gleichen Mengen wie CMVoricoGPP hinzugegeben. Zusätzlich wurde 1 µg VSV-Glykoprotein co-transfiziert und als negative Kontrolle diente HIV-Env ΔKS. Im quantitativen Cavid-Assay normalisierte Virionen wurden zur Infektion auf native CrFK-Zellen gegeben, nach 48 h die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Das optimale Transfektionsverhältnis zwischen CMVoriLuzi und CMVoricoGPP liegt bei vier zu eins (Lumineszenz in „relative light units“, RLU).

Nun war es auch möglich die Infektiosität von Pseudotypen zu testen, die nicht das stark fusogene Glykoprotein vom Vesicular Stomatitis Virus tragen, sondern das Env-Protein von HERV-K113. In HEK 293T-Zellen wurden mit den bekannten Plasmidverhältnissen pseudotypisierte HERV-Luziferase-Reporterviren hergestellt, die die bereits im lentiviralen SHIV-System getesteten Env-Mutanten tragen. Für Infektionsversuche wurden die Viren per Ultrazentrifugation konzentriert und im Cavid-Assay anschließend quantifiziert. Mit normalisierten HERV-Pseudotypen wurden naive CrFK-Zellen infiziert und nach 48 h die Luziferaseaktivität infizierter Zellen gemessen.

Mit HERV-Virionen, die coEnv, oricoEnv-CS⁻ oder oricoEnv-Gly⁻-Mutanten auf ihrer Oberfläche tragen, konnten keine spezifischen Infektionen detektiert werden (Abbildung 21). Im Gegensatz dazu vermittelt das ursprüngliche oricoEnv, die trunkierten Mutanten oricoEnvΔ₆₅₉₋₆₉₉, oricoEnvΔ₆₈₀₋₆₉₉ und oricoEnvΔ₆₉₃₋₆₉₉ eine deutliche Infektion in CrFK-Zellen. Eine bis drei Zehnerpotenzen höhere Luziferaseaktivität konnte gegenüber der Negativkontrolle, bestimmt durch HIV-Env ΔKS, gemessen werden. Pseudotypen mit

oricoEnv $\Delta_{659-699}$ sind in der Lage am besten den Eintritt in die Zielzelle zu gewährleisten. Das Volllänge oricoEnv und die verkürzte oricoEnv $\Delta_{680-699}$ -Mutante infizieren CrFK-Zellen um den Faktor zwei schlechter als oricoEnv $\Delta_{659-699}$. Jedoch sind auch schwache Infektionen mit der sieben Aminosäure fehlenden Mutante oricoEnv $\Delta_{693-699}$ messbar, was bei SHIV-Pseudotypen nicht der Fall war.

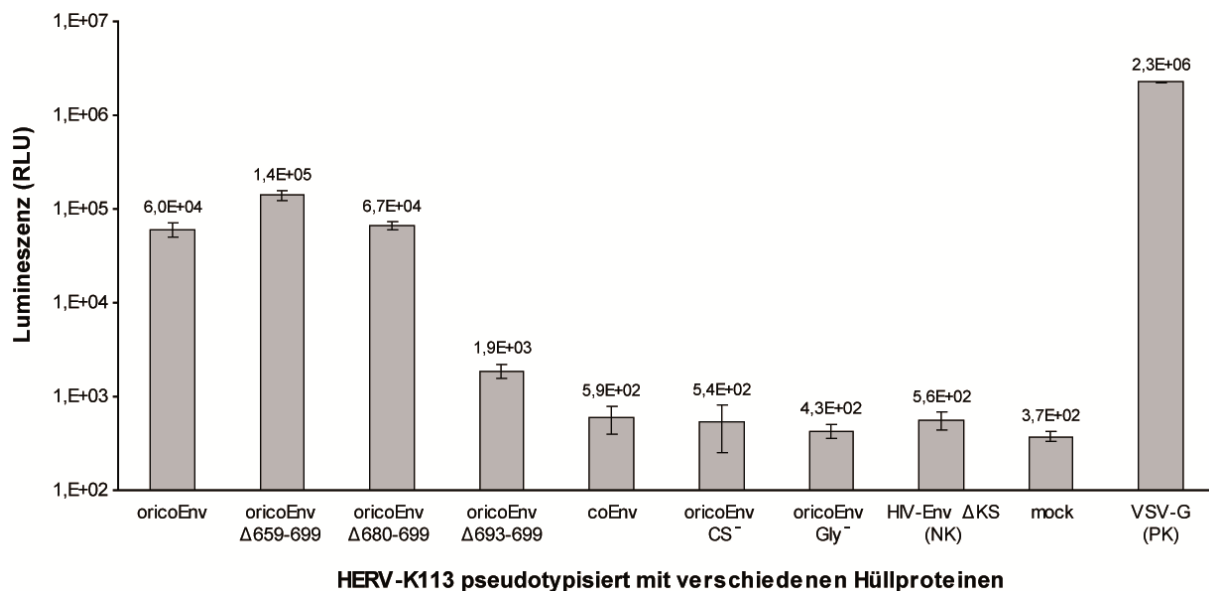


Abbildung 21: Infektiosität von oricoEnv und C-terminal verkürzten Mutanten tragenden HERV-Luziferase-Reporterviren. Zur Produktion von Viruspartikeln wurden HEK 293T-Zellen mit einem HERV-Luziferase-Reporterkonstrukt (CMVoriLuzi), CMVoricoGPP, oricoRec und verschiedenen Hüllprotein-Mutanten transfiziert. Die Virionen wurden anschließend normalisiert und zur Infektion auf feline CrFK-Zellen gegeben. 48 h später wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz (in „relative light units“, RLU) im Luziferase-Assay ermittelt. Als Negativkontrolle (NK) zur Bestimmung der Hintergrund-Luziferaseaktivität diente die Infektion mittels eines nicht funktionellen HIV-Envs (Δ_{KS}) und als positive Kontrolle (PK) wurde ein VSV-Glykoprotein eingesetzt. Das am stärksten verkürzte oricoEnv $\Delta_{659-699}$ vermittelt HERV-Partikeln den besten Eintritt in CrFK-Zellen.

Zusammenfassend konnte die Wiederherstellung eines funktionellen HERV-K oricoEnvs gezeigt werden, welches vollständig gefaltet in retrovirale Partikel eingebaut wird, fusogene Eigenschaften besitzt und die Infektion einer Zielzelle herbeiführt. Die extreme Verkürzung des zytoplasmatischen Hüllprotein-Endes um 41 Aminosäuren führt zu einem verbesserten Einbau in lentivirale, wie auch β -retrovirale HERV-Partikel. Durch den verstärkten Einbau konnte auch eine erhöhte Infektiosität dieser Virionen gegenüber dem ursprünglichen oricoEnv gezeigt werden. Die C-terminale Deletion von nur sieben Aminosäuren bewirkt jedoch in der oricoEnv $\Delta_{693-699}$ -Mutante eine fehlerhafte Prozessierung in die SU- und TM-

Untereinheiten, sowie eine Blockierung in den Partikeleinbau (Abbildung 14 und Abbildung 17). OricoEnv $\Delta_{693-699}$ tragende SHIV-Pseudotypen vermitteln keine Infektionen und auch HERV-Reporterviren mit eingebautem oricoEnv $\Delta_{693-699}$ vermitteln nur sehr schwachen Zelleintritt (Abbildung 18 und Abbildung 21). Im Vergleich bestätigen die Infektionsversuche mit HERV-K-Reporterviren die mit verschiedenen Envs pseudotypisierten SHIV-Versuche. Jedoch sind die gemessenen Luziferaseaktivitäten im SHIV-System um zwei Zehnerpotenzen höher, als im HERV-Reportersystem, was durch höhere Virustiter begründet ist.

3.4 Tropismusuntersuchung

Es war anzunehmen, dass HERV-K113 als humanes endogenes Virus befähigt ist menschliche Zellen zu infizieren und diese somit das spezifische Rezeptormolekül exprimieren. Die interessante Entdeckung vorangehender Experimente mit Katzenzellen zeigte jedoch, dass diese für Infektionen mit HERV-K113 Env pseudotypisierten Viren viel permissiver sind. Die folgende Tropismusuntersuchung soll nun klären, welche verschiedenen Zellen unterschiedlicher Spezies und Gewebetypen mittels Hüllprotein von HERV-K113 infiziert werden können. Die Aufklärung des HERV-K(HML-2) spezifischen Tropismus ist ein wichtiger Schritt zur Rezeptoridentifizierung und soll Hinweise darüber liefern, welche Zellen den Rezeptor besonders stark oder überhaupt nicht exprimieren.

Große Titer von SHIV-Luziferase-Reporterviren wurden dafür in HEK 293T-Zellen hergestellt (siehe 2.2.2.7.2.1). Die Pseudotypen der Tropismusuntersuchung tragen das am stärksten verkürzte und am besten eingebaute oricoEnv $\Delta_{659-699}$, welches von allen oricoEnv-Mutanten die höchsten Infektionsraten zeigt. Parallele Infektionen wurden mit pseudotypisierten SHIVs durchgeführt, die das nicht funktionelle HIV-Env Δ KS und als Positivkontrolle das funktionsfähige VSV-G trugen. Die Virusüberstände wurden von Zellresten gereinigt und im Tritium-Assay (siehe 2.2.3.10.2) quantitativ bestimmt. 34 verschiedene Zelllinien aus zehn unterschiedlichen Spezies wurden in ihrem jeweils spezifischen Kultivierungsmedium (siehe 2.2.2.3) ein bis zwei Mal passagiert, in 24-Well Platten in einer Konfluenz von 60 % am Tag der Infektion ausgesät und anschließend mit pseudotypisierten SHIVs infiziert. 48 h nach Virenzugabe wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenzen im Luziferase-Assay bestimmt. Die Hintergrund-Luziferaseaktivität jeder ermittelten Zelllinie, bestimmt durch HIV-Env Δ KS Pseudotypen, wurde von

oricoEnv $\Delta_{659-699}$ - und VSV-G-Infektionen abgezogen. Um zwischen einer intrazellulären Blockierung der Replikation zu einer späteren Phase des Infektionszykluses von SHIV nach erfolgtem Zelleintritt zu differenzieren wurden die Luziferasewerte der oricoEnv $\Delta_{659-699}$ Pseudotypen jeder einzelnen Zelllinie mit der dazugehörigen Infektion mit VSV-G tragenden Partikeln, wie in der Formel 1 zu erkennen, verrechnet.

$$\text{Relative oricoEnv}\Delta_{659-699} = \frac{(\text{oricoEnv}\Delta_{659-699} - \Delta\text{KS})}{(\text{VSV G} - \Delta\text{KS})} * 10^5$$

Formel 1: Relative SHIV oricoEnv $\Delta_{659-699}$ Infektionen verglichen mit Infektionsraten von VSV-G Pseudotypen.

Das Glykoprotein vom VSV weist ein sehr breites Wirtsspektrum auf, aber die damit pseudotypisierten SHIV-Partikel unterliegen nach Infektion der Zielzelle denselben Faktoren der antiviralen Wirtsabwehr, wie oricoEnv $\Delta_{659-699}$ tragende SHIV-Virionen. So inhibiert z. B. der retrovirale Restriktionsfaktor Trim5 α (tripartite motif protein 5 alpha) die Replikation von HIV oder auch SIV in der Wirtszelle [Perez-Caballero *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Song, 2009]. Die relativen oricoEnv $\Delta_{659-699}$ Infektionstiter verglichen mit VSV-G vermittelten Zelleintritt jeder Zelllinie sind in der Abbildung 22 dargestellt.

Die relativen Infektionsraten der vielen verschiedenen Zelllinien variieren zum Teil stark. Jedoch ist in der Regel der Unterschied zwischen oricoEnv $\Delta_{659-699}$ und VSV-G pseudotypisierten Virionen konstant. Je höher die VSV-G Infektionstiter sind, desto stärker sind auch die Luziferaseaktivitäten durch oricoEnv $\Delta_{659-699}$ pseudotypisierte SHIVs. Infektionstiter von VSV-G Pseudotypen sind durchweg höher als die von oricoEnv $\Delta_{659-699}$. Die Luziferaseexpression zeigt aber, dass die meisten der in Abbildung 22 aufgeführten Zelltypen permissiv gegenüber oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -tragenden SHIV-Partikeln sind. So lassen sich auch verschiedene Spezies, wie z. B. humane A549- und CaCo2-, simiane Cos-7-, porcine PK15- oder feline FEA-Zelllinien gut durch oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infizieren. Dies demonstriert den breiten zellulären Tropismus vermittelt durch das HERV-K113 Hüllprotein. Eine Ausnahme dabei stellen die Meerschweinchenzellen 104C1 dar, welche nicht permissiv gegenüber oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Infektionen sind. Auch innerhalb der humanen Spezies zeigen sich drastische Unterschiede innerhalb der Infektiosität verschiedener Gewebetypen. Die Hep-2 Kehlkopf- und die Makrophagen THP-1-Zelllinie konnten nicht mittels oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infiziert werden und sind ebenfalls mit einem * in der Abbildung 22 markiert.

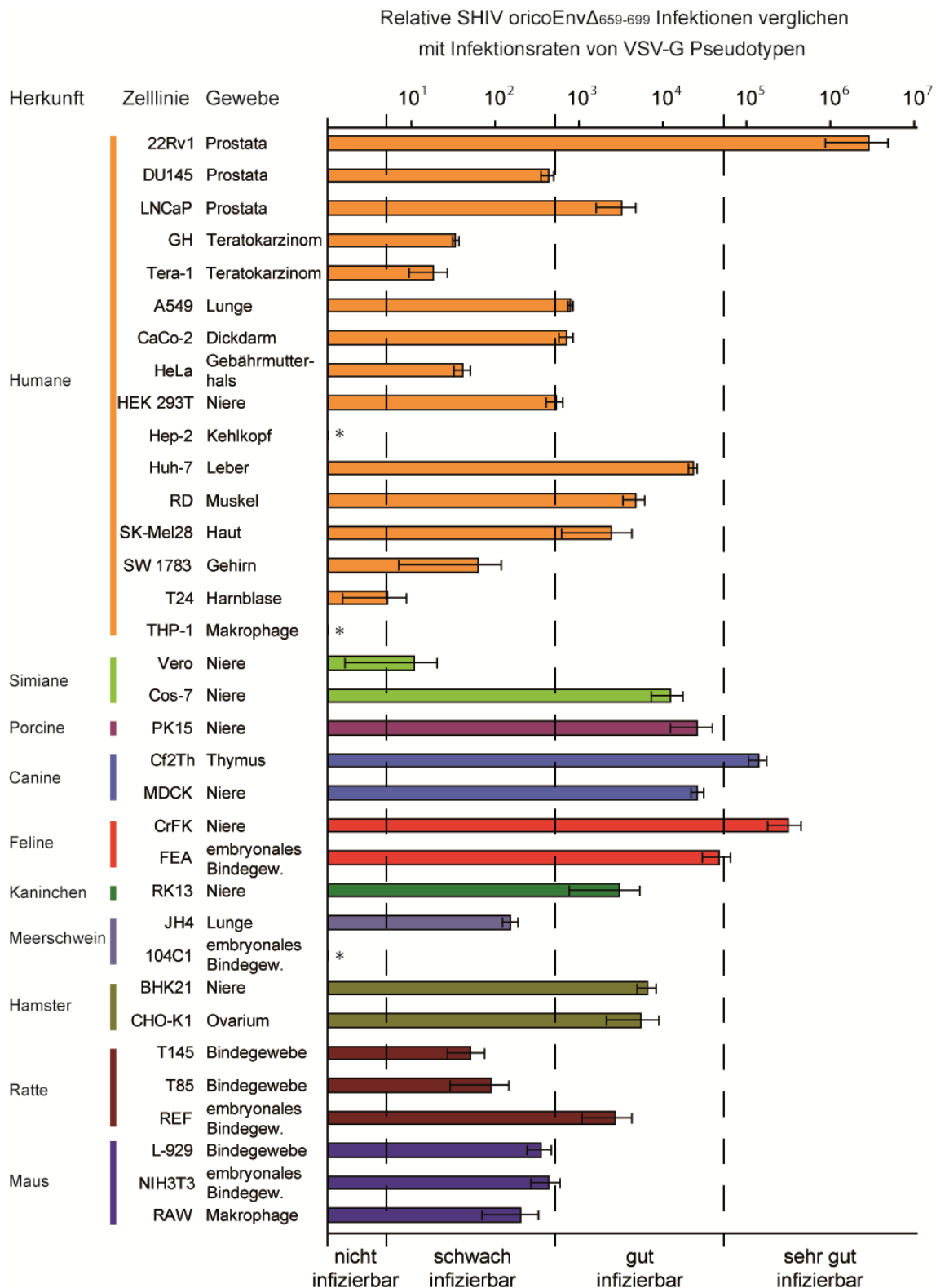


Abbildung 22: Relativer Zelltropismus von oricoEnv $\Delta_{659-699}$ SHIV-Luziferase-Pseudotypen.

34 verschiedene Zelllinien aus 10 unterschiedlichen Spezies und verschiedenen Geweben wurden mit HIV-1 Env Δ KS-, oricoEnv $\Delta_{659-699}$ - und VSV-G tragenden SHIV-Luziferase-Partikeln infiziert. Die relativen oricoEnv $\Delta_{659-699}$ Infektionstiter verglichen mit VSV-G vermittelten Zelleintritt sind dargestellt. Die unspezifischen Luziferasewerte, ermittelt durch HIV-1 Env Δ KS-Infektionen wurden zuvor abgezogen. Zelllinien, die nicht permissiv gegenüber oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen sind, wurden mit einem * markiert.

Demgegenüber sind die humanen Zelllinien Huh-7 (Leber), LNCap (Prostata), RD (Muskel) und HEK 293T (Niere) relativ gut infizierbar. Humane Keimzellen, wie z. B. die Zelllinien GH oder Tera-1 lassen sich wiederum signifikant schlechter mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infizieren.

Eine Ausnahme stellt die humane Prostata-Zelllinie 22Rv1 dar, die unter allen getesteten Zelllinien die stärksten relativen oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Infektionstiter aufweist. Jedoch konnte kürzlich bei dieser Prostatakarzinom-Zelllinie gezeigt werden, dass sie große Titer des humanen Retrovirus XMRV (*Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus*) exprimiert [Knouf *et al.*, 2009]. Die caninen Thymuszellen Cf2Th und feline Nierenzelllinie CrFK sind nach der XMRV-produzierenden humanen 22Rv1-Zelllinie am stärksten permissiv gegenüber oricoEnv $\Delta_{659-699}$ tragenden Virionen. Sie lassen sich über zwei Zehnerpotenzen besser als humane HEK 293T-Zellen durch oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infizieren. Die Messung möglicher retroviraler RT-Aktivitäten im Zellkulturüberstand war negativ und auch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten keine Hinweise endogener oder exogener Retroviren innerhalb dieser beiden Zelllinien.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Cf2Th- und CrFK-Zellen gegenüber HERV-K113 Env pseudotypisierten Partikeln äußerst permissiv sind und somit das spezifische Rezeptormolekül in großen Mengen an der Zelloberfläche exprimiert wird. HERV-K113 besitzt jedoch eine amphotrope Wirtsspezifität und kann viele verschiedene Zellen unterschiedlicher Spezies infizieren. Eine Gewebespezifität ist für HERV-K113 nicht erkennbar. Durch die Tropismusuntersuchung ist es nun möglich mittels den äußerst empfänglichen feline oder caninen Zellen die Identifikation potentieller HERV-K113 spezifischer Rezeptormoleküle zu beginnen. Ein weiterer wichtiger Schritt des zellulären Tropismus von HERV-K113 ist auch die Aufklärung nicht permissiver Zelllinien, wie die humane Hep-2, THP-1 oder die Meerschweinchenzelllinie 104C1. Diese können später zur Überprüfung möglicher Oberflächenproteine aus permissiven Zellen dienen.

3.5 Rezeptoruntersuchung

Der Eintritt von Retroviren in Zellen wird durch die Interaktion des retroviralen Hüllproteins mit dem spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle vermittelt. Für nahe verwandte Retroviren, wie das *Jaagsiekte Sheep Retrovirus* (JSRV) und *Enzootic Nasal Tumor Virus* (ENTV) konnte gezeigt werden, dass diese identische Rezeptormoleküle für den Zelleintritt benutzen. Auch retrovirale Hüllproteine, die eine hohe Aminosäureidentität aufweisen (siehe Abbildung 7), wie das vom *Gibbon Ape Leukemia Virus* (GALV) und dem *Feline Leukemia Virus Typ B* (FeLV-B), verwenden zum Beispiel den Phosphat Transporter Pit1, als gemeinsames Rezeptorprotein. Aus diesem Grund sollen potentielle Rezeptormoleküle, die bereits von nahe verwandten β -Retroviren wie dem *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) oder JSRV verwendet werden auf mögliche Infektiosität von HERV-K113 getestet werden. Besonders die aus der Tropismusstudie sehr gut mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infizierbaren CrFK- und Cf2Th-Zellen müssen bekanntlich den HERV-K113 Rezeptor exprimieren.

Der Transferrin Rezeptor 1 (TfR1 oder auch: CD71, TFRC; Gene ID: 7037), das spezifische Rezeptormolekül von MMTV, wurde aus der cDNA von humanen und den sehr gut permissiven feline CrFK-Zellen mittels spezifischer Primer heraus amplifiziert. Auf die gleiche Weise erfolgte die Gewinnung des Rezeptors für JSRV, der Hyaluronidase 2 (Hyal2; Gene ID: 8692), aus der ebenfalls äußerst empfänglichen caninen Cf2Th-Zelllinie. Anschließend wurden die amplifizierten Rezeptorgene in einen pcDNA3-Expressionsvektor kloniert und zur Detektion mit einem C-terminalen V5-Tag versehen. Zusätzlich wurden aus anderen Laboren der murine TfR1 und die humane Hyal2 zur Verfügung gestellt, für die die Funktion als jeweiliges spezifisches Rezeptormolekül für MMTV und JSRV bereits gezeigt werden konnte [Dirks *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002].

Eine codonoptimierte und V5-gekoppelte Version des MMTV- (Stamm C3H; ID: AAF31475) und JSRV- (Stamm JS7; Y18301) Hüllproteins wurde von der Firma Genescript hergestellt und soll in Pseudotypisierungsexperimenten als Positivkontrolle dienen.

3.5.1 Expression der Rezeptoren, MMTVcoEnv und JSRVcoEnv

Eine starke Expression der MMTV- und JSRV-Hüllproteine, sowie der TfR1- und Hyal2-Rezeptoren ist die Voraussetzung zur HERV-K113 Rezeptoruntersuchung. HEK 293T-Zellen wurden dafür mit oricoEnv_V5, MMTVcoEnv_V5, JSRVcoEnv_V5 und pcDNA3-Leervektor transfiziert. 48 h später wurden die Proteine mit einem α V5-Cy3 Antikörper gefärbt und mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops (cLSM) detektiert. Zelllysate paralleler Transfektionen wurden dazu verwendet die verschiedenen retroviralen Hüllproteine mittels eines α V5-HRP Antikörpers im Western Blot zu untersuchen.

Wie erwartet ist das oricoEnv Protein in der zweiten Spur in Abbildung 23A mit seinem 95 kDa Vorläufer und 43 kDa transmembranen Untereinheit zu erkennen. Eine schwache Bande des unglykosylierten Vorläuferproteins von oricoEnv befindet sich bei 72 kDa.

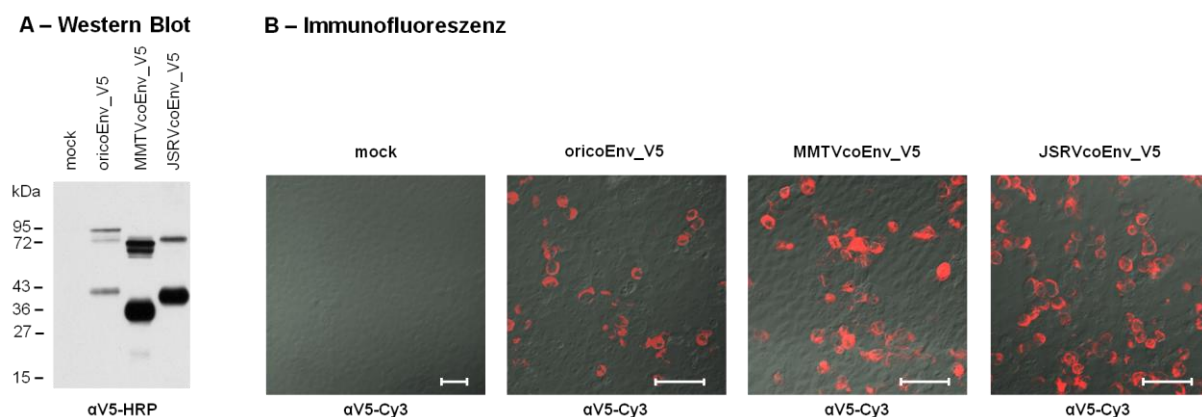


Abbildung 23: Expression verschiedener retroviraler Hüllproteine. HEK 293T-Zellen wurden mit oricoEnv_V5, MMTVcoEnv_V5, JSRVcoEnv_V5 und pcDNA3-Leervektor transfiziert. Die Hüllproteine wurden 48 h später mittels α V5-HRP Antikörper im Western Blot detektiert (A) oder parallele Transfektionen durch einen α V5-Cy3 Fluoreszenzantikörpers markiert und anschließend im cLSM untersucht (B). Sowohl im Immunoblot als auch der Immunofluoreszenz ist die Expression der codonoptimierten Hüllproteine deutlich zu erkennen. Die Größeneinheit des weißen Balkens misst 50 μ m.

Das MMTV- und JSRVcoEnv wird ebenfalls sehr gut und im Verhältnis zu oricoEnv sogar um den Faktor zehn Mal stärker in HEK 293T-Zellen exprimiert. Beide retroviralen Hüllproteine werden außerdem in ihre beiden Untereinheiten prozessiert, denn der C-terminale V5-Tag ermöglicht es neben dem Vorläuferprotein auch das TM zu detektieren. Das TM von MMTVcoEnv weist eine Größe von 36 kDa auf und das ungespaltene Vorläuferprotein befindet sich bei 72 kDa. Das JSRVcoEnv wird von allen untersuchten Envs

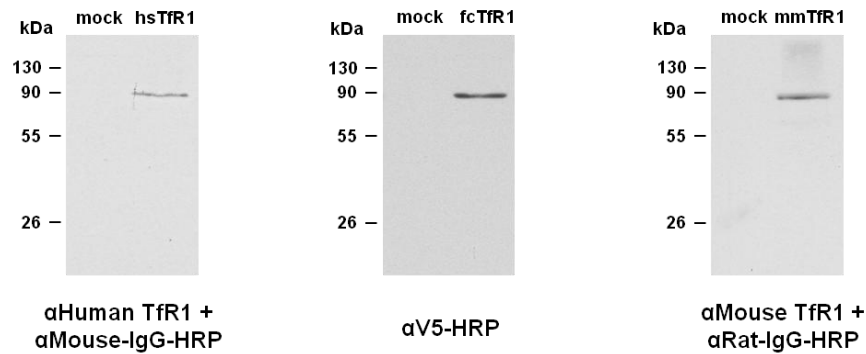
am besten prozessiert, was an der geringen Menge des Vorläuferproteins bei 73 kDa zu sehen ist. Die Bande der transmembranen Untereinheit ist dagegen sehr stark und liegt auf der Höhe von 39 kDa. Auch bei MMTVcoEnv ist ein Vorläufer-Duplett detektierbar, wobei es sich wahrscheinlich bei der tiefer gelegenen Bande um ein unglykosyliertes Vorläuferprodukt handelt. Die Immunofluoreszenz der transfizierten HEK 293T-Zellen in Abbildung 23B zeigt eine nahezu identische Expression des MMTVcoEnvs und JSRVcoEnvs, wohingegen oricoEnv etwas schwächer exprimiert wird. Die mittels Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern detektierten Hüllproteine sind nach Permeabilisierung der Zellen im gesamten Zytoplasma sichtbar.

Die Vektoren des *Homo sapiens*- (hsTfR1), *Felis catus*- (fcTfR1), *Mus musculus* Transferrin Rezeptors 1 (mmTfR1) und ein Leerplasmid wurden in HEK 293T- oder CrFK-Zellen transfiziert. 48 h später wurden die HEK 293T-Zellen lysiert und die Proteine im Western Blot analysiert. Die TfR1-Proteine in CrFK-Zellen wurden mit Fluoreszenzantikörpern detektiert und im Anschluss im cLSM untersucht.

Wie in der Abbildung 24A zu erkennen, werden alle Transferrin Rezeptoren 1 der drei verschiedenen Spezies exprimiert und befinden sich bei einer Größe von 90 kDa. Die Immunofluoreszenz der Abbildung 24B zeigt, dass der humane-, feline- und murine TfR1 in großen Mengen in der Zelle exprimiert wird.

Transferrin Rezeptor 1 (TfR1)

A – Western Blot



B – Immunofluoreszenz

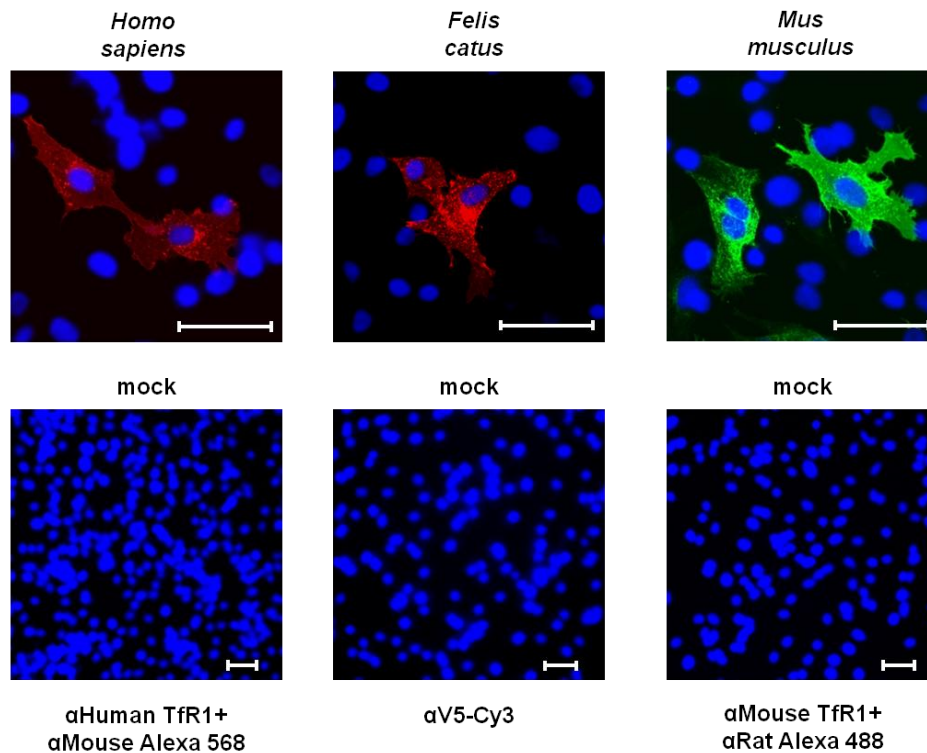


Abbildung 24: Expression des Transferrin Rezeptors 1 (TfR1). HEK 293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren des humanen-, feline-, murinen TfR1 und einem Leervektor transfiziert. Die Zellysate wurden im Western Blot mittels α Human TfR1, α V5-HRP oder α Mouse TfR1-Antikörpers detektiert (A). Für Immunofluoreszenzexperimente wurden dieselben Vektoren in CrFK-Zellen transfiziert, mit Fluoreszenzantikörpern markiert und im cLSM untersucht. Zusätzlich wurden Zellkerne mit DAPI detektiert (B). Sowohl im Immunoblot als auch der Immunofluoreszenz ist die Expression der humanen, feline- und murinen Transferrin Rezeptoren 1 deutlich sichtbar. Mit Leervektor transfizierte Zellen weisen keine Signale auf. Die Immunofluoreszenz zeigt, dass die markierten Rezeptoren in großen Konzentrationen in der Zelle exprimiert werden. Die Größeneinheit des weißen Balkens entspricht 50 μ m.

Die Hyaluronidase 2 von *Canis familiaris* (cfHyal2), *Homo sapiens* (hsHyal2) und ein Leervektor wurde in HEK 293T-Zellen transfiziert. Zelllysate wurden im Western Blot und parallel transfizierte Zellen in der Immunofluoreszenz untersucht. Zur Detektion der verschiedenen Hyal2-Rezeptoren diente derselbe α Hyal2-Antikörper. Der Immunoblot der Abbildung 25A zeigt eine spezifische 55 kDa Bande der caninen und humanen Hyaluronidase 2. Nach längerer Exposition der Western Blot-Membran erscheint auch in der ersten Spur der mit Leervektor transfizierten HEK 293T-Zelllysate eine schwache spezifische Hyal2-Bande bei 55 kDa, die die geringe Expression zelleigener Hyaluronidase 2 darstellt. In der Abbildung 25B sind die Immunofluoreszenz Antikörper-gekoppelten Rezeptorproteine durch leuchtend rote Signale sichtbar. Die cfHyal2- und hsHyal2-Plasmide werden beide in HEK 293T-Zellen sehr stark überexprimiert.

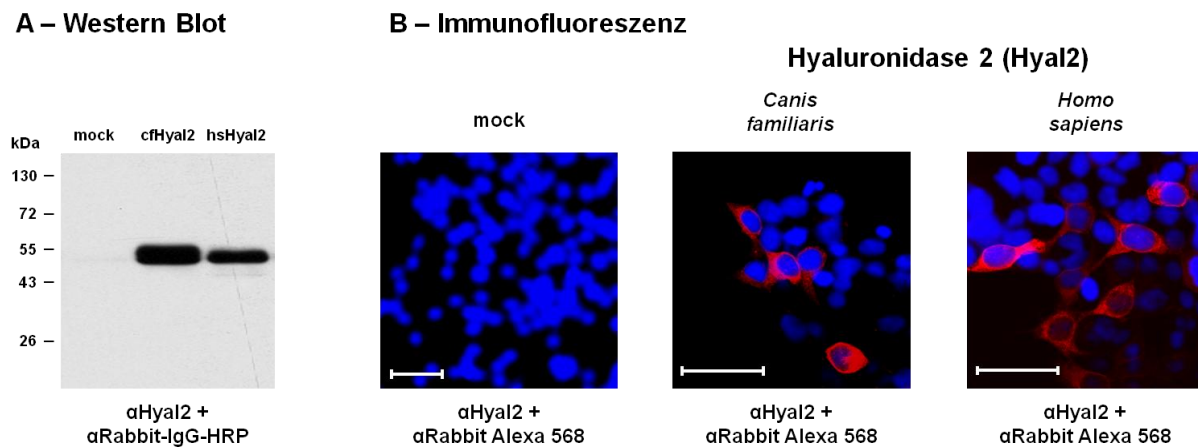


Abbildung 25: Expression der Hyaluronidase 2 (Hyal2). HEK 293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren der caninen-, humanen Hyal2 und einem Leervektor transfiziert. Die Zelllysate wurden im Western Blot mittels α Hyal2-Antikörpers detektiert (A) oder parallele Transfektionen durch einen α Hyal2 + α Rabbit Alexa 568-Fluoreszenzantikörpers markiert und anschließend im cLSM untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen (B). Die Expression der caninen- und humanen Hyal2 ist sowohl im Immunoblot als auch der Immunofluoreszenz deutlich zu erkennen. Die Immunofluoreszenz zeigt, dass die markierten Hyal2-Rezeptoren sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma lokalisiert sind. Die Größeneinheit des weißen Balkens entspricht 50 μ m.

Zusammenfassend konnte eine sehr starke Expression der codonoptimierten Hüllproteine von MMTV und JSRV sowie der TfR1- und Hyal2-Rezeptoren gezeigt werden. Die Immunofluoreszenzen von TfR1 und Hyal2 zeigten hohe Konzentrationen der markierten Rezeptormoleküle und lassen vermuten, dass die Moleküle auch zur Zelloberfläche transportiert werden, um ihre potentielle Funktion als Rezeptorprotein wahrzunehmen.

3.5.2 Einbau in retrovirale Partikel

Als nächstes soll geklärt werden, ob die MMTV- und JSRV-Envs neben einer hohen Expression auch in SHIV-Partikeln eingebaut werden. Hierzu wurden HEK 293T-Zellen mit lentiviralen SHIV-Vektoren und verschiedenen β -retroviralen Hüllproteinen, die zur Detektion einen C-terminalen V5-Tag besitzen, transfiziert. Neben den bereits untersuchten Hüllproteinen coEnv und oricoEnv wurden nun zusätzlich MMTVcoEnv, JSRVcoEnv und ein nicht mehr funktionelles MMTVcoEnvF138A auf die Integration in die Virusmembran geprüft. Bei MMTVcoEnvF138A wurde die Rezeptorbindungsdomäne durch eine Mutation von Phenylalanin zu Alanin an der Aminosäureposition 138 eliminiert [Zhang *et al.*, 2003]. Die Zellysate und ultrazentrifugierten Virusüberstände wurden im Immunoblot mittels α V5- und SIV-Gag-spezifischen Antikörper analysiert und sind in der Abbildung 26 dargestellt.

Es fällt auf, dass die Prozessierung des Vorläuferproteins von MMTV und JSRV in seine beiden Untereinheiten wesentlich effizienter erfolgt, als bei co- oder oricoEnv. Die Zellysate der Abbildung 26A weisen bei JSRVcoEnv nur ein sehr schwaches bis gar kein Vorläuferprodukt bei 73 kDa auf, wohingegen coEnv und oricoEnv jeweils stärkere ungeschnittene Vorläufer bei 95 und 72 kDa aufweisen, als prozessierte TM-Banden. Das MMTVcoEnv wird wie die nicht mehr funktionelle MMTVcoEnvF138A-Mutante innerhalb von HEK 293T-Zellen exprimiert, jedoch etwas schlechter in SU und TM prozessiert. Die Abbildung 26B der Viruspellets zeigt den deutlichen Einbau von oricoEnv, MMTVcoEnv, MMTVcoEnvF138A und JSRVcoEnv in lentivirale SHIV-Partikel. Wie zu erwarten konnte keine Inkorporation von coEnv in SHIVs detektiert werden. In der Spur sechs von JSRVcoEnv ohne Plasmidvektoren zur Herstellung pseudotypisierter SHIVs ist ebenfalls eine sehr schwache spezifische TM-Bande bei 39 kDa zu sehen, die wahrscheinlich nur unvollständig aufgereinigte Zellkulturüberstände mit abzentrifugierten Zelltrümmern darstellen. In der weiteren Spur der Negativkontrolle von pcDNA3-Leervektor transfizierten Zellen konnten jedoch keine spezifischen Signale detektiert werden. Als Kontrolle wurden erneut mit Hilfe eines monoklonalen α SIV-Gag-Antikörpers gleichmäßige Gag-Mengen detektiert.

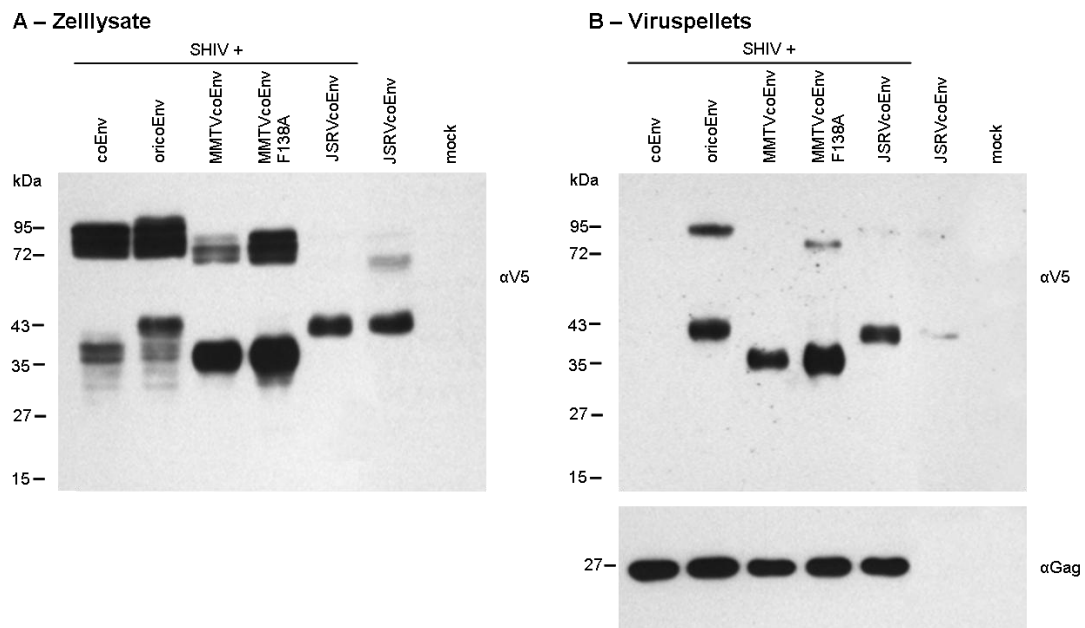


Abbildung 26: Einbau von β -retroviralen Hüllproteinen in lentivirale SHIV-Reporterviren. (A) Lysate der mit SHIV-Luzi, HIV-1 Rev und verschiedenen β -retroviralen Envs (coEnv, oricoEnv, MMTVcoEnv, MMTVcoEnvF138A, JSRVcoEnv) und pcDNA3-Leervektor transfizierten HEK 293T-Zellen. Die Detektion erfolgte durch einen α V5-Antikörper. (B) Viren der jeweiligen Zellkulturüberstände wurden durch ein 20 %iges Sucrosekissen mittels Ultrazentrifuge pelletiert und anschließend im Western Blot mittels α V5- und SIV-Gag-spezifischen Antikörper analysiert. Als negative Kontrollen wurden Zellen ausschließlich JSRVcoEnv ohne Plasmidvektoren zur Herstellung pseudotypisierter SHIVs oder pcDNA3-Leervektor transfiziert. Die codonoptimierten Hüllproteine von HERV-K (oricoEnv), MMTV und JSRV werden sehr gut in lentivirale SHIV Partikel inkorporiert.

3.5.3 Infektionsversuche mit oricoEnv und β -retroviralen Rezeptoren

Nach dem untersuchten Einbau der MMTV- und JSRV-Hüllproteine und der bestätigten Expression der jeweiligen spezifischen Rezeptoren können nun Infektionsversuche unternommen werden, die Aufschluss auf den noch unbekanntem Rezeptor für HERV-K(HML-2) geben sollen. Die Tropismusuntersuchung zeigte, dass humane Hep-2, THP-1 oder die Meerschweinchenzelllinie 104C1 nicht permissiv gegenüber einer oricoEnv-Infektion sind. Jedoch weisen diese Zelllinien auch einen entscheidenden Nachteil in ihrer Transfizierbarkeit mit Expressionsplasmiden und Handhabung auf. Aus diesem Grund wurde die zwar mit oricoEnv-Pseudotypen infizierbare HEK 293T-Zelllinie verwendet, die durch unsere Systeme optimal zu transfizieren ist und dennoch im Gegensatz zu feline CrFK- und caninen Cf2Th-Zellen deutlich niedrigere Infektionsraten aufweist.

Die angesprochenen HEK 293T-Zellen wurden zuerst mit hsTfR1, fcTfR1, mmTfR1 und pcDNA3-Leervektor transfiziert und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$, MMTVcoEnv, MMTVcoEnvF138A, HIV-Env Δ KS oder VSV-G pseudotypisierten SHIV-Luzi-Reporterviren, die zuvor im Tritium-Assay normalisiert wurden. Weitere 48 h später wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivitäten im Luminometer gemessen.

Die Abbildung 27 zeigt, dass mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ pseudotypisierte SHIV-Partikel nicht in der Lage sind TfR1-exprimierende Zellen stärker zu infizieren, als mit Leervektor transfizierte HEK 293T-Zellen. Für MMTVcoEnv-Pseudotypen konnte jedoch gezeigt werden, dass der mmTfR1 gegenüber den hsTfR1, fcTfR1 und negativen Kontrollen einen deutlichen Zelleintritt vermittelt. Die Luziferasewerte von mmTfR1 exprimierenden Zellen weisen nach Infektion mit MMTVcoEnv Werte auf, die um zwei Zehnerpotenzen oberhalb des Hintergrundes liegen, was für eine klare Infektion spricht. Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse mit unterschiedlichen TfR1-transfizierten Zellen, dass keiner der hier untersuchten Rezeptoren das spezifische Rezeptormolekül von HERV-K113 ist.

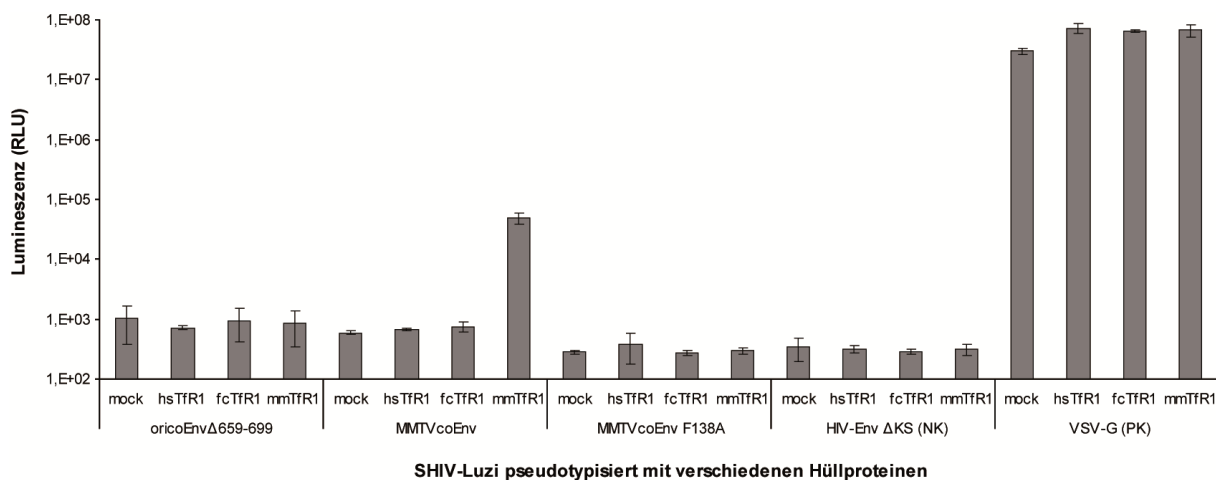


Abbildung 27: Untersuchung des MMTV spezifischen Transferrin Rezeptors 1 (TfR1) als potentiellen Rezeptor für HERV-K-Infektionen. Zur Produktion lentiviraler Partikel wurden HEK 293T-Zellen mit einem SHIV-Luziferase-Reporterkonstrukt, HIV-1 Rev und verschiedenen β -retrovirale Hüllproteinen transfiziert. Die Virionen wurden anschließend normalisiert und zur Infektion auf im Vorfeld mit *Homo sapiens* TfR1, *Felis catus* TfR1, *Mus musculus* TfR1 und pcDNA3-Leervektor transfizierte HEK 293T-Zellen gegeben. 48 h später wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz (in „relative light units“, RLU) im Luziferase-Assay ermittelt. Als Negativkontrolle (NK) zur Bestimmung der Hintergrund-Luziferaseaktivität diente die Infektion mittels eines nicht funktionellen HIV-Envs (Δ KS) und MMTVcoEnvF138A. Als positive Kontrolle (PK) wurde ein VSV-Glykoprotein eingesetzt. Weder der humane, feline noch der murine Transferrin Rezeptor 1 vermittelt oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen den Eintritt in die Wirtszelle. Demgegenüber stellt der murine TfR1 das spezifische Rezeptormolekül für MMTV-Infektionen dar.

Auf die gleiche Weise wurden zur Untersuchung der Hyaluronidase 2 als potentiell Rezeptormolekül von HERV-K113 HEK 293T-Zellen mit cfHyal2, hsHyal2 und pcDNA3-Leervektor transfiziert. Zwei Tage später erfolgte die Infektion mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$, JSRVcoEnv, HIV-Env Δ KS oder VSV-G pseudotypisierten SHIV-Luzi-Reporterviren, die zuvor im Tritium-Assay normalisiert wurden. Weitere 48 h später wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivitäten im Luminometer ermittelt.

Wie in der Abbildung 28 dargestellt, vermitteln JSRVcoEnv pseudotypisierte SHIV-Virionen den verstärkten Zelleintritt in cfHyal2- und hsHyal2-exprimierende Zellen. Auch HEK 293T-Zellen die nicht zusätzlich mit einem Hyal2-Expressionsplasmid transfiziert wurden, lassen sich von JSRVcoEnv-Pseudotypen um eine Zehnerpotenz besser infizieren, als durch HIV-Env Δ KS pseudotypisierte Viren. Dies zeigt die geringe Expression der zelleigenen Hyaluronidase 2. Mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ pseudotypisierten SHIVs konnten jedoch keine Infektionen gemessen werden. Hyal2 exprimierende Zellen steigern nicht die Infektionsraten von oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen und stellen somit auch nicht den spezifischen Rezeptor dar.

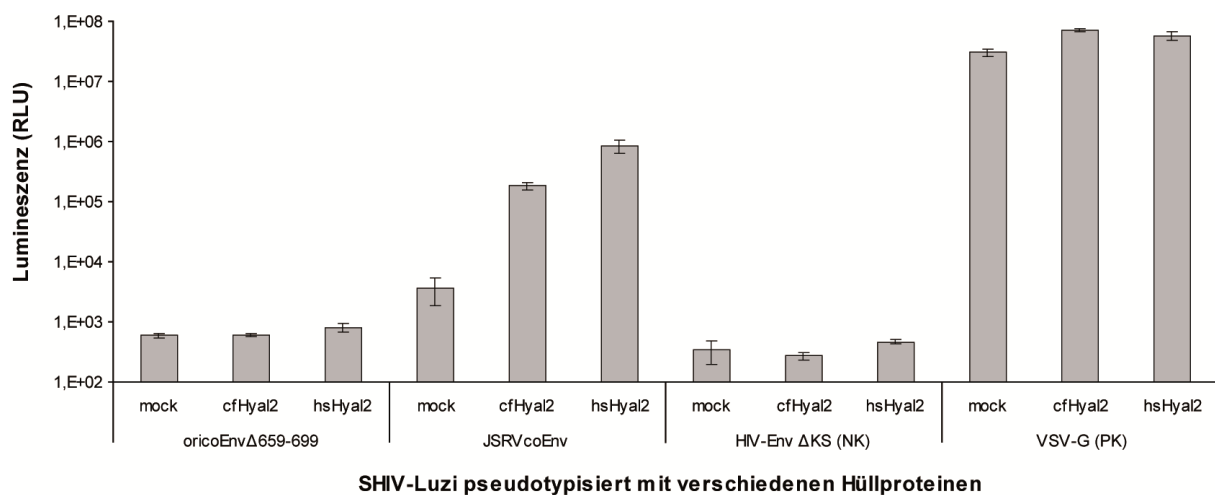


Abbildung 28: Untersuchung der JSRV spezifischen Hyaluronidase 2 (Hyal2) als potentielles Rezeptormolekül für HERV-K-Infektionen. HEK 293T-Zellen wurden mit *Canis familiaris* Hyal2, *Homo sapiens* Hyal2 und pcDNA3-Leervektor transfiziert. 48 h später erfolgte die Infektion mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$, JSRVcoEnv, HIV-Env Δ KS (negative Kontrolle, NK) oder VSV-G (positive Kontrolle, PK) pseudotypisierten SHIV-Luzi-Reporterviren, die zuvor im Tritium-Assay normalisiert wurden. Die Luziferaseaktivität der Zellysate wurde weitere 48 h später im Luminometer ermittelt (Lumineszenz in „relative light units“, RLU). Die canine und humane Hyal2 vermittelt JSRV den Eintritt in die Wirtszelle und stellt eindeutig das spezifische Rezeptorprotein dar. Jedoch ist weder cfHyal2 noch hsHyal2 der spezifische Rezeptor von HERV-K113.

Die als Positivkontrollen dienenden MMTV- und JSRV-Hüllproteine weisen die erwarteten Effekte in Bezug auf die Infektionsraten bei mmTfR1- oder cfHyal2- und hsHyal2-exprimierenden Zellen auf. Letztendlich zeigen die Rezeptor-Infektionsversuche, dass weder der humane, feline oder murine Transferrin Rezeptor 1 noch die canine oder humane Hyaluronidase 2 die spezifischen Rezeptormoleküle für HERV-K113 sind, die dem Virus den Eintritt in die Wirtszelle ermöglichen.

3.5.4 Herstellung eines oricoEnv-Immunoadhäsins zur Rezeptoridentifizierung

Rezeptoridentifizierungen bei anderen Virusgruppen haben gezeigt, dass die Herstellung eines rekombinanten Env-Fc-Fusionsproteins eine präzisere Analyse von Zellen ermöglicht, die den mutmaßlichen Rezeptor exprimieren. Die extrapartikuläre Domäne des viralen Hüllproteins bzw. der Teil, welcher die initiale und hochspezifische Verbindung mit dem Rezeptormolekül eingeht wird dabei mit dem Fc-Teil des Immunglobulins G (IgG) zu einem Fusionsprotein verknüpft. Auf diese Weise gelang es unter anderem für das *SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) Coronavirus*, das *Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (Human Herpesvirus Typ 8, HHV-8)*, *Avian Leukosis Virus Typ E* oder HTLV-1 den potentiellen Rezeptor zu identifizieren oder in weiterführenden Experimenten zu bestätigen [Adkins *et al.*, 1997; Birkmann *et al.*, 2001; Jassal *et al.*, 2001; Piñon *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003]. Die Generierung eines solchen HERV-K113 Env-Immunoadhäsins soll als erster Schritt zur Identifizierung des mutmaßlichen Rezeptors von HERV-K113 dienen.

Hierfür wurde der 684 bp große Fc-Teil des humanen IgGs in einen pcDNA3-Leervektor kloniert. Wie in der Abbildung 29 zu sehen diente dieses pcDNA3-IgG-Ausgangskonstrukt der Bildung der Fusionsproteine oricoEnvSU-IgG und oricoEnvTM-IgG. Das oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsins besteht aus dem Signalpeptid (SP) und Oberflächenglykoprotein (SU) von HERV-K113, welches über einen fünf „Aminosäurespacerbereich“ am humanen IgG gekoppelt ist. Im Vergleich dazu, weist das oricoEnvTM-IgG-Konstrukt neben dem SP und SU zusätzlich die extrapartikuläre Domäne des transmembranen Hüllproteins (exTM) auf. Der Membran-durchziehende (MSD) und intrapartikuläre Bereich des TMs wurden deletiert. Die „cleavage site“ aller oricoEnv-IgG-Fusionsproteine wurde durch Mutagenesen eliminiert, so dass keine Furin-Protease vermittelte Spaltung des Vorläuferproteins in die beiden Untereinheiten mehr erfolgt.

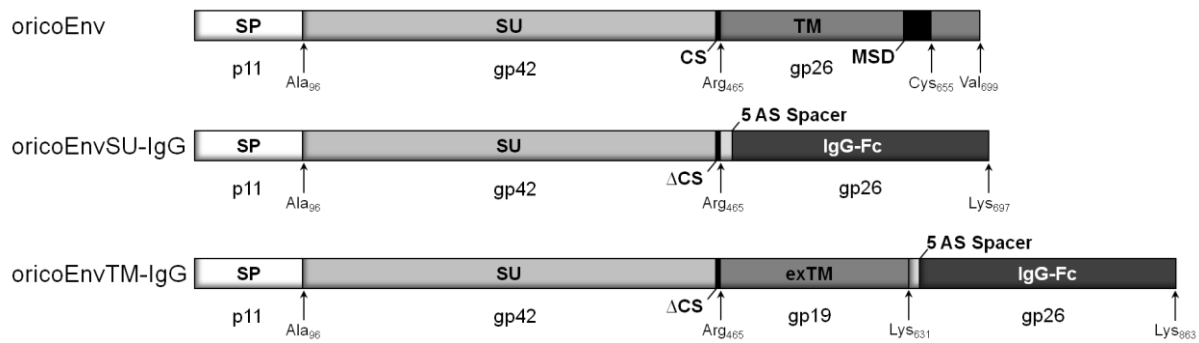


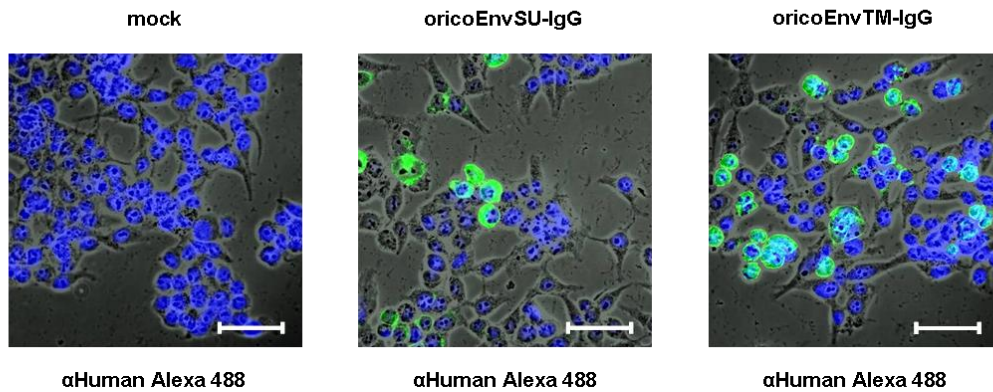
Abbildung 29: HERV-K oricoEnv-Immunoadhäsine. Aufbau des ursprünglichen oricoEnv-Vorläuferproteins und der beiden HERV-K Immunoadhäsine oricoEnvSU-IgG und oricoEnvTM-IgG. Ausgehend vom Signalpeptid (SP), Oberflächenglykoprotein (SU) und transmembranen Hüllprotein (TM) wurde ein fünf „Aminosäurespacerbereich“ (5 AS Spacer) und der Fc-Teil des humanen Immunglobulins G (IgG-Fc) C-terminal an oricoEnv fusioniert. OricoEnvSU-IgG ist direkt mit dem SU verknüpft, wohingegen oricoEnvTM-IgG zusätzlich die extrapartikuläre Domäne des TMs (exTM) aufweist. Die „cleavage site“ wurde eliminiert (Δ CS), so dass keine Furin-Protease vermittelte Spaltung des Vorläuferproteins mehr erfolgt. Die theoretischen Molekulargewichte und Aminosäurepositionen jeder Untereinheit sind in der Abbildung vermerkt.

Die neuhergestellten oricoEnv-Immunoadhäsine sollen zu allererst auf ihre Expression, Glykosylierung und Funktionalität hin untersucht werden. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit oricoEnvSU-IgG, oricoEnvTM-IgG, pcDNA3-Leervektor und einem weiteren Plasmid namens SCF-IgG transfiziert, welches als Positivkontrolle der Aufreinigung von IgG-gekoppelten Proteinen dient. SCF-IgG codiert für den löslichen Stammzellfaktor („stem cell factor“) aus der Familie der Zytokine, welcher im Gegensatz zur membrangebundenen Variante sezerniert wird. Zwei Tage später wurden die exprimierten IgG-Fusionsproteine mittels Protein A-Sepharose aus den Zelllysaten und dazugehörigen Zellkulturüberständen präzipitiert. Die aufgereinigten Proteine wurden für eine Stunde mit oder ohne PNGaseF behandelt, welches N-verknüpfte Oligosaccharidketten deglykosyliert und anschließend im Western Blot mit Hilfe eines α Human-IgG-HRP-Antikörpers detektiert. Für Immunfluoreszenzexperimente wurden HEK 293T-Zellen parallel mit oricoEnvSU-IgG, oricoEnvTM-IgG und pcDNA3-Leervektor transfiziert und 48 h später die exprimierten Proteine mittels α Human Alexa 488 im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (siehe 2.2.3.7) detektiert.

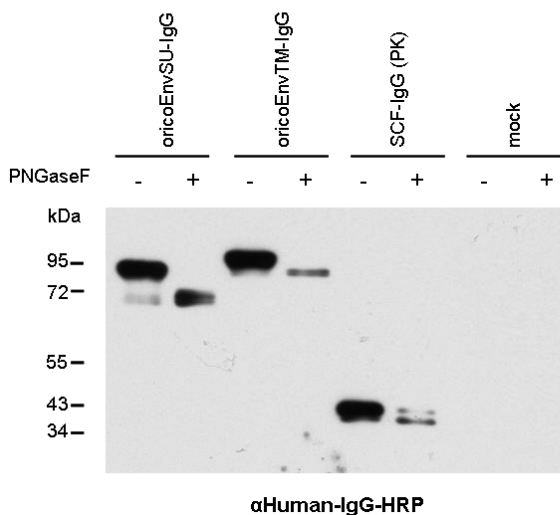
Die Immunfluoreszenzergebnisse zeigen deutlich eine starke Expression der oricoEnvSU-IgG- und oricoEnvTM-IgG-Immunoadhäsine (Abbildung 30A). Innerhalb der mit Leervektor transfizierten Zellen (mock) sind keine spezifisch angefärbten Proteine zu

detektieren. Wie in der Abbildung 30B der präzipitierten Zelllysate zu sehen, können alle Immunoadhäsine auch im Western Blot nachgewiesen werden. Zusätzlich bewirkt die Behandlung mit PNGaseF eine Verringerung des molekularen Gewichtes, was auf Glykosylierungen schließen lässt. Das glykosylierte oricoEnvSU-IgG bei 95 kDa besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 68 kDa, welches der deglykosylierten Bande nach PNGaseF-Behandlung in der zweiten Spur der Abbildung 30B entspricht. Durch Zugabe von PNGaseF konnte bei oricoEnvTM-IgG ein Proteinshift der glykosylierten Form bei 115 kDa zum unglykosylierten 87 kDa großen Fusionsprotein detektiert werden. Dies stimmt auch mit dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht von oricoEnvTM-IgG überein. Auch SCF-IgG konnte mittels Protein A-Sepharose präzipitiert und dessen Gewicht nach Deglykosylierung verringert werden. Die Aufreinigung der Immunoadhäsine aus Zellkulturüberständen ist in der Abbildung 30C zu sehen und zeigt, dass nur oricoEnvSU-IgG, neben der Positivkontrolle des löslichen Stammzellfaktors in den Mediumüberstand sezerniert wird. OricoEnvTM-IgG dagegen bleibt in den Zellen stecken und kann nicht im Zellkulturüberstand detektiert werden. Die Behandlung der oricoEnvSU-IgGs mit PNGaseF lässt auch auf eine starke Glykosylierung der sezernierten Fusionsproteine schließen. Die Deglykosylierung verursacht wie bereits bei den Zelllysaten untersuchten Proteinshift von 95 kDa auf 68 kDa der unglykosylierten Variante. Beim Stammzellfaktor ist eine weitere Bande bei 70 kDa zu erkennen, bei der es sich wahrscheinlich um ein SCF-Dimer handelt. Nach Zugabe von PNGaseF ist jedoch in der sechsten Spur der Abbildung 30C kein Dimer mehr zu detektieren, was darauf schließen lässt, dass Glykosylierung eine wesentliche Voraussetzung zur Ausbildung von SCF-Oligomeren ist.

A – Immunofluoreszenz



B – Zelllysate



C – Zellkulturüberstände

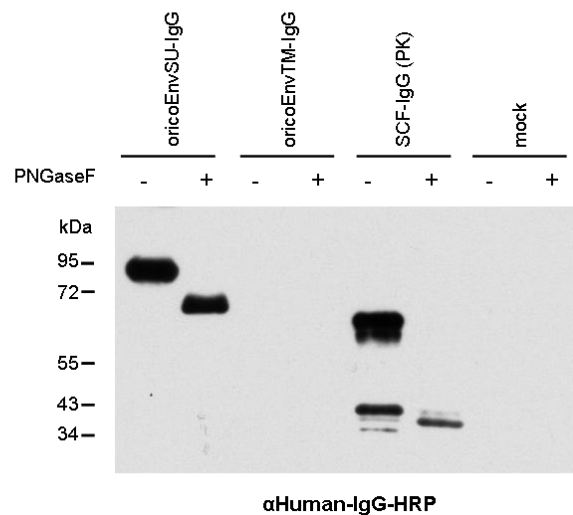


Abbildung 30: Expression der oricoEnv-Immunoadhäsine. HEK 293T-Zellen wurden mit oricoEnvSU-IgG, oricoEnvTM-IgG und pcDNA3-Leervektor transfiziert. Die exprimierten Proteine wurden nach 48 h mit αHuman Alexa 488 im konfokalen Laser Scanning Mikroskop detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt (A). Der weiße Balken entspricht einer Größe von 50 μm. In parallelen Versuchen wurden HEK 293T-Zellen mit oricoEnvSU-IgG, oricoEnvTM-IgG, pcDNA3-Leervektor und zusätzlich SCF-IgG (stem cell factor-IgG, positive Kontrolle, PK) transfiziert. 48 h später wurden die IgG-Fusionsproteine mittels Protein A-Sepharose aus den Zelllysaten (B) und dazugehörigen Zellkulturüberständen (C) präzipitiert. Die aufgereinigten Proteine wurden für eine Stunde bei 37 °C mit (+) oder ohne (-) PNGaseF behandelt und anschließend im Immunoblot mit Hilfe eines αHuman-IgG-HRP-Antikörpers detektiert. Die oricoEnvSU-IgG und oricoEnvTM-IgG-Immunoadhäsine werden exprimiert und sind stark glykosyliert. Jedoch werden keine oricoEnvTM-IgGs in den Zellkulturüberstand sezerniert.

3.5.5 Rezeptorbindungsstudie mit oricoEnv-Immunoadhäsinen

Die Aufreinigung der oricoEnv-Immunoadhäsine aus den Zellkulturüberständen transfizierter HEK 293T-Zellen zeigte deutlich, dass nur oricoEnvSU-IgG-Proteine in den Mediumüberstand sezerniert werden (Abbildung 30C). OricoEnvTM-IgG weist gegenüber oricoEnvSU-IgG zusätzlich die extrapartikuläre Domäne des transmembranen Hüllproteins (exTM) auf, welche vermutlich die Ursache für die Aggregation und den Arrest von oricoEnvTM-IgG innerhalb der Zellen ist. In den folgenden Experimenten soll nun überprüft werden, ob die aus den Zellkulturüberständen isolierten oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsine an den noch unbekanntenen HERV-K113 Rezeptoren binden und somit vollständig gefaltet und funktionell sind.

Hierfür wurden HEK 293T-Zellen mit oricoEnvSU-IgG und pcDNA3-Leervektor transfiziert. Die in den Zellkulturüberstand abgegebenen Proteine wurden mittels Protein A-Sepharose gebunden, aufgereinigt und eluiert. Für die Rezeptorbindungsstudie wurden nun Zelllinien, die nicht permissiv oder nur schwach permissiv gegenüber HERV-K113 Infektionen sind, wie z. B. die Meerschweinchenzelllinie 104C1 (embryonale Bindegewebszelllinie) oder humane HeLa-Zellen (Gebärmutterhalszellen), ausgesät. Als Positivkontrolle dienten feline CrFK-Nierenzellen, die eine sehr hohe Infektiosität gegenüber HERV-K113 Env Pseudotypen aufweisen. Die isolierten oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsine wurden nun zur Bindung an spezifische Rezeptorproteine mit den Zellen für 1,5 h inkubiert und anschließend mittels α Human Alexa 488 im konfokalen Laser Scanning Mikroskop nachgewiesen. Ungebundene Immunoadhäsine oder Fluoreszenzantikörper wurden in mehreren Waschschrritten von den adhären Zellen entfernt.

Wie in der Abbildung 31 zu erkennen, weisen sezernierte Proteine von pcDNA3-Leervektor transfizierten Zellen bei allen drei Zelllinien keine spezifischen, grünen Fluoreszenzmarkierungen auf. Im Gegensatz dazu bindet oricoEnvSU-IgG vermutlich an den spezifischen Rezeptoren der für HERV-K113-Infektionen sehr empfänglichen CrFK-Zellen. OricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsine lassen sich deutlich an den CrFK-Zellen detektieren. Jedoch können auch bei nur gering permissiven HeLa-Zellen oder nicht permissiven 104C1-Zellen vereinzelte Signale beobachtet werden. Die Anzahl und Intensitäten Fluoreszenz-gekoppelten oricoEnvSU-IgGs bei HeLa- und 104C1-Zellen sind jedoch deutlich schwächer, als bei CrFK-Zellen.

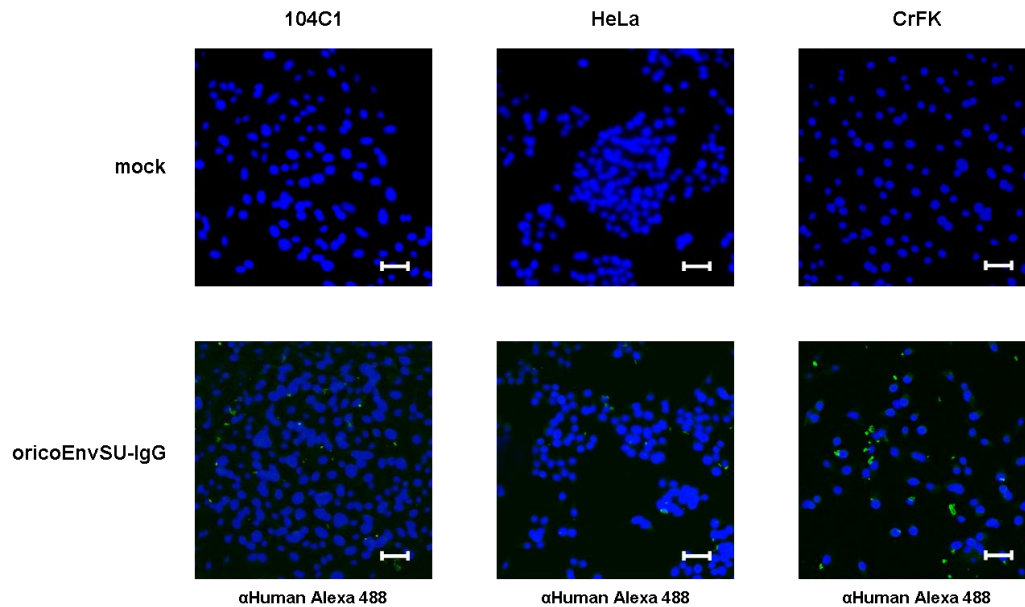


Abbildung 31: Rezeptorbindungsstudie mit oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsinen. HEK 293T-Zellen wurden mit pcDNA-Leervektor und oricoEnvSU-IgG transfiziert. Die in den Zellkulturüberstand sezernierten Proteine wurden mittels Protein A-Sepharose aufgereinigt und auf nicht permissive 104C1-, schwach permissive HeLa- und stark permissive CrFK-Zellen gegeben. Die potentiellen Rezeptorbindungen der aufgereinigten Proteine wurden im Anschluss mittels α Human Alexa 488 und Zellkerne mit DAPI im konfokalen Laser Scanning Mikroskop detektiert. Mit Leervektor transfizierte Zellen und deren aufgereinigte Zellkulturüberstände weisen keine spezifischen Signale auf. Die Immunofluoreszenz zeigt, dass oricoEnvSU-IgG deutlich an CrFK-Zellen bindet (grüne Signale), die auch bei den Tropismusuntersuchungen eine hohe Empfänglichkeit gegenüber HERV-K113 Env pseudotypisierte Virionen besitzen. Jedoch sind auch schwache grüne Signale bei 104C1- und HeLa-Zellen zu erkennen, die mit HERV-K113 Env Pseudotypen nur sehr schwach infizierbar sind. Die Größeneinheit des weißen Balkens misst 50 μ m.

Ein Interferenzversuch kann möglicherweise die funktionelle Bindung der oricoEnvSU-IgG-Proteine an den jeweils spezifischen HERV-K113 Rezeptoren bestätigen. Dazu wurden wie im vorangegangenen Experiment CrFK-Zellen erneut mit aufgereinigten oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsinen für 1,5 h inkubiert. Als Kontrolle wurden CrFK-Zellen mit Proteinen aus mit Leervektor transfizierten Zellen oder mit sezernierten SCF-IgG-Proteinen versetzt. Im Anschluss erfolgte die Infektion der CrFK-Zellen mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ oder HIV-Env Δ KS (Negativkontrolle) pseudotypisierten SHIV-Luziferase-Virionen, die zuvor im Tritium-Assay normalisiert wurden. Weitere 48 h später wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivitäten im Luminometer gemessen.

Wie in der Abbildung 32 dargestellt, lassen sich im Voraus mit Proteinen aus mit Leervektor transfizierten Zellen oder SCF-IgG-Proteinen inkubierte CrFK-Zellen in gleich hohen Raten mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infizieren. Die Bindung der oricoEnvSU-IgG-

Immunoadhäsine an CrFK-Zellen bewirkt jedoch eine geringfügige Erniedrigung der Luziferasewerte, was auf eine Blockierung HERV-K113 spezifischer Rezeptoren durch oricoEnvSU-IgGs mutmaßen lässt.

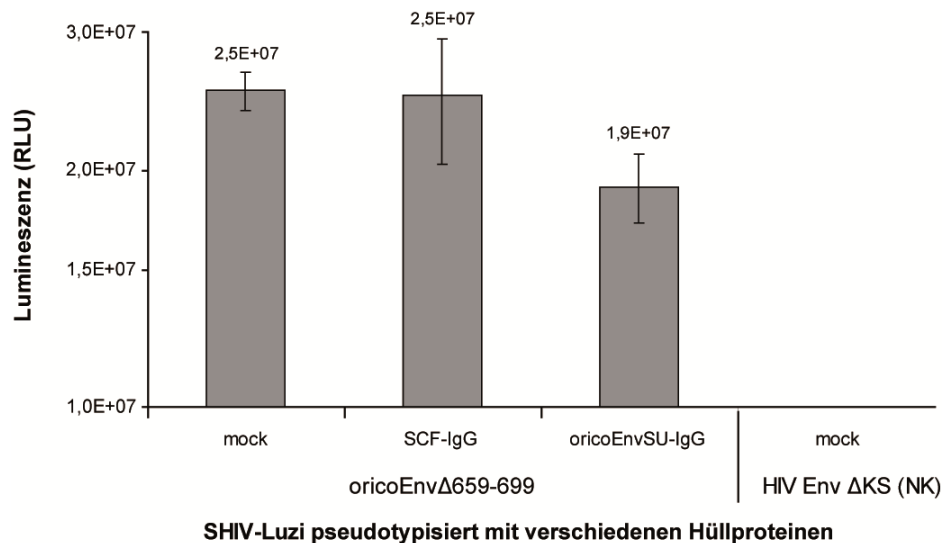


Abbildung 32: Interferenzversuch mit oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsinen. CrFK-Zellen wurden mit SCF-IgG- oder oricoEnvSU-IgG-Proteinen für 1,5 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Proteine aus Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit normalisierten oricoEnv $\Delta_{659-699}$ - oder HIV-Env Δ KS (NK) pseudotypisierten SHIV-Luziferase-Viren infiziert. Die Luziferaseaktivitäten der Zellysate wurden 48 h später im Luminometer ermittelt (Lumineszenz in „relative light units“, RLU). CrFK-Zellen, die im Voraus mit oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsinen inkubiert wurden zeigen etwas geringere Infektionsraten mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen, als mit SCF-IgG inkubierte Zellen oder gegenüber Proteinen aus Leervektor transfizierten Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass oricoEnvSU-IgG gegenüber oricoEnvTM-IgG in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und als vollständig glykosyliertes Fusionsprotein vorliegt. In ersten Bindungsstudien wurde eine deutlich stärkere Adhäsion der oricoEnvSU-IgG-Proteine an stark permissive CrFK-Zellen gegenüber nicht infizierbaren 104C1- und schwach permissiven HeLa-Zellen nachgewiesen. Mit Hilfe des oricoEnvSU-IgG-Interferenzversuchs konnte eine erniedrigte Infektionsrate von oricoEnv $\Delta_{659-699}$ Pseudotypen gemessen werden, was vermuten lässt, dass oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsine an den spezifischen HERV-K113 Rezeptoren der CrFK-Zellen binden und diese für eine folgende Infektion durch HERV-K113 blockieren.

Glykosylierung und die korrekte Faltung des Oberflächenglykoproteins ist eine Grundvoraussetzung um spezifisch an dem jeweiligen Rezeptorprotein binden zu können. OricoEnvSU-IgG erfüllt diese Kriterien und wird eine wichtige Rolle bei der geplanten Identifizierung des spezifischen HERV-K113 Rezeptors spielen.

4 Diskussion

4.1 Wiederherstellung des ursprünglichen HERV-K113 Hüllproteins

Das virale Glykoprotein von HERV-K ist durch die spezifische Interaktion an den noch unbekanntem Rezeptor für die initiale Erkennung und Bindung an die Wirtszelle zuständig. Jedoch führten postinsertionale Mutationen im Laufe der Evolution zum Verlust der HERV Env Funktionalität [Löwer *et al.*, 1995; Tönjes *et al.*, 1997]. Auch die äußerst schwache Proteinexpression in Säugetierzellen ließ eine genauere Untersuchung des Hüllproteins bislang nicht zu.

HERV-K(HML-2) bietet als eines der wohl jüngsten und am besten charakterisierten humanen endogenen Retroviren entscheidende Vorteile gegenüber anderen HERV-Familien. Das Provirus von HERV-K113 weist neben den flankierenden LTR's vollständig offene Leserahmen für alle viralen Proteine auf und drang als ursprünglich infektiöses Retrovirus vor über 600.000 Jahren in die Keimbahnzelle der Primaten ein [Turner *et al.*, 2001]. Postinsertionale Mutationen führten jedoch zum Verlust der Infektiosität und Replikationsfähigkeit von HERV-K113 [Beimforde *et al.*, 2008; Heslin *et al.*, 2009]. Kürzlich gelang verschiedenen Arbeitsgruppen eine *in silico* Erzeugung einer HERV-K Konsensussequenz (HERV-K *Phoenix* oder HERV-Kcon) mit der virale HERV-Partikel gebildet werden, die in der Lage sind neue Zellen zu infizieren. Für diese HERV-Virionen konnte jedoch bislang keine Replikationskompetenz nachgewiesen werden [Dewannieux *et al.*, 2006; Lee und Bieniasz, 2007].

Verglichen mit der proviralen Wildtyp-Sequenz erfolgte mit Hilfe der codonoptimierten coEnv-Sequenz die HERV-K113 Env-Proteinexpression in Säugetierzellen 50-fach stärker [Hanke *et al.*, 2009]. Solche Modifikationen führten bereits bei anderen retroviralen Proteinen zu starken Expressionssteigerungen [Deml *et al.*, 2001; Megati *et al.*, 2008] und vereinfachte die Untersuchung des HERV-K113 Glykoproteins drastisch.

Verglichen mit zehn sehr jungen, humanspezifischen HERV-K Elementen konnten innerhalb der HERV-K113 Env-Aminosäuresequenz acht nicht-synonyme Mutationen und drei authentische Polymorphismen identifiziert werden (siehe Abbildung 33 in 8.2.1). Es kann vermutet werden, dass der Ursprung diese Sequenzunterschiede auf die hohe Fehlerrate der RNA-Polymerase zurückzuführen ist und somit vor der Integration erfolgte. Die Mutationen

wurden jedoch als weitestgehend postinsertionell betrachtet, weil es als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist, dass die reverse Transkriptase pro Replikationsrunde mehr als ein oder zwei Fehler macht. Zusätzlich konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass antivirale Proteine wie APOBEC-Deaminasen keinen Effekt auf das provirale Genom von HERV-K113 haben [Lee *et al.*, 2008]. Es konnten keine „G zu A“-Hypermutationen durch Deaminierung von Cytosin zu Uracil, die während der reversen Transkription erfolgt nachgewiesen werden [Esnault *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2006; Lee und Bieniasz, 2007; Lovsin und Peterlin, 2009; Ross, 2009]. Völlig ausgeschlossen ist die Wirkung der APOBEC-Gruppe auf HERV-K113 jedoch nicht, weil 2007 durch Lee und Bieniasz die inhibierende Wirkung speziell des humanen APOBEC3F auf HERV-Kon-Infektionen nachgewiesen wurde. 2008 gelang es den beiden Wissenschaftlern auch die für die Cytidin Deaminase verantwortliche APOBEC3G-Gruppe als Ursache für Hypermutationen bei HERV-K60 und -KI zu identifizieren [Lee *et al.*, 2008].

Die geteilten Polymorphismen, bei denen mindestens zwei weitere provirale Env-Sequenzen wie HERV-K113 von der Konsensussequenz abwichen, bilden den entscheidenden Unterschied zu Konsensussequenzen, die bereits von anderen Gruppen zur Herstellung von funktionellen HERV-K-Partikeln verwendet wurden [Dewannieux *et al.*, 2006; Lee und Bieniasz, 2007]. Das HERV-K113 oricoEnv weist insgesamt drei solcher Variationen auf. Dass es sich bei diesen Polymorphismen um zufällig an der gleichen Position erfolgte unabhängige Mutationen oder ektopische Rekombinationen handelt, ist ziemlich unwahrscheinlich, aber nicht vollständig auszuschließen [Hughes und Coffin, 2005]. Das revertierte oricoEnv-Konstrukt stellt vermutlich das Hüllprotein von HERV-K113, zum Zeitpunkt der viralen Integration in den menschlichen Vorfahren dar. Durch den Verbleib der drei HERV-K113 spezifischen Variationen besitzt es im Gegensatz zu den bereits existierenden synthetischen Konsensussequenzen jedoch einen echten natürlichen Ursprung.

4.2 Untersuchungen zur Funktionalität von HERV-K113 Env

Die systematische Suche nach möglichen funktionellen Hüllproteinen endogener Retroviren führte zur Identifizierung von 18 kodierenden *env*-Sequenzen innerhalb des humanen Genoms [Benit *et al.*, 2001; de Parseval *et al.*, 2003; Villesen *et al.*, 2004]. Der wichtigste Beitragende dieser Liste ist die Gruppe HERV-K(HML-2) mit insgesamt sechs konservierten *env*-Genen mit vollständig offenen Leserahmen [Dewannieux *et al.*, 2005]. Bislang gelang es jedoch nur

für drei der insgesamt 18 *env*-Sequenzen ihre vollständige Funktionalität zu bestätigen. Die viralen *env*-Gene von HERV-W und HERV-FRD kodieren für Syncytin-1 und Syncytin-2. Sie vermitteln sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Verschmelzung von Zellen, die auch den entsprechenden Rezeptor exprimieren [Blond *et al.*, 2000; Mi *et al.*, 2000; Blaise *et al.*, 2003]. Desweiteren konnte in Pseudotypisierungsexperimenten mit lentiviralen Vektoren gezeigt werden, dass sie in der Lage sind Zellen zu infizieren [An *et al.*, 2001; Blaise *et al.*, 2004]. 2005 konnte der Beweis für ein drittes funktionelles Glykoprotein von HERV-K108 erbracht werden [Dewannieux *et al.*, 2005], welches im Gegensatz zum HERV-K113-Hüllprotein weitestgehend von dramatischen postinsertionalen Mutationen verschont blieb. Als Ausnahme sind die Hüllproteine von HERV-K *Phoenix* und -Kcon anzusehen, die ihre Funktionalität nur durch die Entwicklung einer Konsensussequenz wiedererlangt haben, aber dadurch von keinen ursprünglich infektiösen HERV Element abstammen. Deren Env-Proteine vermitteln jedoch den Eintritt in Wirtszellen und stellen komplette virale Glykoproteine dar [Dewannieux *et al.*, 2006; Lee und Bieniasz, 2007].

4.2.1 Status der Glykosylierung

Erst die Generierung des originalen Env-Proteins von HERV-K113 und eine signifikant durch Codonoptimierung hervorgerufene, gesteigerte Proteinexpression ermöglichte eine funktionelle Charakterisierung [Hanke *et al.*, 2009]. In Western Blot-Experimenten zeigte sich dadurch eine starke Glykosylierung von oricoEnv. Durch Deglykosylierung mittels PNGaseF, Inhibition der Glykosylierung durch Tunicamycin oder einer Glykosylierungs-Minus-Mutante konnte das Molekulargewicht des glykosylierten Vorläuferproteins um 25 kDa und der glykosylierten transmembranen Untereinheit um 13 kDa gesenkt werden [Diplomarbeit Philipp Kramer]. Insgesamt besitzt oricoEnv neun potentielle N-Glykosylierungsstellen (N-X-S/T), wobei fünf im Oberflächenglykoprotein und vier in der transmembranen Untereinheit lokalisiert sind. Das heutige coEnv-Protein von HERV-K113 mit den noch vorhandenen postinsertionalen Mutationen besitzt im Gegensatz zu oricoEnv sogar eine zusätzliche potentielle Glykosylierungsstelle. PNGaseF-Experimente haben jedoch gezeigt, dass coEnv gegenüber dem ursprünglichen oricoEnv einen geringeren Glykosylierungsstatus aufweist bzw. unvollständig glykosyliert wird, was vermutlich Auswirkungen auf dessen Proteinfaltung, Prozessierung und intrazellulären Transport hat. Die Anzahl und das Verhältnis der N-verknüpften Glykosylierungen von SU/TM variiert sehr stark innerhalb der Retroviren. Das Hüllprotein von HIV-1 zum Beispiel besitzt zwischen

18 und 33 Glykosylierungsstellen im SU und TM [Leonard *et al.*, 1990; Fenouillet *et al.*, 1994], wohingegen das Moloney MuLV Env nur sieben Glykosylierungen im SU und keine im TM beinhaltet [Kayman *et al.*, 1991; Felkner und Roth 1992]. Verglichen mit nahe verwandten Hüllproteinen vom *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) und *Jaagsiekte Sheep Retrovirus* (JSRV) weist HERV-K113 oricoEnv jedoch ein ähnlich starkes Glykosylierungs-Muster auf. Das SU/TM-Glykosylierungs-Verhältnis bei MMTV ist 3/2 [Arthur *et al.*, 1982; Henderson *et al.*, 1983] und bei JSRV 6/3 [York *et al.*, 1992]. Davon ausgehend, dass jede Oligosaccharidverknüpfung ein Molekulargewicht von etwa 2,8 kDa beisteuert [Zachara *et al.*, 2002; Cheynet *et al.*, 2005] kann vermutet werden, dass jede der vier potentiellen Stellen im TM von HERV-K113 Env glykosyliert ist. Dies scheint auch der Fall für die fünf putativen Glykosylierungen im SU zu sein. Das nicht glykosylierte oricoEnv-Vorläuferprotein der Glykosylierungs-Minus-Mutante und der Tunicamycin behandelten Proben läuft auf exakt der gleichen Höhe, woraus sich folgern lässt, dass auch alle möglichen Glykosylierungsstellen eliminiert wurden [Diplomarbeit Philipp Kramer]. In Hinblick auf das Glykoprotein von HERV-K108, welches eine zusätzliche N-Glykosylierung im SU besitzt, konnte die Arbeitsgruppe um Thierry Heidmann einen Proteinshift von 20 kDa nach Behandlung mit PNGaseF zeigen. Dieses Ergebnis und der Größenunterschied zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem Vorläuferprotein bekräftigt, dass die meisten, aber nicht alle potentiellen Glykosylierungsstellen eine N-verknüpfte Oligosaccharidkette tragen. Es konnte gezeigt werden, dass das K108 Env gegenüber HERV-K109, -K115, -K17833, -K74261 und auch dem heutigen HERV-K113 als einziges Hüllprotein in Pseudotypisierungsexperimenten mit lentiviralen Reporterviren Infektion vermittelt [Dewannieux *et al.*, 2005]. Behandlung der HEK 293T-Zellen mit Tunicamycin oder die Verwendung einer Glykosylierungs-Minus-Mutante im Rahmen meiner Diplomarbeit wies eine deutlich schwächere oricoEnv-Prozessierung auf [Diplomarbeit Philipp Kramer]. Im Gegensatz dazu wurde nach initialer Proteinexpression von oricoEnv und erst anschließender Deglykosylierung mittels PNGaseF eine deutlich bessere Spaltung des Vorläuferproteins in die beiden Untereinheiten SU und TM beobachtet. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine korrekte Verknüpfung des Hüllproteins mit Oligosaccharidketten die entscheidende Voraussetzung für eine effiziente Prozessierung darstellt. Für eine Vielzahl von retroviralen Hüllproteinen wurde bereits die Wichtigkeit der extensiven Glykosylierungen für die Proteinfaltung, Prozessierung, Transport und Fusogenität beschrieben [Pinter *et al.*, 1984; Kayman *et al.*, 1991; Vigerust und Shepherd, 2007]. Nach Mutation der vier Glykosylierungsstellen im gp41 beim stark glykosylierten HIV-1 Env war eine beträchtliche

Inhibition des Env Transports, Spaltung und fusogenen Aktivität die Folge [Dash *et al.*, 1994; Fenouillet *et al.*, 1994; Vigerust und Shepherd, 2007]. Die Ursache hierfür war der Verbleib des HIV-1 Env-Proteins im Golgi-Apparat [Fenouillet *et al.*, 1994]. Auch für das fehlgefaltete HERV-W Hüllprotein konnte der Arrest im sekretorischen Kompartiment beschrieben werden, wenn es nicht glykosyliert ist [Cheynet *et al.*, 2005]. Die Empfänglichkeit des unglykosylierten HERV-K113 oricoEnvs für intrazelluläre Proteolyse zeigt das Auftreten einer zusätzlichen 64 kDa Bande und mehreren kleineren Degradationsprodukten [Hanke *et al.*, 2009]. Bei der 64 kDa Bande handelt es sich wahrscheinlich um ein N-terminal trunkeertes oricoEnv-Vorläuferprotein, welches nur in Western Blots nach Tunicamycin behandelten Proben und mit der Glykosylierungs-Mutante zu sehen ist. Es unterstreicht die protektive Wirkung der Glykane gegen zelluläre Proteasen und Degradation von oricoEnv. Desweiteren spielt die Glykosylierung des viralen Hüllproteins eine wichtige Rolle bei der immunologischen Maskierung und Vermeidung einer Wirts-spezifischen Immunantwort [Quiñones-Kochs *et al.*, 2002; Vigerust und Shepherd, 2007].

Eine potentielle Glykosylierung fünf Aminosäuren N-terminal der Furin-Spaltstelle ($^{461}\text{NRSKR}$) war von besonderem Interesse, weil es für die Prozessierung in die Env-Untereinheiten hinderlich sein könnte. Um dies zu testen wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit das Serin gegen ein Alanin ersetzt, wodurch die Glykosylierungsstelle eliminiert und dadurch automatisch die „cleavage site“ (CS) von MMTV generiert wurde [Diplomarbeit Philipp Kramer; Goodman *et al.*, 1993]. Das mutierte Hüllprotein wurde mit derselben Effizienz wie oricoEnv geschnitten, was bedeutet, dass eine mögliche Glykosylierung an der Position ^{461}N für die Spaltung der Furin Protease nicht hinderlich ist oder womöglich keine Glykosylierung erfolgt [Hanke *et al.*, 2009].

4.2.2 Env-Einbau in retrovirale Partikel und deren Infektiosität

In Bezug auf bisherige Arbeiten konnte bislang für das heutige HERV-K113 Glykoprotein weder der Einbau in retrovirale Partikel noch deren Infektiosität beschrieben werden [Dewannieux *et al.*, 2005; Beimforde *et al.*, 2008]. Fehlerhafte Glykosylierung, die daraus folgende Blockierung des Transports zur Plasmamembran und wenig effiziente Prozessierung in die beiden funktionellen Untereinheiten sind das Resultat postinsertionaler Mutationen, die zum Funktionsverlust des heutigen HERV-K113 Envs geführt haben [Hanke *et al.*, 2009]. Im Rahmen der Diplomarbeit von Sandra Seeher haben sich zwei der insgesamt acht postinsertionalen Mutationen als äußerst entscheidend für die Hüllproteinfunktion

herausgestellt. Es handelt sich beide Male um Arginin zu Cystein-Aminosäuresubstitutionen (R140C und R577C), welche eine fehlerhafte Proteinfaltung bewirken, die wiederum in einer unvollständigen Glykosylierung und Inkorporation von oricoEnv in virale Partikel resultiert [Hanke *et al.*, 2009]. Das vermutlich originale oricoEnv-Glykoprotein wird dagegen in retrovirale Partikel eingebaut und vermittelt nach initialer Bindung an den spezifischen Rezeptor den Eintritt in die Wirtszelle. Durch Eliminierung dieser postinsertionalen Mutationen gelang es, das vollständig funktionelle Hüllprotein von HERV-K113 wiederherzustellen.

Es ist bekannt, dass die Verkürzung des C-terminalen Endes zu einem veränderten Partikeleinbau und Fusogenität des Glykoproteins führen kann [Yu *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2003; Celma *et al.*, 2007; Côté *et al.*, 2008]. Bei MLV und verwandten γ -Retroviren wird nach der Partikelfreisetzung am Hüllprotein ein C-terminales R-Peptid durch die virale Protease abgespalten, was Voraussetzung für die Bildung infektiöser Virionen ist [Brody *et al.*, 1994; Rabgeb *et al.*, 1994]. Für ein bei HERV-K(HML-2) vorhandenes R-Peptid gibt es bisher keinen Hinweis. Das zytoplasmatische Ende von oricoEnv ist mit insgesamt 44 Aminosäuren jedoch vergleichbar lang wie das anderer retroviraler Hüllproteine. Das β -retrovirale *Mason-Pfizer Monkey Virus* (MPMV) z. B. besitzt ebenfalls eine mit 38 Aminosäuren lange intrazelluläre C-terminale Domäne [Brody *et al.*, 1992; Sommerfelt *et al.*, 1992]. Lentivirale TMs weisen jedoch für gewöhnlich ein sehr langes zytoplasmatisches Ende auf, der bei SIV und HIV bis zu 150 Aminosäuren umfassen kann [Dubay *et al.*, 1992; Johnston *et al.*, 1993].

Um die funktionelle Rolle der zytoplasmatischen Domäne von oricoEnv während der Replikation genauer zu untersuchen, wurde bereits während meiner Diplomarbeit eine Serie von Stopp-Codons im C-Terminus eingefügt [Diplomarbeit Philipp Kramer]. Diese verkürzten Mutanten zeigen den kritischen Effekt des zytoplasmatischen Endes auf die Env-Biosynthese, Prozessierung, Transport, Inkorporation in virale Partikel, Fusogenität und Infektiosität. Überraschenderweise wird die längste oricoEnv $\Delta_{693-699}$ -Mutante mit nur sieben deletierten Aminosäuren weder prozessiert noch in virale Partikel eingebaut (Abbildung 14). Vergleichbare Studien zum MPMV Hüllprotein konnten drei kritische Aminosäurepositionen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne (I18, Y22 und L25) identifizieren, die nach Substitution zur Störung des Glykoprotein-Einbaus in Virionen führt [Brody *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005]. Strukturelle Veränderung des Hüllproteins, hervorgerufen durch entscheidende Mutationen im C-Terminus, sind vermutlich Ursache für den Funktionsverlust des MPMV Envs [Song *et al.*, 2005]. In Western Blot Analysen konnte

die Störung der Furin-vermittelten oricoEnv $\Delta_{693-699}$ -Prozessierung detektiert werden, welche vermutlich ebenfalls durch eine Proteinefehlfaltung des Hüllproteins hervorgerufen wird.

Die dazwischen liegende Mutante oricoEnv $\Delta_{680-699}$ mit einem um 20 Aminosäuren deletierten C-Terminus zeigt keinen signifikanten Effekt in der Prozessierung und im Partikeleinbau. Im Vergleich zum ursprünglichen oricoEnv weisen mit oricoEnv $\Delta_{680-699}$ pseudotypisierte Partikel aber leicht höhere Infektiositäten auf.

Eine weitere Deletion der zytoplasmatischen Domäne um insgesamt 41 Aminosäuren führt zur oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Mutante, die nur noch drei Aminosäuren des C-terminalen Endes aufweist. Gegenüber allen C-terminal verkürzten Mutanten und auch dem ursprünglichen Vollängen-oricoEnv weisen die mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ pseudotypisierten Viren einen bis zu fünf Mal effizienteren Env-Einbau auf. Als Folge besitzen diese Pseudotypen auch eine erhöhte Fusogenität und es lassen sich bis zu 100-fach höhere Infektionsraten messen. Die Ursachen dafür sind bislang nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Erklärung für den erhöhten Env-Gehalt des am stärksten verkürzten Hüllproteins und die geförderte Partikelfreisetzung ist womöglich eine Reduzierung der Interferenz zwischen Matrix- und Env-Protein durch nur drei verbleibende intrapartikuläre Aminosäuren der oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Mutante [Freed und Martin, 1995; Manrique et al., 2003; Celma et al., 2007]. Im Fall von α -Retroviren konnte die fürs „Budding“ absolut notwendige Interaktion des zytoplasmatischen Endes der transmembranen Untereinheit mit einer durch mehrere aromatische Aminosäuren gebildeten hydrophoben Tasche im Gag-Protein gezeigt werden [Barth et al., 1992; Suomalainen et al., 1992; Zhao et al., 1994; Garoff et al., 1998]. Für Retroviren, die jedoch auch ohne die Expression eines Hüllproteins befähigt sind Virus-ähnliche Partikel zu bilden ist die Interaktion zwischen Env und Gag während der Virusfreisetzung wenig charakterisiert. Vergleichbare Studien haben bereits gezeigt, dass Glykoproteine mit verkürzten C-terminalen Enden bevorzugt in SIV-Partikel eingebaut werden [Johnston et al., 1993; Puffer *et al.*, 2002]. Besonders das Hüllprotein des *Rous Sarcoma Virus* wird wie die Mutante oricoEnv $\Delta_{659-699}$ fast ohne jegliche zytoplasmatische Domäne in effizienter Weise in Partikel eingebaut [Perez *et al.*, 1987]. Durch ein vor allem kleineres oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Protein sind möglicherweise die Transport- und Reifungskinetiken erhöht und die Endozytoseraten vermindert, was wiederum in einer verstärkten Präsentation der Glykoproteine an der Zelloberfläche resultiert. Kurze Oberflächenproteine weisen gegenüber langen und komplex strukturierten Glykoproteinen eine erhöhte Mobilität in der Zellmembran auf. Diese erhöhte Flexibilität des C-terminal stark verkürzten oricoEnv $\Delta_{659-699}$

könnte die Zusammenlagerung und Oligomerisation der Env-Proteine gegenüber dem Vollängen oricoEnv begünstigen [Wyss et al., 2005].

Die Abspaltung des zytoplasmatischen Endes verschiedener retroviraler Hüllproteine hat gezeigt, dass die Fusogenität deutlich gesteigert werden konnte [Mulligan *et al.*, 1992; Ritter *et al.*, 1993; Celma *et al.*, 2007]. Auch für das HERV-K113 Env-Protein ist wahrscheinlich die vollständige Inkorporation der stark verkürzten oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Deletionsmutante die Ursache für deutlich infektiösere retrovirale Partikel. Eine strukturelle Neuordnung der transmembranen Ektodomäne hervorgerufen durch die Deletion von 41 Aminosäuren könnte ebenfalls zu der erhöhten Fusogenität von oricoEnv $\Delta_{659-699}$ führen [Edwards *et al.*, 2002].

Die Verwendung von SHIV- oder HERV-Pseudotypen weist keine signifikanten Unterschiede in den Effekten der oricoEnv-Inkorporation und Infektiosität auf (siehe 3.2 und 3.3). Das am stärksten deletierte oricoEnv $\Delta_{659-699}$ wird auch am besten in HERV-Partikel eingebaut und vermittelt die höchsten Infektionsraten. Neben der HERV-K *Phoenix*-Sequenz [Dewannieux *et al.*, 2007] ist es uns gelungen ein vollständig funktionelles HERV-K113 Reportervirus zu generieren, welches funktionelle oricoEnv-Proteine trägt und über den HERV-K113 spezifischen Tropismus in der Lage ist Zellen zu infizieren. Obwohl die HERV-K Proteinexpression gesteigert, die Funktionalität wiedergewonnen und die Herstellung infektiöser Partikel optimiert wurde (Abbildung 20), eignen sich aufgrund sehr hoher Virustiter SHIV-Reporterviren besser für funktionelle Untersuchungen des oricoEnvs. Bereits bei den Glykoproteinen von HERV-K108, HERV-W oder -FRD konnte ebenfalls die sehr gute Charakterisierung der Hüllproteine mit lentiviralen Reporterviren gezeigt werden, was auf die effiziente Inkorporation der Env-Proteine zurück zu führen ist [An *et al.*, 2001; Blaise *et al.*, 2004; Dewannieux *et al.*, 2005]. MLVs als Grundgerüst für Pseudotypisierungsexperimente mit HERV Env eignen sich dafür wesentlich schlechter [Dewannieux *et al.*, 2005].

In HEK 293T-Zellen werden eindeutig geringere Mengen an HERV-K Partikeln gegenüber SHIVs produziert. Um diese Limitierung auszugleichen wurden die HERV-K Virionen aus den Zellkulturüberständen zuerst mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert, standardisiert und anschließend für Infektionsversuche verwendet. Für die pseudotypisierten SHIVs war dies nicht notwendig. Desweiteren war es problematisch mit HERV-Viren, die als Reporter gen das *eGFP* trugen eindeutige Infektionen zu detektieren. Die Anzahl von eGFP-exprimierenden Zellen war gering und konnte somit mittels FACS nicht ausgewertet werden. Ein großer Vorteil bot hierfür die Infektion mit HERV-K Luziferase Partikeln, die nach

Infektion und Integration des Virusgenoms in die Wirtszelle das Luziferasereporter gen exprimieren. In dem viel sensitiveren Luziferase-Assay war es uns nun möglich, die unterschiedlichen oricoEnv-Mutanten genauer zu untersuchen. Für zukünftige HERV-K Integrationsversuche können die CMVoriNeo und CMVoriZeo Reporterviren dienen. Nach erfolgter Infektion und Integration der HERV-K Reporterviren können die infizierten Wirtszellen durch die neu erworbene Antibiotikaresistenz über einen längeren Zeitraum selektiert werden. Die HERV-K infizierte Zellpopulation könnte so später für HERV-K Integrations-PCRs verwendet werden.

4.3 Wirtsspezifität von HERV-K113 Env

Die Spezifität von HERV-K113 für die Infektion eines bestimmten Zelltyps, Gewebes oder Organismus, insgesamt bekannt als viraler Tropismus, ist ein entscheidender Faktor zur Identifizierung des natürlichen Rezeptorproteins. Die Aufklärung des HERV-K113 spezifischen Zelltropismus stellte einen großen Teil der Arbeit dar. Hierfür wurden hohe Virustiter von mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ pseudotypisierten SHIV-Partikeln hergestellt, die als Reservoir zur Infektion der in der Tabelle 24 aufgeführten Zelllinien diente. Parallele Infektionen wurden mit SHIV-Virionen durchgeführt, die entweder als negative Kontrolle ein nicht-funktionelles Hüllprotein oder als Positivkontrolle VSV-G trugen. Das Glykoprotein des *Vesicular Stomatitis Virus* weist ein sehr breites Wirtsspektrum auf und ist sogar in der Lage neben Säugetierzellen, die Infektion in Zellen von Fischen, Amphibien oder Insekten zu vermitteln [Yee *et al.*, 1994]. Lange Zeit wurde angenommen, dass der spezifische Rezeptor für VSV ein in Zellmembranen ubiquitär vorkommendes Phosphatidylserin ist [Schlegel *et al.*, 1983], jedoch konnte dies durch spätere Studien widerlegt werden [Coil und Miller, 2004]. Somit ist das natürliche Rezeptorprotein von VSV immer noch unbekannt. Jedoch diente uns der breite Wirtstropismus des VSV-G um zwischen einer nicht permissiven Zelllinie oder einer Blockierung nach erfolgtem Zelleintritt zu differenzieren. Unabhängig davon welches Hüllprotein in die Virusmembran der SHIV-Virionen eingebaut wird, unterliegen die Partikel und das freigesetzte SHIV-Genom denselben wirtsspezifischen Restriktionsmechanismen nach dem Eintritt in die Wirtszelle.

Tabelle 24: Vergleich des Zelltropismus von HERV-K113 oricoEnv $\Delta_{659-699}$ mit Hüllproteinen anderer humaner endogener Retroviren (HERV-K108, -FRD, -W) oder synthetischer Konsensussequenzen (HERV-K *Phoenix*, -Kcon)

			Philipp Kramer 2011	Dewannieux <i>et al.</i> , 2005			Dewannieux <i>et al.</i> , 2006	Lee & Bieniasz, 2007
			SHIV + oricoEnv $\Delta_{659-699}$	SIV + Env K108	SIV + Env FRD	SIV + Env W	HERV-K <i>Phoenix</i> <i>Phoenix</i> Env	HIV-1 + HERV-Kcon Env
Zelllinie	Gewebe							
Human	22RV1	Prostata	+++					
	DU145	Prostata	+					
	LNCaP	Prostata	++					
	GH	Teratokarzinom	+					
	Tera-1	Teratokarzinom	+					
	NTera2D1	Teratokarzinom		-	++			
	2102Ep	Teratokarzinom		-				
	NCCIT	Teratokarzinom		-				
	A549	Lunge	++					
	CaCo2	Dickdarm	++					
	HeLa	Gebärmutterhals	+	-	-	++	-	
	HEK 293T	Niere	++	++	++	++		++
	Hep-2	Kehlkopf	-					
	Huh-7	Leber	++					
	RD	Muskel	++					
	SH-SY5Y	Neuroblasten		+	+++	++	+	
	SK-Mel28	Haut	++					
	SW 1783	Gehirn	+					
T24	Harnblase	+						
TE671	Rhabdomyosarkom		-	++	+			
THP-1	Makrophage	-						
Simian	vero	Niere	+	-	+	+		
	cos-7	Niere	++	-	-	++		
	Pindak	Niere						+
Porcine	PK15	Niere	++					
Canine	Cf2Th	Thymus	+++					
	MDCK	Niere	++	-	+	-		
Feline	CrFK	Niere	+++					+++
	FEA	embryonales Bindegew.	++					
	G355.5	Astrozyten		++	++	-	+	
Kanninchen	RK13	Niere	++					
Meerschwein	JH4	Lunge	+					
	104C1	embryonales Bindegew.	-					
Hamster	BHK21	Niere	++	+	+	-	+++	
	CHO-K1	Ovarium	++	-	-	-		
Ratte	T145	Bindegewebe	+					
	T85	Bindegewebe	+					
	208F	embryonales Bindegew.		-	-	-		
	REF	embryonales Bindegew.	++					
Murine	L-929	Bindegewebe	+					
	MDTF	Bindegewebe						+++
	NIH3T3	embryonales Bindegew.	+					
	WOP	embryonales Bindegew.						
	LOK	Niere		-	-	-	-	
	MCA	Fibrosarkom		+	-	-		
RAW	Makrophage	+	-	-				

-, keine oder nur sehr schwache Infektionen detektierbar; +, Zellen sind schlecht infizierbar; ++, Zellen sind gut infizierbar; +++, sehr starke Infektionen detektierbar.

So spielt direkt nach erfolgter Zellinfektion Trim5 α (tripartite motif protein 5 alpha) als retroviraler Restriktionsfaktor eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass die Virusreplikation zu einem frühen Zeitpunkt durch Abbau und Degradation des HIV- oder auch SIV-Cores durch Trim5 α inhibiert wird, was eine Akkumulation von reversen Transkriptionsprodukten verhindert [Perez-Caballero *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Song, 2009]. Erst die Verrechnung der ermittelten Infektionsraten von oricoEnv $\Delta_{659-699}$ - und VSV-G-Pseudotypen ermöglichte den Vergleich aller Zelllinien untereinander, weil somit eine Blockierung nach erfolgtem Viruseintritt berücksichtigt wird.

HERV-K113 Env pseudotypisierte Partikel sind in der Lage Zellen aus allen zehn verschiedenen Wirtsspezies zu infizieren. Davon sind viele der getesteten Säugetierzelllinien aus den unterschiedlichsten Geweben für HERV-K113 Env permissiv. Nur wenige Zellen, wie z. B. die Meerschweinchenzelllinie 104C1, humane Hep-2-Zellen oder THP-1-Makrophagen lassen vermutlich auf das Fehlen des spezifischen Rezeptors für HERV-K113 schließen. Die Verbreitung des HERV-K113 entsprechenden Rezeptors ist jedoch nicht gewebespezifisch und wird sowohl in Leber-, Prostata-, Muskel-, Nieren-, Lungen-, Dickdarm-, Thymus-, Embryo-, Ovariums-, Bindegewebs- oder Hautzellen exprimiert. Zellen vom Gehirn, der Harnblase oder auch Keimzellen lassen sich jedoch signifikant schlechter mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infizieren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Rezeptorinterferenz, hervorgerufen durch die Expression endogener Env-Proteine der jeweiligen Zellen. Für die Teratokarzinom Zelllinien GH und Tera-1 wurde bereits durch Bieda *et al.* das Vorkommen humaner endogener Retroviren gezeigt und deren Hüllproteine aus Zelllysaten in Immunoblots detektiert [Bieda *et al.*, 2001]. Somit ist die Zielzelle für eine weitere Infektion durch HERV-K Env tragende Virionen, die höchst wahrscheinlich denselben Rezeptor verwenden, resistent. Die Rezeptorinterferenz kann durch Internalisierung des Rezeptors von der Zelloberfläche, Unterbrechung des Rezeptortransports zur Membran und/ oder Konkurrenz-Inhibition der Rezeptor-Bindungs-Domäne hervorgerufen werden [Hunter, 1997].

Zusammenfassend konnte für HERV-K113 ein amphotroper Zelltropismus nachgewiesen werden, wobei feline und canine Zelllinien besonders empfänglich gegenüber Virionen mit HERV-K113 Hüllproteinen sind (Tabelle 24). Die breite Wirtsspezifität von HERV-K113 ist gegenüber anderen Retroviren ungewöhnlich. HIV ist z. B. lymphotrop und infiziert CD4-tragende Immunzellen, wie T-Helferzellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Die zu HERV-K(HML-2) nahe verwandten β -retroviralen Hüllproteine von MMTV, ENTV und JSRV (siehe Abbildung 7) weisen wie HIV einen wesentlich eingeschränkteren Zelltropismus

als HERV-K(HML-2) auf. JSRV ist in der Lage humane, ovine, bovine und auch canine Zellen zu infizieren [Rai *et al.*, 2000 und 2001]. Das ENTV Env dagegen vermittelt trotz einer 89 %igen Aminosäureidentität des Vollängen-Env gegenüber JRSV und der Verwendung des identischen Hyal2-Rezeptors nur die Infektion in ovine und einige humane Zellen [Cousens *et al.*, 1999; Dirks *et al.*, 2002]. Grund dafür ist das für ENTV-Infektionen erforderliche stark saure Milieu (pH ~ 4,5). JSRV benötigt zur vollständigen Env-Fusogenität und Eintritt in die Wirtszelle einen etwas weniger sauren pH-Wert von ~ 6,0 [Côté *et al.*, 2008]. Der Unterschied in der pH-Wert abhängigen Fusogenität und Infektiosität ist womöglich auch die Ursache weshalb ENTV eher die nasalen Epithelzellen und JSRV tiefergelegene Luftwege der Lunge mit alveolaren (Typ II) und bronchialen Epithelzellen infiziert [Palmarini *et al.*, 1995 und 1999; Côté *et al.*, 2008]. Der Tropismus von MMTV ist dagegen stark eingeschränkt und es lassen sich ausschließlich Nagetierzellen, wie Mäuse- oder Rattenzellen durch MMTV infizieren. Hamster-, Hunde-, Katzen- oder humane Zellen sind jedoch nicht permissiv, was auf einen ecotropen Zelltropismus von MMTV schließen lässt [Dudley und Vamus, 1981; Ross *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006]. Jedoch gibt es auch innerhalb der γ -Retroviren amphotrope, polytrope und xenotrope MuLV-Isolate, die wie HERV-K113 ein sehr breites Wirtsspektrum aufweisen und eine Vielzahl verschiedener Zellen infizieren können.

Die breite Wirtsspezifität von HERV-K(HML-2) würde eher gegen eine potentiell pathogene Bedeutung von HERV-K(HML-2) und dessen vermutete Assoziation mit Teratokarzinomen, Melanomen, Mammakarzinom oder anderen Zelltransformationen sprechen (siehe 1.2.1.1). Denn obwohl HERV-K(HML-2) in der Lage ist auch Zellen anderer Spezies erfolgreich zu infizieren, wird es bislang nur mit humanen Krebs- oder Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Dies trifft jedoch auch auf das onkogene Hüllprotein von JSRV zu, welches ausschließlich in Schafen ein ansteckendes, pulmonales Adenokarzinom auslöst, obwohl es auch andere Zellen infizieren kann. Die Ursache für die Einschränkung liegt hier in der selektiven Replikation von JSRV in Lungenzellen bei Schafen. In der murinen Lungenepithelzelllinie MLE-15 konnte z. B. gezeigt werden, dass die LTR Aktivität von JSRV zwischen 40- 70 % reduziert ist [Palmarini *et al.*, 2000; McGee-Estrada und Fan, 2006]. Erforderliche, zelluläre Transkriptionsfaktoren, die an der JSRV LTR binden, werden vorwiegend in ovinen Lungenzellen exprimiert [McGee-Estrada und Fan, 2006; Leroux *et al.*, 2007].

Tropismusuntersuchungen anderer HERV Hüllproteine bestätigen die hohe Permissivität von feline Zelllinien. So vermittelt das Hüllprotein von HERV-K108 oder -FRD den messbaren

Eintritt in feline G355.5-Astrozyten [Dewannieux *et al.*, 2005]. Das aus der Konsensussequenz verschiedener HERV-K Env-Elemente synthetisch generierte HERV-Kcon Hüllprotein weist wie das HERV-K113 Env die stärksten Infektionsraten bei CrFK-Zellen auf [Lee und Bieniasz, 2007]. Ob für die äußerst empfänglichen feline Zellen die starke Expression des HERV-K(HML-2) spezifischen Rezeptors verantwortlich ist, kann zu diesem Zeitpunkt nur vermutet werden. In Versuchen mit dem Replikations-kompetenten feline endogenen Retrovirus RD-114 konnte gezeigt werden, dass CrFK-Zellen nur schwach permissiv und FER (feline embryonale Fibroblasten)- und MCC (feline Lymphom)- Zellen sogar resistent gegenüber RD-114 Infektionen sind [Okada *et al.*, 2011]. Deshalb ging man fälschlicher Weise zuerst von einem xenotropen Retrovirus aus [Fischinger *et al.*, 1975; Teich, 1984]. In späteren Experimenten stellte sich heraus, dass die genannten Zellen den RD-114 natürlichen Rezeptor exprimieren, jedoch mit endogen exprimierenden RD-114 ähnlichen Viren interferieren und demzufolge eher eine polytrope Wirtsspezifität zugrunde liegt [Okada *et al.*, 2011]. Auch für die gegenüber HERV-K113 Infektionen stark permissiven CrFK-Zellen konnte eine geringe Bildung von RD-114 Viren nachgewiesen werden [Yoshikawa *et al.*, 2010], welche womöglich die Infektionsraten erhöht, aber nicht Ursache für initiale Infektionstiter ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass CrFK-Zellen auf jeden Fall das natürliche Oberflächenprotein zum Eintritt von HERV-K113 in die Wirtszelle tragen. Es kann spekuliert werden, dass es sich um eine starke Expression der spezifischen Rezeptormoleküle in der Zellmembran handelt. Für die ebenfalls sehr permissive canine Cf2Th-Zelllinie ist nichts über die Expression geringer Mengen endogener Retroviren bekannt, aber kann auch nicht ausgeschlossen werden. Die elektronenmikroskopische Untersuchung und der reverse Transkriptase-spezifische, quantitative Cavid- Assay von naiven CrFK- und Cf2Th-Zellen ließen jedoch nicht auf die Expression von Retroviren schließen.

Es deutet darauf hin, dass Nagetierzelllinien von Meerschweinchen, Ratten oder Mäusen nur sehr niedrige Expressionen des HERV-K113 spezifischen Rezeptors aufweisen. Besonders murine Zelllinien lassen sich nur schlecht mit HERV-K113 Env, -K108 Env, -FRD Env oder -W Env pseudotypisierten Partikeln infizieren. Etwas widersprüchlich sind Tropismusuntersuchungen mit HIV-1-Pseudotypen, die das HERV-Kcon Env-Protein tragen und äußerst starke Infektionen in murine MDTF-Bindegewebszellen vermitteln. Die von uns getestete Bindegewebszelllinie L-929 lässt sich im Gegensatz zu äußerst permissiven CrFK-Zellen nur schwach mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -tragenden Virionen infizieren. Die Ursache hierfür ist jedoch unbekannt und kann nur durch zusätzliche Infektionsversuche weiterer

muriner Zelllinien geklärt werden. Es wäre jedoch möglich, dass ein Polymorphismus in der Aminosäuresequenz des HERV-K113 spezifischen Rezeptors auftritt, der die unterschiedliche Permissivität der verschiedenen Zelllinien zugrunde liegt. Eine weitere Möglichkeit, die bei FEF (felines embryonalen Fibroblasten)- Zellen und deren Infektion mit RD-114 beobachtet wurde, ist der unterschiedliche Glykosylierungsstatus des spezifischen Rezeptormoleküls. So sind RD-114 Viren, die in FEF-Zellen produziert wurden, zwar in der Lage feline G355.5-Astrozyten zu infizieren jedoch keine eigenen FEF-Zellen. Im Gegenzug dazu infizieren RD-114 Virionen aus G355.5-Zellen sowohl FEF- als auch eigene G355.5-Zellen. Erst nach Tunicamycin-Behandlung der FEF-Zellen und Deglykosylierung der Oberflächenmoleküle, einschließlich des spezifischen Rezeptors, werden FEF-Zellen permissiv für RD-114-Infektionen [Dunn *et al.*, 1993]. Demzufolge wird die RD-114 Infektiosität durch die Glykosylierung der Virus-produzierenden Zelle und der Zielzelle beeinflusst, was auch für HERV-K Infektionen eine wichtige Rolle spielen könnte. In Deglykosylierungsversuchen mit HEK 293T-, HeLa- und Huh-7-Zellen zeigte sich jedenfalls, dass der Glykosylierungsstatus des oricoEnv-Hüllproteins identisch ist.

Humane Zelllinien lassen sich wie murine Zellen zum Teil deutlich schlechter durch HERV-K113 Env infizieren. Auch mit Hüllproteinen von HERV-K108, -Kcon pseudotypisierte Partikel oder HERV-K *Phoenix* konnten ausschließlich Infektionen in HEK 293T-Zellen und SH-SY5Y-Neuroblastenzellen vermittelt werden. Demgegenüber waren Teratokarzinomzelllinien wie NTera2D1, 2102Ep, NCCIT, HeLa-Zellen oder TE671 Rhabdomyosarkomzelllinien nicht empfänglich für HERV-K Env-Pseudotypen [Dewannieux *et al.*, 2005 und 2006; Lee und Bieniasz, 2007]. Identische Ergebnisse wurden auch mit HERV-K113 oricoEnv $\Delta_{659-699}$ pseudotypisierten Virionen erzielt. Es ließen sich z. B. HEK 293T-Zellen nachweisbar mit HERV-K113 Env tragenden Partikeln infizieren, jedoch wurden nur sehr niedrige Infektionsraten bei HeLa, der Keimzelltumorzelle Tera-1 oder DU145 Prostatazelllinien detektiert.

Die humane Prostata-Zelllinie 22Rv1 stellt dabei jedoch eine Ausnahme dar, weil deren Infektionsraten noch deutlich über den Luziferasewerten von felines CrFK- oder caninen Cf2Th-Zellen liegen. Dies impliziert die beste Permissivität für HERV-K113 Env pseudotypisierte Partikel und somit wahrscheinlich auch die stärkste Expression des HERV-K113 spezifischen Rezeptors innerhalb von 22Rv1-Zellen. Die Annahme scheint jedoch widerlegt, weil erst kürzlich durch Knouf *et al.* gezeigt werden konnte, dass 22Rv1-Zellen hohe Titer des *Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus* (XMRV) exprimieren [Knouf *et al.*, 2009]. Desweiteren ist bereits bekannt, dass genetisch auch weit

entfernte Retroviren, wie zum Beispiel das *Spleen Necrosis Virus* (SNV) und MLV einen reziproken Austausch der Erbinformation durch Co-Verpackung der jeweils anderen viralen RNA vollführen [Yin und Hu, 1997]. Dasselbe Phänomen konnte aber auch bei komplexen Retroviren wie FIV, HIV-1 oder SIV beschrieben werden, welche das virale Genom jedes anderen wechselseitig kreuzverpacken [Rizvi und Panganiban, 1993; White *et al.*, 1999; Browning *et al.*, 2001]. Die hohen Infektionstiter der 22Rv1-Zellen lassen sich vermutlich ebenfalls durch die Verpackung der SHIV-RNA und besonders des Luziferasegens in XMRV Partikel erklären. Diese infizieren in der nächsten Replikationsrunde über den XMRV spezifischen XPR1-Rezeptor neue Zellen und führen zu einer Verstärkung der Luziferaseexpression. Somit wäre das entstandene chimäre SHIV/ XMRV-Virus infektiös, aber nicht in der Lage sich weiter zu replizieren. Eine Komplementation des stark deletierten SHIV-Genoms durch XMRV, die zur Wiedergewinnung der fehlenden SHIV-Funktionalität und zur Bildung neuer SHIV-Virionen führt ist eher unwahrscheinlich. Die potentielle reziproke Verpackung der lentiviralen RNA in XMRV-Partikel könnte vielleicht ein Ansatz für weitere Untersuchungen in diese Richtung sein.

4.4 Arbeiten zur Identifizierung eines potentiellen Rezeptors für HERV-K113

Bei der Invasion von Viren in ihre Wirtszellen liegt eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren zugrunde, die über Erfolg oder Misserfolg entscheiden. Ein stark erniedrigter pH-Wert ist bei JSRV und dem *Enzootic Nasal Tumor Virus* (ENTV) Voraussetzung einer erfolgreichen Infektion, indem das saure Milieu die Konformationsänderung der transmembranen Untereinheit und somit die Membranfusion zwischen Virus und Wirtszelle induziert [Côté *et al.*, 2008 und 2008]. Der notwendige CXCR4- oder CCR5 Co-Rezeptor von HIV-1 oder bei FeLV-T das zusätzlich erforderliche FeLIX-Protein, ohne die die Viren nicht in der Lage wären Zellen zu infizieren, sind nur einige Beispiele für essentielle Faktoren, die beim Infektionsprozess eine wichtige Rolle spielen [Berger *et al.*, 1999; Lee und Montaner, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Lauring *et al.*, 2001].

In den letzten Jahren gelang es bereits eine Vielzahl von retroviralen Rezeptormolekülen, die den ersten Zellkontakt mit dem Virion herstellen zu identifizieren (Tabelle 1) und den Infektionsprozess, die Membranverschmelzung und den Eintritt des viralen Genoms in die

Wirtszelle besser zu verstehen. Die Identifizierung eines spezifischen Rezeptorproteins gestaltet sich jedoch aus unterschiedlichen Gründen als äußerst schwierig. Zum einen ist die scharfe Abgrenzung zwischen einer biologisch relevanten und einer unspezifischen Bindung von Virusproteinen an in die Wirtsmembran eingelagerte Oberflächenproteine sehr kritisch. Desweiteren hat sich bei mehreren Virusgruppen gezeigt, dass nicht nur ein spezifisches Membranmolekül erforderlich ist, sondern dass auch additive oder alternative zelluläre Moleküle die Infektion in die Wirtszelle vermitteln. Zur Identifizierung und Untersuchung retroviraler Rezeptoren dienen verschiedene erfolgversprechende Ansätze, wie die biochemische Charakterisierung von Virusrezeptoren mittels monoklonalen Antikörpern, die gegen die Oberflächenglykoproteine der Wirtszelle gerichtet sind. Hemmt ein solcher monoklonaler Antikörper die Virusinfektion effektiv, kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Antigene von entscheidender Bedeutung für den Viruseintritt in die Zelle sind. Mittels Immunaффinitätschromatographie können die potentiellen viralen Rezeptoren aufgereinigt, isoliert und anschließend charakterisiert werden [Delmas *et al.*, 1992; Bearzotti *et al.*, 1999].

Eine viel einfachere und dennoch aussichtsreiche Methode ist der Vergleich des HERV-K113 Hüllproteins mit nahe verwandten β -retroviralen Env-Proteinen und die Studie nach deren bereits bekannten Rezeptorproteinen. Wie in der Verwandtschaftsanalyse basierend auf der Aminosäuresequenz des viralen Hüllproteins in der Abbildung 7 zu sehen, ist das HERV-K113 Env näher mit den Hüllproteinen von MMTV, JSRV und ENTV verwandt, als mit MPMV Env. Aus diesem Grund haben wir den für MMTV bekannten Transferrin Rezeptor 1 (TfR1) und die von JSRV verwendete Hyaluronidase 2 (Hyal2) auf HERV-K113 Infektionen näher untersucht. Die β -Retroviren ENTV und JSRV verwenden zum Zelleintritt denselben Hyal2-Rezeptor und weisen auch im Env-Sequenzvergleich eine Aminosäureidentität von 89 % auf [Cousens *et al.*, 1999].

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass der *Homo sapiens* TfR1 (hsTfR1), *Felis catus* TfR1 (fcTfR1), *Mus musculus* TfR1 (mmTfR1), die *Canis familiaris* Hyal2 (cfHyal2) und *Homo sapiens* Hyal2 (hsHyal2) erfolgreich in Zellen exprimiert werden. Außerdem wurden codonoptimierte MMTV- und JSRV-Hüllproteine generiert, die als Positivkontrollen für Pseudotypisierungsexperimente dienen. Die Rezeptoruntersuchung zeigte jedoch, dass weder die Hyal2 noch der TfR1 das spezifische Oberflächenprotein für HERV-K113 ist, welches den Eintritt in die Wirtszelle vermittelt. Mit MMTVcoEnv pseudotypisierte Partikel sind jedoch in der Lage mmTfR1-exprimierende Zellen zu infizieren und auch JSRVcoEnv tragende Virionen vermitteln die Infektion von cfHyal2- und hsHyal2-exprimierenden Zellen.

Dadurch kann eine antivirale Inhibition durch wirtseigene Restriktionsmechanismen nach erfolgtem Zelleintritt ausgeschlossen werden, dem alle SHIV-Pseudotypen auf die gleiche Weise ausgesetzt sind. Für MMTV konnte Wang *et al.* bereits zeigen, dass funktionelle Transferrin Rezeptoren aus der Maus oder Ratte ein gleiches Muster an geladenen Aminosäuren innerhalb der Rezeptorbindungsdomäne aufweisen, welche sie von nicht funktionellen humanen, felines oder caninen TfR1 unterscheidet [Wang *et al.*, 2006]. Auch für JSRV wurde die Verwendung der ovinen und humanen Hyal2 als spezifischer Rezeptor bereits bestätigt. Jedoch stellte sich heraus, dass sich die murine Hyaluronidase 2 nicht als natürliches Oberflächenprotein für JSRV eignet [Rai *et al.*, 2001]. Hinzu kommt nun die Erkenntnis, dass auch cfHyal2-exprimierende Zellen den Eintritt von JSRV vermitteln. Während der Tropismusexperimente könnte noch ein weiterer Rezeptor als potentiell Membranzmolekül für HERV-K113 vermutlich ausgeschlossen werden, der XPR1-Rezeptor. XPR1 ermöglicht xenotropen und polytropen MuLVs den Eintritt in Wirtszellen und wird von 22Rv1-Zellen, die zusätzlich XMRV-Partikel bilden, exprimiert [Knouf *et al.*, 2009]. Würde HERV-K113 Env wie XMRV den initialen Zellkontakt über den XPR1-Rezeptor herstellen, wäre eine Rezeptorkonkurrenz beider Retroviren die Folge. Die Tropismusversuche mit oricoEnv-pseudotypisierten SHIV-Partikeln wiesen jedoch bei 22Rv1-Zellen hohe Infektionstiter auf, was wahrscheinlich für keine Rezeptorinterferenz spricht. Die Klonierung und Expression des XPR1-Rezeptors in für HERV-K113 nicht permissive Zellen mit anschließender Infektion von HERV-K113 Env pseudotypisierten Viren würde die Vermutung endgültig klären.

Das Testen von nahe verwandten β -retroviralen Rezeptoren auf HERV-K113 Infektionen war ein erster Versuch, bevor nun intensivere Rezeptoruntersuchungen herangezogen werden müssen. Eine der bisher am erfolgreichsten proteinbiochemische Methode zur Identifizierung noch unbekannter Rezeptoren ist die Generierung sogenannter Immunoadhäsine, die aus einem Fusionsprotein der Rezeptor-bindenden Domäne des viralen Hüllproteins und dem Fc-Teil des Immunglobulins G (IgG) bestehen. Auf diese Weise gelang es unter anderem für das SARS Coronavirus, das Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (*Human Herpesvirus Typ 8*, HHV-8), *Avian Leukosis Virus Typ E* oder HTLV-1 den potentiellen Rezeptor zu identifizieren oder in weiterführenden Experimenten zu bestätigen [Adkins *et al.*, 1997; Birkmann *et al.*, 2001; Jassal *et al.*, 2001; Piñon *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003]. Die Schwierigkeit dieser Methode ist es jedoch ein Env-IgG-Fusionsprotein herzustellen, welches aufgrund der starken C-terminalen Verkürzung der transmembranen Untereinheit noch immer vollständig modifiziert und funktionell gefaltet wird, so dass es in der Lage ist das spezifische

Rezeptormolekül zu binden. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass das oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsine wie erwartet in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und über die Bindung an Protein A-Sepharose aufgereinigt werden kann. Überraschenderweise bleibt jedoch oricoEnvTM-IgG, welches zum oricoEnvSU-IgG noch zusätzlich den extrazellulären Bereich des transmembranen Hüllproteins aufweist in der Zelle stecken und wird nicht im Zellkulturüberstand detektiert. Die Ursache hierfür könnte wie für die um sieben Aminosäuren C-terminal verkürzte oricoEnv $\Delta_{693-699}$ -Mutante eine strukturelle Veränderung des Hüllproteins sein, welche den Arrest im Golgi-Apparat und eine fehlerhafte Prozessierung zur Folge hat. Die Glykosylierung beider oricoEnv-Immunoadhäsine konnte jedoch nachgewiesen werden, was die Blockierung der oricoEnvTM-IgG-Mutante zu einem früheren Zeitpunkt ausschließt. Denn erst während des Transports zur Membran erfährt das virale Glykoprotein die Verknüpfung und Erweiterung von Kohlenhydratketten, die für die Funktionalität essentiell sind [Freedman, 1984; Kornfeld und Kornfeld, 1985]. In Immunofluoreszenzexperimenten konnte der Nachweis, dass oricoEnvSU-IgG an permissiven CrFK-Zellen bindet, erbracht werden. Jedoch wiesen auch nicht permissive 104C1-Meerschweinchenzellen oder nur schwach infizierbare HeLa-Zellen geringe Fluoreszenzsignale auf, die zwar für eine schlechtere, aber trotzdem vorhandene Bindung der oricoEnvSU-IgG-Proteine an potentiellen Oberflächenmolekülen dieser Zelllinien sprechen. Ob es sich bei der Verknüpfung der oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsine an CrFK-Zellen wirklich um eine spezifische Bindung des HERV-K113 Rezeptors handelt, die eine Infektion inhibiert, wurde in einem folgenden Interferenzversuch genauer untersucht. Hier konnte eine erniedrigte Infektionsrate von oricoEnvSU-IgG inkubierten CrFK-Zellen gemessen werden, die anschließend mit oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Pseudotypen infiziert wurden. Offenbar binden oricoEnvSU-IgG-Immunoadhäsine die spezifischen HERV-K113 Rezeptormoleküle der CrFK-Zellen und blockieren somit die folgende Infektion durch HERV-K113 Env pseudotypisierte Virionen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass oricoEnvSU-IgG ein wohl vielversprechendes Konstrukt zur möglichen Bindung an spezifische Rezeptormoleküle von HERV-K113 bildet. Die Schwierigkeit einer klaren und reinen Aufreinigung großer Mengen an oricoEnvSU-IgG-Fusionsproteine über Protein G-Sepharose-Säulen, die anschließende Bindung der funktionellen Rezeptorbindungsdomäne an das spezifische Oberflächenprotein und die daraus folgende Isolierung eines einzigen putativen Rezeptorproteins aus den Zelllysaten von für HERV-K113 permissiven Zellen stellt die große Herausforderung für zukünftige Arbeiten dar.

4.4.1 Ausblick zur Rezeptoridentifizierung

Die Vorarbeiten der Tropismusuntersuchung und Identifizierung von permissiven und nicht sensitiven Zellen für HERV-K113 Infektionen haben großen Nutzen für direkte Rezeptoridentifizierung und auch für die danach folgende Bestätigung potentieller Rezeptormoleküle. Es ist anzunehmen, dass bei der Aufreinigung des Rezeptors mittels oricoEnvSU-IgG aus Zelllysaten eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen am Immunoadhäsion oder der Protein-Sepharose binden oder nicht vollständig getrennt werden können. Diese potentiellen Rezeptorproteine müssen im Anschluss auf ihre Expression an der Wirtsmembran hin untersucht werden und einer nach dem anderen als spezifisches Rezeptorprotein ausgeschlossen werden. Im Falle eines essentiellen Co-Rezeptors für den Eintritt von HERV-K113 in die Zelle, wird über die Identifizierung des Immunoadhäsions wahrscheinlich nur das initiale Rezeptormolekül von oricoEnvSU gebunden, was ein weiteres Problem darstellen könnte. Bei HIV-1 z. B. erfolgt erst nach Anheftung des gp120 an CD4-Rezeptoren die Umlagerung des Hüllproteins, welches eine konservierte Domäne im SU freilegt, die die Chemokin-Co-Rezeptorbindung von CXCR4 oder CCR5 ermöglicht [Wyatt und Sodroski, 1998; Berger *et al.*, 1999; Doms und Moore, 2000]. Diese erhaltene Region ist in der trimeren Form des HIV-Envs durch Protein-Loops in der Tertiärstruktur verdeckt und wird erst nach initialer Bindung an CD4 nach außen präsentiert [Kwong *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 1998]. Vermutlich benötigt das HERV-K113 Hüllprotein aber nur ein spezifisches Rezeptorprotein, weil bislang nur von zwei Retroviren die Verwendung eines Co-Rezeptors zum viralen Zelleintritt bekannt ist. Es handelt sich dabei um das lentivirale HIV und FeLV-T aus der Gruppe γ -Retroviren. Bei den bereits bekannten β -retroviralen Rezeptoren, die jedoch nicht die für HERV-K113 spezifischen Rezeptoren darstellen, handelt es sich um jeweils ein einzelnes Oberflächenmolekül, die den Eisentransport in die Zelle regulieren oder Abbaufunktionen von Hyaluronsäure ausüben.

Ein ganz anderer molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung noch unbekannter viraler Rezeptoren ist die Verwendung von cDNAs permissiver Wirtszellen und sollte für die Entdeckung des HERV-K(HML-2) Rezeptors nicht außer Acht gelassen werden [Pileri *et al.*, 1998; Rasko *et al.*, 1999]. Die Expression kleinerer cDNA-Fragmente in nicht-infizierbaren Zelllinien, wie z. B. 104C1-Meerschweinchenzellen und die anschließende Untersuchung auf entsprechende Empfänglichkeit für HERV-K(HML-2) Infektionen kann zur Identifizierung des spezifischen Rezeptors führen. Viel aufwendiger ist die Herstellung von Zellhybriden durch Austausch von DNA-Fragmenten zwischen permissiven und nicht empfänglichen

Zelllinien [Rasko *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2008]. Auf beide Weisen können jedoch Chromosomenfragmente isoliert werden, die verantwortlich für die neu erworbene Permissivität ursprünglich nicht-infizierbarer Zellen sind und somit das spezifische Rezeptorgen tragen. Die Eingrenzung des potentiellen Rezeptorgens aus der Gesamtheit der Gene des DNA-Fragmentes ist zu diesem Zeitpunkt nur noch ein letzter Schritt zur endgültigen Rezeptoridentifizierung.

Ein großer Beitrag zur Identifizierung des potentiellen HERV-K(HML-2)-Rezeptors stellt die in dieser Arbeit unternommene Tropismusstudie dar. Desweiteren bedarf es für Untersuchungen zum viralen Rezeptor ein verlässliches Reportersystem, welches der mit HERV-K113 Env pseudotypisierte SHIV-Infektionsassay eindeutig ist. Auch ein vielversprechendes HERV-K113 Reportersystem wurde entwickelt, bei dem diverse Reportergene (eGFP, Luziferase, Antibiotikaresistenzen), die Selektion infizierter Zellen vereinfacht. Zusätzlich können die HERV-K(HML-2) Partikel mit unterschiedlichen Hüllproteinmutanten pseudotypisiert werden, was die Verwendung von stark fusogenen oricoEnv $\Delta_{659-699}$ -Mutanten ermöglicht, die den natürlichen HERV-K(HML-2) Tropismus aufweisen. Ein Nachteil des HERV-K-Reportersystems waren jedoch geringe Virustiter. Durch die Generierung der oricoEnv-Immunoadhäsine wurde ein erster vielversprechender Versuch in Richtung der Rezeptoridentifizierung unternommen. Doch zusätzlich ist es ratsam über die Entwicklung von cDNA infizierbarer Zellen die Entdeckung des noch unbekanntem Rezeptors voranzutreiben.

5 Zusammenfassung

Humane Endogene Retroviren (HERVs) sind Sequenzen ehemals exogener Retroviren, die vor Millionen von Jahren Keimbahnzellen menschlicher Vorfahren infizierten und ein Bestandteil des Genoms wurden. Nach ihrer Integration entstanden bei allen heute bekannten Elementen inaktivierende Mutationen. Die am besten erhaltenen und exprimierten Proviren mit zum Teil noch vollständig offenen Leserahmen für alle viralen Proteine gehören zur Familie HERV-K(HML-2). Die postinsertionalen Mutationen verhindern oder erschweren generelle Aussagen zu funktionellen Eigenschaften dieser Proteine. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchungen ein Hüllprotein des Elements HERV-K113 verwendet, dessen postinsertionale Mutationen identifiziert und revertiert wurden. Die Sequenz des so rekonstituierten Hüllproteins eines prototypischen HERV-K(HML-2) Provirus vom Zeitpunkt der Integration und die Sequenz des heutigen Hüllproteins wurden zudem codonoptimiert. Dadurch wurde die Expression um den Faktor 50 gesteigert. Dies ermöglichte die in dieser Arbeit erfolgte weitreichende Charakterisierung des Proteins.

Das rekonstituierte Hüllprotein ist im Vergleich zu dem heutigen stark glykosyliert und wird in virale Partikel eingebaut. Es ist in der Lage Infektionen zu vermitteln. Sowohl die Glykosylierung des Hüllproteins als auch das C-terminale Ende sind kritisch für den Partikeleinbau und deren Infektiosität. Beides kann durch Deletion des nahezu kompletten zytoplasmatischen Endes signifikant gesteigert werden.

Mit dem rekonstituierten funktionellen Hüllprotein und pseudotypisierten Viren wurde eine umfangreiche Tropismusstudie durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass HERV-K(HML-2) eine sehr breite Wirtsspezifität aufweist und Zellen der meisten Spezies infiziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verbreitung des noch unbekanntem Rezeptors für HERV-K(HML-2) nicht gewebespezifisch ist, denn sowohl Leber-, Prostata-, Muskel-, Nieren-, Lungen-, Dickdarm-, Thymus-, Embryo-, Ovariums-, Bindegewebs-, Gehirn-, Harnblasen-, Keim- oder Hautzellen werden infiziert. HERV-K(HML-2) besitzt somit einen amphotropen Zelltropismus, wobei feline und canine Zelllinien besonders permissiv für Infektionen sind. Mit Hilfe von HERV-K113 Env-IgG-Immunoadhäsinen wurde der Tropismus für einige der Zellen bestätigt.

In ersten Rezeptorstudien konnte gezeigt werden, dass der Transferrin Rezeptor 1 und die Hyaluronidase 2, die spezifischen Rezeptormoleküle der nahe verwandten Betaretroviren *Mouse Mammary Tumor Virus* und *Jaagsiekte Sheep Retrovirus*, den Eintritt von HERV-K113 in die Wirtszelle nicht vermitteln.

6 Summary

Human endogenous retroviruses (HERVs) are sequences of ancient exogenous retroviruses that millions of years ago infected the germ cell line of human ancestors, becoming thereby part of the genome. Subsequent to integration, all HERVs known today suffered inactivating mutations. The best preserved and expressed proviruses, some of which have maintained open reading frames for all viral proteins, belong to the HERV-K(HML-2) family. However, postinsertional mutations make it difficult to draw general conclusions concerning the functional characteristics of these proteins and for this reason we used in these studies a HERV-K113 envelope protein (Env) for which postinsertional mutations had been identified and reversed. Furthermore this sequence, representing the reconstituted prototypical HERV-K(HML-2) provirus existing at the time of integration, together with the sequence of the present-day Env, was codon optimized. This resulted in a 50-fold or more increase in expression, allowing the protein to be characterized in detail.

Compared to the modern envelope protein, the reconstituted ancient Env is heavily glycosylated, moderately incorporated into retroviral particles and able to mediate entry. The carbohydrates of the envelope protein as well as the cytoplasmic tail are critical for particle incorporation and infectivity, functions that can both be dramatically enhanced by deletion of virtually the complete cytoplasmic tail.

Protein tropism was extensively studied using the reconstituted functional Env and pseudotyped viral particles. HERV-K(HML-2) was shown to have a broad host range and to be able to infect cell lines of most species studied. The results suggest that the distribution of the still unknown receptor is not tissue specific as many tissues including liver, prostate, muscle, kidney, lung, colon, thymus, embryo, ovary, fibroblast, brain, urinary bladder, germ cell and skin are permissive to HERV-K(HML-2) infection. HERV-K(HML-2) therefore has an amphotropic cell tropism, with feline and canine cell lines being particularly susceptible. The tropism of some of these cell lines was confirmed using HERV-K113 Env immunoadhesins.

Initial receptor studies demonstrated that Transferrin Receptor 1 and Hyaluronidase 2, the specific receptor proteins used by the closely related β -retroviruses, *Mouse Mammary Tumor Virus* and *Jaagsiekte Sheep Retrovirus*, do not facilitate the entry of HERV-K113 into host cells.

7 Literaturverzeichnis

- Abeijon, C., Hirschberg, C. B. (1990).** Topography of initiation of N-glycosylation reactions. *J. Biol. Chem.* 265:14691-5.
- Adkins, H. B., Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M. M., Pesola, J. M., Young, J. A. (1997).** Identification of a cellular receptor for subgroup E avian leukosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(21):11617-22.
- Al-Sumidaie, A. M., Leinster, S. J., Hart, C. A., Green, C. D., Mc-Carthy, K. (1988).** Particles with properties of retroviruses in monocytes from patients with breast cancer. *Lancet* ii:5-9.
- Albrecht, B., Lairmore, M. D. (2002).** Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3):396-406.
- Albritton, L., Tseng, L., Scadden, D., Cunningham, J. (1989).** A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membran spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell.* 57:659-666.
- An, D. S., Xie, Y. M., Chen, I. S. (2001).** Envelope gene of the human endogenous retrovirus HERV-W encodes a functional retrovirus envelope. *J. Virol.* 75(7):3488-9.
- Anderson, M. M., Lauring, A. S., Burns, C. C., Overbaugh, J. (2000).** Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science.* 287:1828-1830.
- Arnaud, F., Varela, M., Spencer, T. E., Palmarini, M. (2008).** Coevolution of endogenous betaretroviruses of sheep and their host. *Cell Mol. Life Sci.* 65:3422-3432.
- Arthur, L. O., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Schochetman, G. (1982).** Processing and amino acid sequence analysis of the mouse mammary tumor virus env gene product. *J. Virol.* 41(2):414-22.
- Baltimore, D. (1970).** RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* JID - 0410462, 226, 1209-1211.
- Ban, J., Portetelle, D., Altaner, C., Horion, B., Milan, D., Krchnak, V., Burny, A., Kettmann, R. (1993).** Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor. *J. Virol.* 67:1050-1057.
- Ban, J., Truong, A. T., Horion, B., Altaner, C., Burny, A., Portetelle, D., Kettmann, R. (1994).** Isolation of the missing 59-end of the encoding region of the bovine leukemia virus cell receptor gene. *Arch. Virol.* 138:379-383.
- Bannert, N., Schenten, D., Craig, S., Sodroski, J. (2000).** The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus and macrophagetropic human immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 74:10984-10993.
- Bannert, N., Farzan, M., Friend, D. S., Ochi, H., Price, K. S., Sodroski, J., Boyce, J. A. (2001).** Human Mast cell progenitors can be infected by macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro. *J. Virol.* 75(22):10808-14.
- Bannert, N., Kurth, R. (2004).** Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 5:101.
- Bannert, N., Kurth, R. (2006).** The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:149-73.
- Barth, B. U., Suomalainen, M., Liljeström, P., Garoff, H. (1992).** Alphavirus assembly and entry: role of the cytoplasmic tail of the E1 spike subunit. *J. Virol.* 66(12):7560-4.

- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinét-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science*. 220:868-871.
- Bearzotti, M., Delmas, B., Lamoureux, A., Loustau, A. M., Chilmonczyk, S., Bremont, M. (1999).** Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *J. Virol.* 73(9):7703-9.
- Belshaw, R., Katzourakis, A., Paces, J., Burt, A., Tristem, M. (2005).** High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection. *Mol. Biol. Evol.* 22:814-817.
- Belshaw, R., Pereira, V., Katzourakis, A., Talbot, G., Paces, J., Burt, A.; Tristem, M. (2004).** Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:4894-4899.
- Beimforde, N., Hanke, K., Ammar, I., Kurth, R., Bannert, N. (2008).** Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology*. 371(1):216-25.
- Benit, L., Dessen, P., Heidmann, T. (2001).** Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J. Virol.* 75(23):11709-19.
- Berger, E. A., Murphy, P. M., Farber, J. M. (1999).** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 17:657-700.
- Bertrand, P., Côté, M., Zheng, Y. M., Albritton, L. M., Liu, S. L. (2008).** Jaagsiekte sheep retrovirus utilizes a pH-dependent endocytosis pathway for entry. *J. Virol.* 82(5):2555-9.
- Best, S., Le Tissier, P., Towers, G., Stoye, J. P. (1996).** Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene *Fv1*. *Nature*, 382:826-829.
- Berger, E. A., Murphy, P. M., Farber, J. M. (1999).** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 17:657-700.
- Bieda, K., Hoffmann, A., Boller, K. (2001).** Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 82(Pt 3):591-6.
- Birkmann, A., Mahr, K., Ensser, A., Yağuboğlu, S., Titgemeyer, F., Fleckenstein, B., Neipel, F. (2001).** Cell surface heparan sulfate is a receptor for human herpesvirus 8 and interacts with envelope glycoprotein K8.1. *J. Virol.* 75(23):11583-93.
- Bittner, J. J. (1936).** Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*. 84(2172):162.
- Blaise, S., de Parseval, N., Bénit, L., Heidmann, T. (2003).** Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(22):13013-8.
- Blaise, S., Ruggieri, A., Dewannieux, M., Cosset, F. L., Heidmann, T. (2004).** Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians. *J. Virol.* 78(2):1050-4.
- Blond, J. L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., Cosset, F. L. (2000).** An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J. Virol.* 74:3321-3329.
- Bobkova, M., Stitz, J., Engelstadter, M., Cichutek, K., Buchholz, C. J. (2002).** Identification of R-peptides in envelope proteins of C-type retroviruses. *J. Gen. Virol.* 83(Pt 9):2241-6.
- Boese, A., Sauter, M., Galli, U., Best, B., Herbst, H., Mayer, J., Kremmer, E., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. (2000).** Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene*. 19(38):4328-36.

- Boeke, J., Stoye, J. (1997).** Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. *Coffin J., Hughes S., Varmus H: Retroviruses* 343-436 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1997).
- Bollag, R. J., Elwood, D.R., Tobin, E. D., Godwin, A. R., Liskay, R. M. (1992).** Formation of heteroduplex DNA during mammalian intrachromosomal gene conversion. *Mol Cell Biol.* 12(4):1546-52.
- Boller, K., Janssen, O., Schuldes, H., Tonjes, R. R., Kurth, R. (1997).** Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J. Virol.* 71:4581-4588.
- Boller, K., König, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R. (1993).** Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology.* 196(1):349-53.
- Cousens, C., Minguiljon, E., Dalziel, R. G., Ortin, A., Garcia, M., Park, J., Gonzalez, L., Sharp, J. M., de las Heras, M. (1999).** Complete sequence of enzootic nasal tumor virus, a retrovirus associated with transmissible intranasal tumors of sheep. *J. Virol.* 73(5):3986-93.
- Brindley, M. A., Maury, W. (2005).** Endocytosis and a low-pH step are required for productive entry of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 79:14482-14488.
- Broder, C. C., Collman, R. G. (1997).** Chemokine receptors and HIV. *J. Leukoc. Biol.* 62(1):20-9.
- Brody, B. A., Rhee, S. S., Hunter, E. (1994).** Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity. *J. Virol.* 68(7):4620-7.
- Brody, B. A., Rhee, S. S., Sommerfelt, M. A., Hunter, E. (1992).** A viral protease-mediated cleavage of the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus can be suppressed by mutations within the matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(8):3443-7.
- Browning, M. T., Schmidt, R. D., Lew, K. A., Rizvi, T. A. (2001).** Primate and feline lentivirus vector RNA packaging and propagation by heterologous lentivirus virions. *J. Virol.* 75(11):5129-40.
- Büscher, K., Hahn, S., Hofmann, M., Trefzer, U., Ozel, M., Sterry, W., Löwer, J., Löwer, R., Kurth, R., Denner, J. (2006).** Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 16(3):223-34.
- Burmeister, T., Ebert, A. D., Pritze, W., Loddenkemper, C., Schwartz, S., Thiel, E. (2004).** Insertional polymorphisms of endogenous HERV-K113 and HERV-K115 retroviruses in breast cancer patients and age-matched controls. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 20(11):1223-9.
- Callahan, R., Drohan, W., Tronick, S., Schlom, J. (1982).** Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 79(18):5503-7.
- Cann, A. J., Karn, J. (1989).** Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *Aids.* 3 Suppl 1, S19-34.
- Celma, C. C., Paladino, M. G., Gonzalez, S. A., Affranchino, J. L. (2007).** Importance of the short cytoplasmic domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion activity and envelope glycoprotein incorporation into virions. *Virology.* 366:405-414.
- Chai, N., Bates, P. (2006).** Na⁺/H⁺ exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(14):5531-6.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., Kim, P. S. (1997).** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 18;89(2):263-73.
- Chen, C. A., Okayama, H. (1988).** Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques.* 6(7):632-8.

- Cheyne, V., Ruggieri, A., Oriol, G., Blond, J. L., Boson, B., Vachot, L., Verrier, B., Cosset, F. L., Mallet, F. (2005).** Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/ syncytin human endogenous retroviral envelope. *J. Virol.* 79:5585-5593.
- Chiu, Y. L., Witkowska, H. E., Hall, S. C., Santiago, M., Soros, V. B., Esnault, C., Heidmann, T., Greene, W. C. (2006).** High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:15588-15593.
- Christensen, T. (2005).** Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev. Med. Virol.* 15(3):179-211.
- Cochrane, A. W., McNally, M. T., Mouland, A. J. (2006).** The retrovirus RNA trafficking granule: from birth to maturity. *Retrovirology.* 3:18.
- Coil, D. A., Miller, A. D. (2004).** Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 78(20):10920-6.
- Contreras-Galindo, R., Kaplan, M. H., Leissner, P., Verjat, T., Ferlenghi, I., Bagnoli, F., Giusti, F., Dosik, M. H., Hayes, D. F., Gitlin, S. D., Markovitz, D. M. (2008).** Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J. Virol.* 82: 9329-9336.
- Côté, M., Kucharski, T. J., Liu, S. L. (2008).** Enzootic nasal tumor virus envelope requires a very acidic pH for fusion activation and infection. *J. Virol.* 82(18):9023-34.
- Côté, M., Zheng, Y. M., Albritton, L. M., Liu, S. L. (2008).** Fusogenicity of Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is dependent on low pH and is enhanced by cytoplasmic tail truncations. *J. Virol.* 82(5):2543-54.
- Crawford, L. V., Crawford, E. M. (1961).** The properties of Rous sarcoma virus purified by density gradient centrifugation. *Virology.* 13:227-32.
- Dagleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., Weiss, R. A. (1984).** The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 312(5996):763-7.
- Dash, B., McIntosh, A., Barrett, W., Daniels, R. (1994).** Deletion of a single N-linked glycosylation site from the transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 stops cleavage and transport of gp160 preventing env-mediated fusion. *J. Gen. Virol.* 75(Pt 6):1389-97.
- de Parseval, N., Heidmann, T. (2005).** Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet. Genome Res.* 110(1-4):318-32.
- de Parseval, N., Lazar, V., Casella, J. F., Benit, L., Heidmann, T. (2003).** Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J. Virol.* 77(19):10414-22.
- Dedera, D., Gu, R. L., Ratner, L. (1992).** Conserved cysteine residues in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope protein are essential for precursor envelope cleavage. *J. Virol.* 66:1207-9.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjöström, H., Norén, O., Laude, H. (1992).** Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature.* 357(6377):417-20.
- Demirov, D. G., Freed, E. O. (2004).** Retrovirus budding. *Virus Res.* 106(2):87-102.
- Deml, L., Bojak, A., Steck, S., Graf, M., Wild, J., Schirmbeck, R., Wolf, H., Wagner, R. (2001).** Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Virol.* 75(22):10991-1001.
- Denne, M., Sauter, M., Armbruester, V., Licht, J. D., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. (2007).** Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J. Virol.* 81(11):5607-16.

- Denner, J., Phelps, R. C., Löwer, R., Kurth, R. (1995).** Antibody response of pregnant women, tumor and AIDS patients against the human endogenous retrovirus HERV-K. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121:5.
- Deininger, P. L., Batzer, M. A. (2002).** Mammalian retroelements. *Genome Res.* 12(10):1455-65
- Derse, D., Crise, B., Li, Y., Princler, G., Lum, N., Stewart, C., McGrath, C. F., Hughes, S. H., Munroe, D. J., Wu, X. (2007).** Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J. Virol.* 81:6731-6741.
- Dewannieux, M., Blaise, S., Heidmann, T. (2005).** Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *J. Virol.* 79(24):15573-7.
- Dewannieux, M., Harper, F., Richaud, A., Letzelter, C., Ribet, D., Pierron, G., Heidmann, T. (2006).** Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res.* 16(12):1548-56.
- Diaz-Griffero, F., Hoschander, S. A., Brojatsch, J. (2002).** Endocytosis is a critical step in entry of subgroup B avian leukosis viruses. *J. Virol.* 76:12866-12876.
- Dickson, C., Peters, G. (1983).** Mouse Mammary Tumor Virus (Voigt, P. K., Koprowski, H., eds.). *Springer-Verlag, Berlin.* pp.1-34.
- Dirks, C., Duh, F. M., Rai, S. K., Lerman, M. I., Miller, A. D. (2002).** Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus. *J. Virol.* 76:2141-2149.
- Doms, R. W., Moore, J. P. (2000).** HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J. Cell. Biol.* 151(2):F9-14.
- Doms, R. W., Moore, J. P. (2003).** The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(19):10598-602.
- Dubay, J. W., Roberts, S. J., Brody, B., Hunter, E. (1992).** Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J. Virol.* 66(8):4748-56.
- Dunn, K. J., Yuan, C. C., Blair, D. G. (1993).** A phenotypic host range alteration determines RD114 virus restriction in feline embryonic cells. *J. Virol.* 67(8):4704-11.
- Dwyer, J. J., Hasan, A., Wilson, K. L., et al. (2003).** The hydrophobic pocket contributes to the structural stability of the N terminal coiled coil of HIV gp41 but is not required for sixhelix bundle formation. *Biochemistry.* 42:4945-53.
- Eckert, D. M., Kim, P. S. (2001).** Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70:777-810.
- Edwards, T. G., Wyss, S., Reeves, J. D., Zolla-Pazner, S., Hoxie, J. A., Doms, R. W., Baribaud, F. (2002).** Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 76(6):2683-91.
- Ellermann, V., Bang, O. (1908).** Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46:595-609.
- Engvall, E., Jonsson, K., Perlmann, P. (1971).** Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta.* 251(3):427-34.
- Ericsson, T. A., Takeuchi, Y., Templin, C., Quinn, G., Farhadian, S. F., Wood, J. C., Oldmixon, B. A., Suling, K. M., Ishii, J. K., Kitagawa, Y., Miyazawa, T., Salomon, D. R., Weiss, R. A., Patience, C. (2003).** Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:6759-6764.

- Esnault, C., Heidmann, O., Delebecque, F., Dewannieux, M., Ribet, D., Hance, A. J., Heidmann, T., Schwartz, O. (2005).** APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature*. 433:430-433.
- Faff, O., Murray, A. B., Schmidt, J., Leib-Mösch, C., Erfle, V., Hehlmann, R. (1992).** Retrovirus-like particles from the human T47D cell line are related to mouse mammary tumour virus and are of human endogenous origin. *J. Gen. Virol.* 73:1087-1097.
- Felkner, R. H., Roth, M. J. (1992).** Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the SU envelope protein of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 66(7):4258-64.
- Fenouillet, E., Gluckman, J. C., Jones, I. M. (1994).** Functions of HIV envelope glycans. *Trends Biochem. Sci.* 19(2):65-70.
- Fischinger, P. J., Nomura, S., Blevins, C. S., Bolognesi, D. P. (1975).** Two levels of restriction by mouse or cat cells of murine sarcoma virus coated by endogenous xenotropic oncornavirus. *J. Gen. Virol.* 29(1):51-62.
- Freed, E. O., Martin, M. A. (1995).** Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* 69(3):1984-9.
- Freedman, R. B. (1984).** Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. *Trends Biochem. Sci.* 9:438-441.
- Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Griffin, M. C., Montelaro, R. C. (1989).** A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5:431-440.
- Gallo, R. C. (1986).** The first human retrovirus. *Sci. Am.* 255(6):88-98.
- Garoff, H., Hewson, R., Opstelten, D. J. (1998).** Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(4):1171-90.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Özel, M., Pauli, G., Koch, M. A. (1987).** Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology JID* - 0110674 156, 171-176.
- Gelderblom, H. R., Özel, M., Pauli, G. (1989).** Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch. Virol.* 106(1-2):1-13.
- George, M., Schwecke, T., Beimforde, N., Hohn, O., Chudak, C., Zimmermann, A., Kurth, R., Naumann, D., Bannert, N. (2011).** Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element. *Retrovirology.* 8(1):30.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J. M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P. M., Heveker, N., Pique, C., Hermine, O. (2006).** Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J. Virol.* 80:6844-6854.
- Gifford, R. J. (2006).** Evolution at the host-retrovirus interface. *Bioessays.* 28(12):1153-6.
- Gifford, R., Kabat, P., Martin, J., Lynch, C., Tristem, M. (2005).** Evolution and distribution of class II-related endogenous retroviruses. *J. Virol.* 79: 6478-6486.
- Gifford, R., Tristem, M. (2003).** The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes.* 26(3):291-315.
- Goila-Gaur, R., Khan, M. A., Miyagi, E., Kao, S., Opi, S., Takeuchi, H., Strebel, K. (2008).** HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. *Virology.* 372:136-146.
- Goldman, L. A., Cutrone, E. C., Kotenko, S. V., Krause, C. D., Langer, J. A. (1996).** Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. *Biotechniques.* 21(6):1013-5.

- Golovkina, T. V., Dzuris, J., van den Hoogen, B., Jaffe, A. B., Wright, P. C., Cofer, S. M., Ross, S. R. (1998).** A novel membrane protein is a mouse mammary tumor virus receptor. *J. Virol.* 72(4):3066-71.
- Goodman, L. J., Kain, S. R., Firestone, G. L. (1993).** Trafficking of wild-type and an endoproteolytic-site mutant of the mouse mammary tumor virus glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 268(4):2329-36.
- Gramberg, T., Sunseri, N., Landau, N. R. (2009).** Accessories to the crime: recent advances in HIV accessory protein biology. *Curr HIV/AIDS.* 6(2); 36-42.
- Granados-González, V., Piedrahita, L. D., Martínez, M., Genin, C., Riffard, S., Urcuqui-Inchima, S. (2009).** Role of the HIV-1 gp120 V1/V2 domains in the induction of neutralizing antibodies. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 27(9):523-30.
- Green, N., Shinnick, T. M., Witte, O., Ponticelli, A., Sutcliffe, J. G., Lerner, R. A. (1981).** Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(10):6023-7.
- Greene, W. C. (1991).** The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 324(5):308-17.
- Haas, J., Park, E. C., Seed, B. (1996).** Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glykoprotein. *Current Biology* 6(3); 315-324.
- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hahn, S., Ugurel, S., Hanschmann, K. M., Strobel, H., Tondera, C., Schadendorf, D., Löwer, J., Löwer, R. (2008).** Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 24:717-723.
- Hanke, K. (2010).** Funktionelle Charakterisierung der HERV-K Proteine Env und Rec. *Dissertation.* S. 8-136.
- Hanke, K., Kramer, P., Seeher, S., Beimforde, N., Kurth, R., Bannert, N. (2009).** Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain. *J. Virol.* 83(24):12790-12800.
- Hanke, T., Schneider, J., Gilbert, S. C., Hill, A. V., McMichael, A. (1998).** DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine.* 16(4), 426-35.
- Hein, S., Prassolov, V., Zhang, Y., Ivanov, D., Löhler, J., Ross, S. R., Stocking, C. (2003).** Sodium-dependent myo-inositol transporter 1 is a cellular receptor for Mus cervicolor M813 murine leukemia virus. *J. Virol.* 77(10):5926-32.
- Helenius, A., Aebi, M. (2001).** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 291(5512):2364-9.
- Helenius, A., Aebi, M. (2004).** Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 73:1019-49.
- Helseth, E., Kowalski, M., Gabuzda, D., Olshevsky, U., Haseltine, W., Sodroski, J. (1990).** Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. *J. Virol.* 64(5):2416-20.
- Henderson, L. E., Sowder, R., Copeland, T. D., Smythers, G., Oroszlan, S. (1984).** Quantitative separation of murine leukemia virus proteins by reversed-phase high-pressure liquid chromatography reveals newly described gag and env cleavage products. *J. Virol.* 52(2):492-500.
- Henderson, L. E., Sowder, R., Smythers, G., Oroszlan, S. (1983).** Terminal amino acid sequences and proteolytic cleavage sites of mouse mammary tumor virus env gene products. *J. Virol.* 48(1):314-9.
- Herniou, E., Martin, J., Miller, K., Cook, J., Wilkinson, M., Tristem, M. (1998).** Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* 72:5955-5966.

- Heslin, D. J., Murcia, P., Arnaud, F., Van Doorslaer, K., Palmarini, M., Lenz, J. (2009).** A single amino acid substitution in a segment of the CA protein within Gag that has similarity to human immunodeficiency virus type 1 blocks infectivity of a human endogenous retrovirus K provirus in the human genome. *J. Virol.* 83(2):1105-14.
- Hirschberg, C. B., Snider, M. D. (1987).** Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 56:63-87.
- Hofmann, W., Schubert, D., LaBonte, J., Munson, L., Gibson, S., Scammell, J., Ferrigno, P., Sodroski, J. (1999).** Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 73:10020-10028.
- Holmes, E. C. (2007).** Ancient lentiviruses leave their mark. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 10;104(15):6095-6.
- Hong, S., Klein, E. A., Das Gupta, J., Hanke, K., Weight, C. J., Nguyen, C., Gaughan, C., Kim, K. A., Bannert, N., Kirchhoff, F., Munch, J., Silverman, R. H. (2009).** Fibrils of prostatic acid phosphatase fragments boost infections with XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus), a human retrovirus associated with prostate cancer. *J. Virol.* 83:6995-7003.
- Huebner, R. J., Tadaro, G. J. (1969).** Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 64:1087-94.
- Hughes, J. F., Coffin, J. M. (2005).** Human endogenous retroviral elements as indicators of ectopic recombination events in the primate genome. *Genetics.* 171(3):1183-94.
- Hunter, E. (1997).** Viral entry and receptors. In: Coffin, J. M., Huges, S. H., Varmus, H. E.: *Retroviruses.* Cold Spring Harbour Laboratory, Old Spring Harbour. p.843.
- Hunter, E., Swanstrom, R. (1990).** Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 157:187-253.
- Hurtley, S. M., Helenius, A. (1989).** Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5:277-307.
- Ishikawa, J., Kaisho, T., Tomizawa, H., Lee, B. O., Kobune, Y., Inazawa, J., Oritani, K., Itoh, M., Ochi, T., Ishihara, K. (1995).** Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics.* 26:527-534.
- Ishizuka, M., Kawate, H., Takayanagi, R., Ohshima, H., Tao, R. H., Hagiwara, H. (2005).** A zinc finger protein TZF is a novel corepressor of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 331(4):1025-31.
- Jassal, S. R., Pöhler, R. G., Brighty, D. W. (2001).** Human T-cell leukemia virus type 1 receptor expression among syncytium-resistant cell lines revealed by a novel surface glycoprotein-immunoadhesin. *J. Virol.* 75(17):8317-28.
- Jern, P., Sperber, G. O., Blomberg, J. (2005).** Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology.* 2:50.
- Jin, Q., Agrawal, L., Vanhorn-Ali, Z., Alkhatib, G. (2006).** Infection of CD4(+) T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. *Virology.* 349:184-196.
- Johnson, W. E., Coffin, J. M. (1999).** Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(18):10254-60.
- Johnston, P. B., Dubay, J. W., Hunter, E. (1993).** Truncations of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein confer expanded virus host range by removing a block to virus entry into cells. *J. Virol.* 67(6):3077-86.
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y., Ruscetti, F. W. (2006).** Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J. Virol.* 80:8291-8302.

- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y., Ruscetti, F. W. (2005).** Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T cell leukemia virus type 1 virions into CD4 T cells. *J. Virol.* 79:12692-12702.
- Katen, L. J., Januszski, M. M., Anderson, W. F., Hasenkrug, K. J., Evans, L. H. (2001).** Infectious entry by amphotropic as well as ecotropic murine leukemia viruses occurs through an endocytic pathway. *J. Virol.* 75:5018-5026.
- Kaufmann, S., Sauter, M., Schmitt, M., Baumert, B., Best, B., Boese, A., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. (2010).** Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor. *J. Gen. Virol.* 91(Pt 6):1494-502.
- Kavanaugh, M., Miller, D., Zhang, W., Law, W., Kozak, S., Kabat, D., Miller, A. (1994).** Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:7071-7075.
- Kayman, S. C., Kopelman, R., Projan, S., Kinney, D. M., Pinter A. (1991).** Mutational analysis of N-linked glycosylation sites of Friend murine leukemia virus envelope protein. *J. Virol.* 65(10):5323-32.
- Kim, F. J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J. L., Sitbon, M. (2003).** Human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant Mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. *J. Virol.* 77(2):963-9.
- Klasse, P. J., Bron, R., Marsh, M. (1998).** Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 34(1):65-91.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., Montagnier, L. (1984).** T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* 312(5996):767-8.
- Knouf, E. C., Metzger, M. J., Mitchell, P. S., Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Tewari, M., Miller, A. D. (2009).** Multiple integrated copies and high-level production of the human retrovirus XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus) from 22Rv1 prostate carcinoma cells. *J. Virol.* 83(14):7353-6.
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985).** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-64.
- Kotsopoulou, E., Kim, V. N., Kingsman, A. J., Kingsman, S. M., Mitrophanous, K. A. (2000).** A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J. Virol.* 74(10):4839-52.
- Kramer, P. (2007).** Expression, Prozessierung und funktionelle Charakterisierung des Hüllproteins von HERV-K113. *Diplomarbeit.* S.7-84
- Kumar, S., O'Dowd, C., Dunckley, M. G., Lund, T. A. (1994).** Comparative evaluation of three transfection procedures as assessed by resistance to G418 conferred to HEPG2 cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32(6):1059-66.
- Kurth, R., Löwer, R., Löwer, J., Harzmann, R., Pfeifer, R., Schmidt, C.G., Fogh, J., Frank, H. (1980).** Oncornavirus synthesis in human teratocarcinoma cultures and an increased antiviral immune reactivity in corresponding patients. *Viruses in Naturally Occurring Cancers. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation.* 7:835-846.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., Hendrickson, W. A. (1998).** Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 393(6686):648-59.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C. et al. (2001).** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409:860-921.

- Landry, J. R., Mager, D. L. (2003).** Functional analysis of the endogenous retroviral promoter of the human endothelin B receptor gene. *J. Virol.* 77:7459-7466.
- Landry, J. R., Mager, D. L., Wilhelm, B. T. (2003).** Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. *Trends Genet.* 19:640-648.
- Lauring, A. S., Anderson, M. M., Overbaugh, J. (2001).** Specificity in receptor usage by T-cell-tropic feline leukemia viruses: implications for the in vivo tropism of immunodeficiency-inducing variants. *J. Virol.* 75(19):8888-98.
- Lavillette, D., Marin, M., Ruggierei, A., Mallet, F., Cosset, F. L., Kabat, D. (2002).** The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J. Virol.* 76:6442-6452.
- Lee, B., Montaner, L. J. (1999).** Chemokine immunobiology in HIV-1 pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 65(5):552-65.
- Lee, Y. N., Bieniasz, P. D. (2007).** Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog.* 3(1):e10.
- Lee, Y. N., Malim, M. H., Bieniasz, P. D. (2008).** Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. *J. Virol.* 82(17):8762-70.
- Lee, W. R., Syu, W. J., Du, B., Matsuda, M., Tan, S., Wolf, A., Essex, M., Lee, T. H. (1992).** Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 2213-7.
- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., Gregory, T. J. (1990).** Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265(18):10373-82.
- Lepperdinger, G., Strobl, B., Kreil, G. (1998).** HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J. Biol. Chem.* 273:22466-22470.
- Leroux, C., Girard, N., Cottin, V., Greenland, T., Mornex, J. F., Archer, F. (2007).** Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet. Res.* 38(2):211-28.
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., Farzan, M. (2003).** Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 426(6965):450-4.
- Li, X., Sodroski, J. (2008).** The TRIM5alpha B-box 2 domain promotes cooperative binding to the retroviral capsid by mediating higher-order self-association. *J. Virol.* 82:11495-11502.
- Li, Y., Bergeron, J. J., Luo, L., Ou, W. J., Thomas, D. Y. and Kang, C. Y. (1996).** Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp 120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:9606-11.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., Kang, C. Y. (1994).** Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology.* 204(1):266-78.
- Li, Y., Rey-Cuille, M. A., Hu, S. L. (2001).** N-linked glycosylation in the V3 region of HIV type 1 surface antigen modulates coreceptor usage in viral infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 17(16):1473-9.
- Lingappa, V. R. (1989).** Intracellular traffic of newly synthesized proteins. Current understanding and future prospects. *J. Clin. Invest.* 83(3):739-51.
- Lovsin, N., Peterlin, B. M. (2009):** APOBEC3 proteins inhibit LINE-1 retrotransposition in the absence of ORF1p binding. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1178:268-275.

- Löwer, R. (1999).** The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol.* 7:350-356.
- Löwer, R., Löwer, J., Frank, H., Harzmann, R., Kurth, R. (1984).** Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J. Gen. Virol.* 65(5):887-898.
- Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R. (1996).** The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5177-5184.
- Löwer, R., Tonjes, R. R., Korbmacher, C., Kurth, R., Löwer, J. (1995).** Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J. Virol.* 69:141-149.
- Lu, M., Blacklow, S. C., Kim, P. S. (1995).** A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol.* 2(12):1075-82.
- Luukkonen, B. G., Tan, W., Schwartz, S. (1995).** Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J. Virol.* 69(7), 4086-4094.
- Macfarlane, C., Simmonds, P. (2004).** Allelic variation of HERVK(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations. *J. Mol. Evol.* 59:642-656.
- Mager, D. L., Medstrand, P. (2003).** Retroviral repeat sequences, p. 57-63. D. N. Cooper (ed.), *Nature encyclopedia of the human genome. Nature Pub. Group, London, United Kingdom.*
- Magin, C., Hesse, J., Löwer, J., Löwer, R. (2000).** Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a transdominant phenotype when mutated. *Virology.* 274:11-16.
- Magin, C., Löwer, R., Löwer, J. (1999).** cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J. Virol.* 73:9496-9507.
- Mahieux, R., Gessain, A. (2003).** HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev Clin Exp Hematol.* 7(4):336-61.
- Mang, R., Maas, J., van Der Kuyl, A. C., Goudsmit, J. (2000).** Papio cynocephalus endogenous retrovirus among old world monkeys: evidence for coevolution and ancient cross-species transmission. *J. Virol.* 74:1578-86.
- Mangeney, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., Heidmann, T. (2006).** Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104(51):20534-9.
- Manel, N., Kim, F. J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., Battini, J. L. (2003).** The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell.* 115:449-459.
- Manrique, J. M., Celma, C. C., Hunter, E., Affranchino, J. L., González, S. A. (2003).** Positive and negative modulation of virus infectivity and envelope glycoprotein incorporation into virions by amino acid substitutions at the N terminus of the simian immunodeficiency virus matrix protein. *J. Virol.* 77(20):10881-8.
- Marin, M., Tailor, C., Nouri, A., Kabat, D. (2000).** Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1 is an auxiliary receptor for baboon endogenous retrovirus. *J. Virol.* 74:8085-8093.
- McClure, M. O., Sommerfelt, M. A., Marsh, M., Weiss, R. A. (1990).** The pH independence of mammalian retrovirus infection. *J. Gen. Virol.* 71:767-773.
- McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R., Weissman, I. L. (1988).** Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell.* 53(1):55-67.

- McDougall, A. S., Terry, A., Tzavaras, T., Cheney, C., Rojko, J., Neil, J. C. (1994).** Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *J. Virol.* 68(4):2151-60.
- McGee-Estrada, K., Fan, H. (2006).** In vivo and in vitro analysis of factor binding sites in Jaagsiekte sheep retrovirus long terminal repeat enhancer sequences: roles of HNF-3, NF-I, and C/EBP for activity in lung epithelial cells. *J. Virol.* 80(1):332-41.
- Medstrand, P., Mager, D. L. (1998).** Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *J. Virol.* 72:9782-9787.
- Megati, S., Garcia-Hand, D., Cappello, S., Roopchand, V., Masood, A., Xu, R., Luckay, A., Chong, S. Y., Rosati, M., Sackitey, S., Weiner, D. B., Felber, B. K., Pavlakis, G. N., Israel, Z. R., Smith, L. R., Eldridge, J. H., Sidhu, M. K., Egan, M. A. (2008).** Modifying the HIV-1 env gp160 gene to improve pDNA vaccine-elicited cell-mediated immune responses. *Vaccine.* 26(40):5083-94.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert, D. M., Cohen, F. S. (2000).** Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell. Biol.* 151(2):413-23.
- Merten, C. A., Stitz, J., Braun, G., Poeschla, E. M., Cichutek, K., Buchholz, C. J. (2005).** Directed evolution of retrovirus envelope protein cytoplasmic tails guided by functional incorporation into lentivirus particles. *J. Virol.* 79(2):834-40.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., La Vallie, E., Tang, X. Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J. C. Jr., McCoy, J. M. (2000).** Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature.* 403(6771):785-9.
- Miller, A. D., Bergholz, U., Ziegler, M., Stocking, C. (2008).** Identification of the myelin protein plasmolipin as the cell entry receptor for *Mus caroli* endogenous retrovirus. *J. Virol.* 82(14):6862-8.
- Miller, D., Miller, A. (1994).** A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry. *J. Virol.* 68:8270-8276.
- Mizushima, S., Nagata, S. (1990).** pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18(17):5322.
- Modrow, S.; Falke, D. and Truyen, U. (2003).** Retroviren, Molekulare Virologie (vol. Auflage). *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.* pp. 390-448.
- Morrow, C. D., Park, J., Wakefield, J. K. (1994).** Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol.* 266: C1135-56.
- Mothes, W., Boerger, A. L., Narayan, S., Cunningham, J. M., Young, J. A. (2000).** Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. *Cell.* 103:679-689.
- Moyes, D. L., Martin, A., Sawcer, S., Temperton, N., Worthington, J., Griffiths, D. J., Venables, P. J. (2005).** The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics.* 86(3):337-41.
- Mulligan, M. J., Yamshchikov, G. V., Ritter, G. D. Jr., Gao, F., Jin, M. J., Nail, C. D., Spies, C. P., Hahn, B. H., Compans, R. W. (1992).** Cytoplasmic domain truncation enhances fusion activity by the exterior glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 2 in selected cell types. *J. Virol.* 66(6):3971-5.
- Nakayama, E. E., Shioda, T. (2010).** Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha. *Rev Med Virol.* 20(2):77-92.
- Neil, S. J., Sandrin, V., Sundquist, W. I., Bieniasz, P. D. (2007).** An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe.* 2:193-203.

- Neil, S. J., Zang, T., Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 451: 425–430.
- Nussbaum, O., Roop, A., Anderson, W. F. (1993). Sequences determining the pH dependence of viral entry are distinct from the host range-determining region of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J. Virol.* 67:7402-7405.
- Okada, M., Yoshikawa, R., Shojima, T., Baba, K., Miyazawa, T. (2011). Susceptibility and production of a feline endogenous retrovirus (RD-114 virus) in various feline cell lines. *Virus Res.* 155(1):268-73.
- Olah, Z., Lehel, C., Anderson, W., Eiden, M., Wilson, C. (1994). The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodiumdependent phosphate transporter. *J. Biol. Chem.* 269:25426-25431.
- Ono, M., Kawakami, M., Takezawa, T. (1987). A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. *Nucleic Acids Res.* 15:8725-8737.
- Ono, M., Kawakami, M., Ushikubo, H. (1987). Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J. Virol.* 61:2059-2062.
- Ono, M., Yasunaga, T., Miyata, T., Ushikubo, H. (1986). Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J. Virol.* 60:589-598.
- Orlowski, J., Grinstein, S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* 447(5):549-65.
- Overbaugh, J., Miller, A. D., Eiden, M. V. (2001). Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65(3):371-89.
- Özel, M., Pauli, G., Gelderblom, H. R. (1988). The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* 100(3-4):255-66.
- Pal, R., Hoke, G. M., Sarngadharan, M. G. (1989). Role of oligosaccharides in the processing and maturation of envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:3384-8.
- Palmarini, M., Datta, S., Omid, R., Murgia, C., Fan, H. (2000). The long terminal repeat of Jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. *J. Virol.* 74(13):5776-87.
- Palmarini, M., Dewar, P., De las Heras, M., Inglis, N. F., Dalziel, R. G., Sharp, J. M. (1995). Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for jaagsiekte retrovirus. *J. Gen. Virol.* 76:2731-2737.
- Palmarini, M., Sharp, J. M., De las Heras, M., Fan, H. (1999). Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. *J. Virol.* 73:6964-6972.
- Papandreou, M. J., Fenouillet, E. (1997). Effect of various glycosidase treatments on the resistance of the HIV-1 envelope to degradation. *FEBS Lett.* 406(1-2):191-5.
- Perez, L. G., Hunter, E. (1987). Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein that block processing to gp85 and gp37. *J. Virol.* 61(5):1609-14.
- Perez-Caballero, D., Hatzioannou, T., Yang, A., Cowan, S., Bieniasz, P. D. (2005). Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity. *J. Virol.* 79(14):8969-78.
- Perron, H., Garson, J. A., Bedin, F., Beseme, F., Paranhos-Baccala, G., Komurian-Pradel, F., Mallet, F., Tuke, P. W., Voisset, C., Blond, J. L., Lalande, B., Seigneurin, J. M., Mandrand, B. (1997). Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:7583-7588.
- Pfeffer, S. R., Rothman, J. E. (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56:829-52.

- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A., Lindemann, D. (2003).** Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH dependent fusion process. *J. Virol.* 77:4722-4730.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. (1998).** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 282(5390):938-41.
- Piñon, J. D., Klasse, P. J., Jassal, S. R., Welson, S., Weber, J., Brighty, D. W., Sattentau, Q. J. (2003).** Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* 77(18):9922-30.
- Pinter, A., Honnen, W. J., Li, J. S. (1984).** Studies with inhibitors of oligosaccharide processing indicate a functional role for complex sugars in the transport and proteolysis of Friend mink cell focus-inducing murine leukemia virus envelope proteins. *Virology.* 136:196-210.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., Gallo, R. C. (1980).** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77(12):7415-9.
- Poignard, P., Saphire, E. O., Parren, P. W., Burton, D. R. (2001).** gp120: biologic aspects of structural features. *Annu. Rev. Immunol.* 19:253-274.
- Polonoff, E., Machida, C. A., Kabat, D. (1982).** Glycosylation and intracellular transport of membrane glycoproteins encoded by murine leukemia viruses. Inhibition by amino acid analogues and by tunicamycin. *J. Biol. Chem.* 257: 14023-8.
- Ponferrada, V. G., Mauck, B. S., Wooley, D. P. (2003).** The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Arch Virol.* 148(4):659-75.
- Preston, B. D., Poiesz, B. J., Loeb, L. A. (1988).** Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242(4882):1168-71.
- Puffer, B. A., Pöhlmann, S., Edinger, A. L., Carlin, D., Sanchez, M. D., Reitter, J., Watry, D. D., Fox, H. S., Desrosiers, R. C., Doms, R. W. (2002).** CD4 independence of simian immunodeficiency virus Envs is associated with macrophage tropism, neutralization sensitivity, and attenuated pathogenicity. *J. Virol.* 76(6):2595-605.
- Quigley, J., Burns, C., Anderson, M., Sabo, K., Lynch, E., Overbaugh, J., Abkowitz, J. (2000).** Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood.* 95:1093-1099.
- Quiñones-Kochs, M. I., Buonocore, L., Rose, J. K. (2002).** Role of N-linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response. *J. Virol.* 76(9):4199-211.
- Ragheb, J. A., Anderson, W. F. (1994).** pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry. *J. Virol.* 68(5):3220-31.
- Rai, S. K., DeMartini, J. C., Miller, A. D. (2000).** Retrovirus vectors bearing jaagsiekte sheep retrovirus Env transduce human cells by using a new receptor localized to chromosome 3p21.3. *J. Virol.* 74:4698-4704.
- Rai, S. K., Duh, F. M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M. I., Miller, A. D. (2001).** Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(8):4443-8.
- Rasko, J. E., Battini, J. L., Gottschalk, R., Mazo, I., Miller, A. (1999).** The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:2129-2134.
- Rasko, J. E., Battini, J. L., Kruglyak, L., Cox, D. R., Miller, A. D. (2000).** Precise gene localization by phenotypic assay of radiation hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(13):7388-92.

- Redmond, S., Peters, G., Dickson, C. (1984).** Mouse mammary tumor virus can mediate cell fusion at reduced pH. *Virology*. 133:393-402.
- Reus, K., Mayer, J., Sauter, M., Zischler, H., Muller-Lantzsch, N., Meese, E. (2001).** HERV-K(OLD): ancestor sequences of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J. Virol.* 75:8917-8926.
- Rothman, J. E., Lodish, H. F. (1977).** Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature*. 269(5631):775-80.
- Ritter, G. D. Jr., Mulligan, M. J., Lydy, S. L., Compans, R. W. (1993).** Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology*. 197(1):255-64.
- Rizvi, T. A., Panganiban, A. T. (1993).** Simian immunodeficiency virus RNA is efficiently encapsidated by human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 67(5):2681-8.
- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernández-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. (1998).** A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*. 19;280(5371):1949-53.
- Ross, S. R. (2009).** Are viruses inhibited by APOBEC3 molecules from their host species? *PLoS Pathog.* 5:e1000347.
- Ross, S. R., Schofield, J. J., Farr, C. J., Bucan, M. (2002).** Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(19):12386-90.
- Rous, P. (1911).** A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from tumor cells *J. Exp. Med.* 13:397-411.
- Sambrook et al. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. *Cold Spring harbour laboratory, New York*
- Samuelson, L. C., Phillips, R. S., Swanberg, L. J. (1996).** Amylase gene structures in primates: retroposon insertions and promoter evolution. *Mol Biol Evol.* 13(6):767-79.
- Sanders, D. A. (2000).** Sulfhydryl involvement in fusion mechanisms, in: Hilderson, H., Fuller, S. (Eds.), *Fusion of Biological Membranes and Related Problems, Kluwer Academic/Plenum, New York*, pp. 483-514.
- Sanger, F., Nicklein, S., Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-7.
- Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Afting, M., Schommer, S., Seitz, G., Hartmann, M., Mueller-Lantzsch, N. (1996)** Specificity of antibodies directed against Env protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res.* 56(19):4362-5.
- Sauter, M., Schommer, S., Kremmer, E., Remberger, K., Dölken, G., Lemm, I., Buck, M., Best, B., Neumann-Haefelin, D., Mueller-Lantzsch, N. (1996).** Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J. Virol.* 69, 414-421.
- Schlegel, R., Tralka, T. S., Willingham, M. C., Pastan, I. (1983).** Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell.* 32(2):639-46.
- Schultz, A. M., Oroszlan, S. (1979).** Tunicamycin inhibits glycosylation of precursor polyprotein encoded by env gene of Rauscher murine leukemia virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86: 1206-13.
- Sfakianos, J. N., Hunter, E. (2003).** M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic.* 4:671-680.
- Shacklett, B. L., Shaw, K. E., Adamson, L. A., Wilkens, D. T., Cox, C. A., Montefiori, D. C., Gardner, M. B., Sonigo, P., Luciw, P. A. (2002).** Live, attenuated simian immunodeficiency virus SIVmac-M4, with point mutations in the Env transmembrane protein intracytoplasmic domain, provides partial protection from mucosal challenge with pathogenic SIVmac251. *J. Virol.* 76(22):11365-78.

- Shacklett, B. L., Weber, C. J., Shaw, K. E., Keddie, E. M., Gardner, M. B., Sonigo, P., Luciw, P. A. (2000).** The intracytoplasmic domain of the Env transmembrane protein is a locus for attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac in rhesus macaques. *J. Virol.* 74(13):5836-44.
- Shih, Y. J., Baynes, R. D., Hudson, B. G., Flowers, C. H., Skikne, B. S., Cook, J. D. (1990).** Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J. Biol. Chem.* 265(31):19077-81.
- Simmons, G., Reeves, J. D., Hibbitts, S., Stine, J. T., Gray, P. W., Proudfoot, A. E., Clapham, P. R. (2000).** Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunol Rev.* 177:112-26.
- Smit, A. F. (1999).** Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9(12), 657-663
- Sommerfelt, M. A., Petteway, S. R. Jr., Dreyer, G. B., Hunter, E. (1992).** Effect of retroviral proteinase inhibitors on Mason-Pfizer monkey virus maturation and transmembrane glycoprotein cleavage. *J. Virol.* 66(7):4220-7.
- Song, B. (2009).** TRIM5alpha. *Curr Top Microbiol Immunol.* 339:47-66.
- Song, B., Javanbakht, H., Perron, M., Park, D. H., Stremlau, M., Sodroski, J. (2005).** Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates. *J. Virol.* 79(7):3930-7.
- Song, C., Dubay, S. R., Hunter, E. (2003).** A tyrosine motif in the cytoplasmic domain of mason-pfizer monkey virus is essential for the incorporation of glycoprotein into virions. *J. Virol.* 77(9):5192-200.
- Song, C., Micoli, K., Bauerova, H., Pichova, I., Hunter, E. (2005).** Amino acid residues in the cytoplasmic domain of the Mason-Pfizer monkey virus glycoprotein critical for its incorporation into virions. *J. Virol.* 79(18):11559-68.
- Steck, F. T., Rubin, H. (1966).** The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference. *Virology.* 29(4):642-53.
- Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., Lamonica, C. A. (1990).** HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *Embo J.* 9(5):1551-60.
- Stoye, J. P. (2001).** Endogenous retroviruses: still active after all these years? *Curr Biol.* 13; 11 (22):R914-6.
- Suomalainen, M., Liljeström, P., Garoff, H. (1992).** Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *J. Virol.* 66(8):4737-47.
- Taylor, C., Nouri, A., Lee, C., Kozak, C., Kabat, D. (1999).** Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:927-932.
- Taylor, C., Nouri, A., Zhao, Y., Takeuchi, Y., Kabat, D. (1999).** A sodiumdependent neutral-amino-acid transporter mediates infection of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses. *J. Virol.* 73:4.
- Taylor, C., Willett, B., Kabat, D. (1999).** A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J. Virol.* 73:6500-6505.
- Takeuchi, Y., Vile, R., Simpson, G., O'Hara, B., Collins, M., Weiss, R. (1992).** Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 66:1219-1222.
- Tarlinton, R. E., Meers, J., Young, P. R. (2006).** Retroviral invasion of the koala genome. *Nature.* 442(7098):79-81.
- Tarlinton, R., Meers, J., Young, P. (2008).** Biology and evolution of the endogenous koala retrovirus. *Cell Mol Life Sci.* 65(21):3413-21.
- Taylor, G. M., Sanders, D. A. (1999).** The role of the membrane-spanning domain sequence in glycoprotein-mediated membrane fusion. *Mol. Biol. Cell.* 10, 2803-2815.

- Teich, N. (1984).** Taxonomy of Retroviruses. In: Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J. (Eds.), RNA Tumor Viruses, vol. 1. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, pp. 25-207.
- Temin, H. M. (1989).** Retrovirus variation and evolution. *Genome* 31:17-22.
- Temin, H. M., Mizutani, S. (1970).** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature. JID* - 0410462 226, 1211-1213.
- Tönjes, R. R., Limbach, C., Löwer, R., Kurth, R. (1997).** Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J. Virol.* 71:2747-2756.
- Tristem, M. (2000).** Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J. Virol.* 74:3715-30.
- Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M. I., Kidd, K. K., Lenz, J. (2001).** Insertional polymorphisms of full-length endogenous retrovirus in humans. *Curr. Biol.* 11, 1531-1535.
- Van Nie, R., Verstraeten, A. A., De Moes, J. (1977).** Genetic transmission of mammary tumour virus by GR mice. *Int. J. Cancer.* 19(3):383-90.
- Van Regenmortel, International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), International Union of Microbiological Societies. Virology Division. (2000).** Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *San Diego: Academic Press.*
- Venter, J. C. ; Adams, M. D. ; Myers, E. W. ; Li, P. W. ; Mural, R. J. ; Sutton, G. G., et al. (2001).** The sequence of the human genome. *Science.* 291(2):1304-1351.
- Verschoor, E. J., Hulskotte, E. G., Ederveen, J., Koolen, M. J., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. (1993):** Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. *Virology* 193:433-8.
- Vigerust, D. J., Shepherd, V. L. (2007).** Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol.* 15(5):211-8.
- Villesen, P., Aagaard, L., Wiuf, C., Pedersen, F. S. (2004).** Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology.* 1:32.
- Vogt, V. M. (1997).** Retroviral virions and genomes. In: Coffin, J. M., Huges, S. H., Varmus, H. E.: Retroviruses. *Cold Spring Harbour Laboratory, Old Spring Harbour.* p.843.
- Walter, P., Lingappa, V. R. (1986).** Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2:499-516.
- Wang, E., Albritton, L., Ross, S. R. (2006).** Identification of the segments of the mouse transferrin receptor 1 required for mouse mammary tumor virus infection. *J. Biol. Chem.* 281(15):10243-9.
- Wang, H., Kavanaugh, M., North, R., Kabat, D. (1991).** Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature.* 352:729-731.
- Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Jian, B., Epp, L., Lu, D. W., Johanning, G. L. (2003).** Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Onkogene.* 22(10):1528-35.
- Wang-Johanning, F., Frost, A. R., Johanning, G. L., Khazaeli, M. B., LoBuglio, A. F., Shaw, D. R., Strong, T. V. (2001).** Expression of human Endogenous Retrovirus K Envelope Transcripts in Human Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 1553-1560.
- Weiss, R. (1982).** Experimental biology and assay of RNA tumor viruses, In R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin (ed.), RNA tumor viruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.* 1:209-260.

- Weiss, R. A. (1992).** Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry, J. A. Levy (ed.), The retroviruses. *Plenum Press, New York, N.Y.* 2:1-108.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., Wiley, D. C. (1997).** Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature.* 387(6631):426-30.
- Welman, M., Lemay, G., Cohen, E. A. (2007).** Role of envelope processing and gp41 membrane spanning domain in the formation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion-competent envelope glycoprotein complex. *Virus Res.* 124(1-2):103-12.
- White, S. M., Renda, M., Nam, N. Y., Klimatcheva, E., Zhu, Y., Fisk, J., Halterman, M., Rimel, B. J., Federoff, H., Pandya, S., Rosenblatt, J. D., Planelles, V. (1999).** Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J. Virol.* 73(4):2832-40.
- Wiley, R. L., Bonifacino, J. S., Potts, B. J., Martin, M. A., Klausner, R. D. (1988).** Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85(24):9580-4.
- Williams, K. J., Loeb, L. A. (1992).** Retroviral reverse transcriptases: error frequencies and mutagenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 176:165-80.
- Wills, J. W., Srinivas, R. V., Hunter, E. (1984).** Mutations of the Rous sarcoma virus env gene that affect the transport and subcellular location of the glycoprotein products. *J. Cell. Biochem.* 99: 2011-2023.
- Wootton, S. K., Metzger, M. J., Hudkins, K. L., Alpers, C. E., York, D., DeMartini, J. C., Miller, A. D. (2006).** Lung cancer induced in mice by the envelope protein of jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) closely resembles lung cancer in sheep infected with JSRV. *Retrovirology.* 3:94.
- Wang, E., Albritton, L., Ross, S. R. (2006).** Identification of the segments of the mouse transferrin receptor 1 required for mouse mammary tumor virus infection. *J. Biol. Chem.* 281(15):10243-9.
- Wang, F., Grigorieva, E. V., Li, J., Senchenko, V. N., Pavlova, T. V., Anedchenko, E. A., Kudryavtseva, A. V., Tsimanis, A., Angeloni, D., Lerman, M. I., Kashuba, V. I., Klein, G., Zabarovsky, E. R. (2008).** HYAL1 and HYAL2 inhibit tumour growth in vivo but not in vitro. *PLoS One.* 3(8):e3031.
- Wyatt, R., Sodroski, J. (1998).** The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884–1888.
- Wyss, S., Dimitrov, A. S., Baribaud, F., Edwards, T. G., Blumenthal, R., Hoxie, J. A. (2005).** Regulation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion by a membrane-interactive domain in the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* 79(19):12231-41.
- Xiong, Y., Eickbush T. H. (1990).** Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9:3353–3362.
- Xu, G., Solaiman, F., Zink, M. A., Hodgson, C. P. (2000).** Fusogenic effects of murine retroviruses and cationic enhancers of transduction. *Cancer Gene Ther.* 7(1):53-8.
- Yang, C., Compans, R. W. (1996).** Analysis of the cell fusion activities of chimeric simian immunodeficiency virus-murine leukemia virus envelope proteins: inhibitory effects of the R peptide. *J. Virol.* 70:248-254.
- Yang, C., Compans, R. W. (1997).** Analysis of the murine leukemia virus R peptide: delineation of the molecular determinants which are important for its fusion inhibition activity. *J. Virol.* 71:8490-8496.
- Yang, Y. L., Guo, L., Xu, S., Holland, C., Kitamura, T., Hunter, K., Cunningham, J. (1999).** Receptors for polytropic and xenotropic mouse leukaemia viruses encoded by a single gene at Rmc1. *Nat. Genet.* 21:216-219.
- Yee, J. K., Friedmann, T., Burns, J. C. (1994).** Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* 43 Pt A:99-112.

- Yin, P. D., Hu, W. S. (1997).** RNAs from genetically distinct retroviruses can copackage and exchange genetic information in vivo. *J. Virol.* 71(8):6237-42.
- York, D. F., Vigne, R., Verwoerd, D. W., Querat, G. (1992).** Nucleotide sequence of the jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. *J. Virol.* 66(8):4930-9.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., Hinuma, Y. (1982).** Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79(6):2031-5.
- Yoshikawa, R., Sato, E., Igarashi, T., Miyazawa, T. (2010).** Characterization of RD-114 virus isolated from a commercial canine vaccine manufactured using CRFK cells. *J. Clin. Microbiol.* 48(9):3366-9.
- Yu, X., Yuan, X., McLane, M. F., Lee, T. H., Essex, M. (1993).** Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* 67(1):213-21.
- Zachara, N. E., Hart, G. W., Cole, R. N., Gao, Y. (2002).** Detection and analysis of proteins modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 17:Unit 17.6.
- Zavala, G., Pretto, C., Chow, Y. H., Jones, L., Alberti, A., Grego, E., De las Heras, M., Palmarini, M. (2003).** Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. *Virology.* 312(1):95-105.
- Zhang, Y., Rassa, J. C., de Obaldia, M. E., Albritton, L. M., Ross, S. R. (2003).** Identification of the receptor binding domain of the mouse mammary tumor virus envelope protein. *J. Virol.* 77(19):10468-78.
- Zhao, H., Lindqvist, B., Garoff, H., von Bonsdorff, C. H., Liljeström, P. (1994).** A tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the alphavirus envelope protein is essential for budding. *EMBO J.* 13(18):4204-11.

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide

8.1.1 Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz (5' → 3')
coEnv/ oricoEnv-Sequenzierungsprimer:	
Seq-Primer_coEnv_SGM_F	CGGCATGAGCCTGCGGCCAG
Seq-Primer_coEnv_AVD_R	GGTCAGGTCGCTGTCCACGG
Seq-Primer_coEnv_LLT_F	CTGCTGACCTGCATCGACAGC
Seq-Primer_coEnv_SGS_R	CTGGTCGATGCTGCTCTGGCT
Seq-Primer_coEnv_LVP_F	CTGGTGCCCGGCACCGAGG
oricoEnv-IgG-Sequenzierungsprimer:	
IgG-fc_R	GGTGCCCCCGCGAGTTCAGGTGC
Antibiotika-Sequenzierungsprimer:	
Seq_Neo_F	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC
Seq_Zeo_F	AAGTTGACCAGTGCCGTTCC
eGFP-Sequenzierungsprimer:	
pEGFP_Seq_F	GTCGTAACAACCTCCGCCCAT
pEGFP_Seq_R	TCGCCGTCCAGCTCGACCAG
Luciferase-Sequenzierungsprimer:	
SeqLuci140_F	TCGAGGTGGACATCACTTAC
SeqLuci737_R	CCGTGATGGAATGGAACAAC
MMTV_Env-Sequenzierungsprimer:	
1244_MMTV-SU_F	CCGCTATCATTGTGAAGAGG
1629_MMTV-TM_R	GTGGCACCTAGTAGACATTC
458_MMTV-SU_F	AGTCAGACACCCTGCCTATC
858_MMTV-SU_R	ATCTGACTGGTCCACTGATG
JSRV_Env-Sequenzierungsprimer:	
1373_JS RV-TM_F	AGCAGGTGCAGAGCATTAAAC
1601_JS RV-TM_R	TCGGCGATATTCAGAGTAGC
599_JS RV-SU_F	GCATTGGGATCGGAATTGAC
827_JS RV-SU_R	CTATTCCCATGGCCGAAAGC
HumanIgG-Sequenzierungsprimer:	
IgG-fc_R	GGTGCCCCCGCGAGTTCAGGTGC
Rezeptorsequenzierungsprimer:	
Seq_fcTfR1_F	GAGGGCTATGTGGCATAACAG
Seq_fcTfR1_R	GAGACTGCCAGTAACTGG
Seq_hsTfR1_F	TGTGGCGTATAGTAAGGC
Seq_hsTfR1_R	CTTATAGGTGTCCATGGTGG
Vektorsequenzierungsprimer:	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG
CMV_F	GCGTGGATAGCGGTTTACTC
M13_F	GTAACAACGACGGCCAG
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC
Seq_EF1a_F	GTTGCCATCCACCAAGAAGG
Seq_EF1a_R	CGTTCACGGCGACTACTGCA
SeqEf1a462_F	CGCTGCTTTCGATAAGTCTC
oriHERV-K-Sequenzierungsprimer:	
113RT_Sec1_For	CAGCCACCAGGTTTCAG
113RT_Sec3_For	GAACAAGTTAGACAAG
3CV	CTGTGTCCTAATGCATTATGG
3HERV-SDa	TAGCTTCTCCGAGCGCACAAGCTTACC
3HERV-SDb	TACCGTAAGGCTGACTGTAGACGTACTC

Name	Sequenz (5' → 3')
zu oriHERV-K-Sequenzierprimer:	
AM_For	GCCATGATGACGATGGTGGT
Env_Rev	AGAGCACGGGGTTGGGGGTAAGGTCATAG
EnvSeq_F	AGAACAGCCCACATGAAGGA
H_Seq_E	TGCCGTAGGATTAAGTCTC
HL_F	ATCTGGTGCCCAACGTG
Pol_Stop_F	TTCCCAAGGACAGGCCATAG
Seq_113_A	CCTCTTCCAGCAGGTCAG
Seq_113_B	GCTTAATGGCTGATTGACAC
Seq_H113_C	TAGCGGCCACTGATTTAC
Seq_H_113_D	CTTAGGGCCAGATAATCAAG

Tabelle 25: Sequenzierungsprimer mit den jeweiligen Sequenzangaben.

8.1.2 Mutageneseprimer

Mutationsort	Primernamen	Sequenz (5' → 3')
HERV-K	coEnv_I125V	AACCCCATCGAGGTCTACGTGAACGAC
coEnv	coEnv_C140R	GTGCCAGGCCCCATCGACGACCGCTGCCCCGCCAAGC CC
	coEnv_L262I	ACAACGAGTTCGGCACCATTATCGACTGGGCCCCCAG
	coEnv_A323P	GGGATATCCACCCCCAGGCCCAAGATCGTCAGCCCCG TGAGCGGC
	coEnv_N506K	GTGAACGACTGGCAGAAAACAGCACCCGG
	coEnv_C577R	GACATGGTGCGGCGCCACCTGCAGGGC
	coEnv_T626P	GCCAACCTGAACCCCGTGACATGGGTG
	coEnv_Y655C	CTGCTGCTGGTGTGTGCGGTGCACCCAG
HERV-K	oricoEnv_ΔCS1384	GTGCTGAAGGGCGTGCTGAACGCAAGCGCGGCGTTCA TCTTTACCCTGATCGCC
oricoEnv	oricoEnv_MMTV1387	GTGCTGAAGGGCGTGCTGAACAGAGCCAAGCGGTTCA TCTTTACCCTGATC
	ΔGly1_oricoEnv_SU304	GCGGCTGCCAACTACGCCTACTGGGCCTACG
	ΔGly2_oricoEnv_SU463	ATGATGATCAACATCGCCATCGGCTACAGATA
	ΔGly3_oricoEnv_SU826	TTCTACCACAACCTGCGCCGCCAGACCCAGAG
	ΔGly4_oricoEnv_SU1120	ATCGACCTGAACAGCGCCCTGACCGTGCCCCCT
	ΔGly5_oricoEnv_TM1525	TGGCAGAAAACAGCGCCCCGCTGTGGAACA
	ΔGly6_oricoEnv_TM1666	TGCGACTGGAACACCGCCGATTTCTGCATCAC
	ΔGly7_oricoEnv_TM1702	CAGATCTACAACGAGGCCGAGCACCCTGGGA
	ΔGly8_oricoEnv_TM1759	CGGGAGGACAATCTGGCCCTGGACATCAGCA
	oricoEnvΔ659-699_1975	GTGTGTGCGGTGCACCTAGCAGCTGCGGAGAG
	oricoEnvΔ680-699_2038	ATGGTGGTGTGCTGCTAGCGGAAGGGCGGCA
	oricoEnvΔ693-699_2077	AAGAGCAAGCGGGACTAGATCGTGACCGTGA
JSRV_coEnv	JSRVEnvStopp_F	GGAGACGATCCTTAGGCCGCATCTGG
MMTV_coEnv	MMTVEnvStopp_F	GTGTCATACACATAGGCCGCAAGCGG
	MMTVEnv_F138A_F	CGGCAGCCCCGATGCTCACGGCTTCCGC
oriHERV-K	SD1_Mut_oriK113_F	ACAGTCAGCCTTACGATAAGCTTGTGCGCTC
	SD2_Mut_oriK113_F	CTTGATGATTGTATCAATGGGGGAAAGTCTCCCTATG CCTGCAG
	ΔAgeI_oriBCD_F	CGTATTGGGCGCTCTTCCGGTTCCTCGCTCA
	MutAgeI01_oriBCD_F	GCTAACTATACCTACCGTCCCTATGTGCCTTCC
	MutAgeI02_oriBCD_F	AGCGACCATCGAGAACCGGTCATGATGACGATGGTG
EF-1α-Promoter	ΔAgeI_EF-1α_F	GGGGTCCGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAA

Tabelle 26: Primernamen und -sequenzen für Mutagenesen mit Angabe des zu mutierenden Zielgens.

8.1.3 Klonierungsprimer

Genamplifikation	Zielvektor	Primernamen	Sequenz (5' → 3')
eGFP/ Luziferase/ Zeocin/ Neomycin eGFP	CMVoriHERV-K	AgeI_EF1a_F	CAGTGAACCGGTCTAGCTTCG TGAGGCTCC
	pBudEF1α_ΔAgeI	PCR_NotI_eGFP_F	ACTACAGCGGCCGCATGGTG AGCAA
		PCR_XhoI_eGFP_R	GCGTCAACCTCGAGTTACTTG TACAGCTCG
Luziferase	pBudEF1α_ΔAgeI	eGFP_AgeI_R	GACTGCAGACCGGTTTACTTG TACAGCTCGTCC
		Luci_NotI_F	GCTAACGCGGCCGCATGGAA GACGCCAAAAAC
		Luci_XhoI_R	GTCGACCTCGAGTTACACGGC GATCTTTCC
Zeocin	pBudEF1α_ΔAgeI	Luci_AgeI_R	TGTCAAACCGGTTTACACGGC GATCTTTCC
		Zeo_NotI_F	GGTCGCGGCCGCATGGCCAA GTTGACCAGTGC
		Zeo_XhoI_R	CAGATCTCTCGAGTCAGTCCT GTCCTCGGCC
Neomycin	pBudEF1α_ΔAgeI	Zeo_AgeI_R	CATCATGACCGGTTTCAGTCCT GTCCTCGGCC
		Neo_NotI_F	GGTCGCGGCCGCATGATTGAA CAAGATGG
		Neo_XhoI_R	GATCTCTCGAGTCAGAAGAAC TCGTCAAG
hsTfR1	pcDNA3.1_V5	Neo_AgeI_R	CATCATGACCGGTTTCAGAAGA ACTCGTCAAG
		EcoRI_hsTfR1_F	GATGAGAATTCATGATGGAT CAAGCTAG
fcTfR1	pcDNA3.1_V5	NotI_hsTfR1_R	GTGAGCGGCCGCAAACCTCATT GTCAATG
		EcoRI_fcTfR1_F	TCCAGTGAATTCATGATGGAT CAAGCCAG
Human IgG-fc	pcDNA3.1	NotI_fcTfR1_R	GGTAGCGGCCGCAAACCTCATT GTCAATATC
		XhoI_IgG-fc_F	GCGGCTCGAGCAGGTGACAA AACTCACACATGC
oricoEnvSU/TM1234	pcDNA3.1-IgG-fc	XbaI_IgG-fc_R	CGCACTTCTAGATCATTTACC CGGAGACAGG
		EcoRI_oricoEnv_F	CGTCCAGAATTCATGAACCCC AGCGAGATGC
		XhoI_oricoEnvCITM1_R	CCTGCTCGAGCCGCTTTACC CATGTCACGGG
		XhoI_oricoEnvCITM2_R	CCTGCTCGAGCCGCGGGGTTT AGGTTGGCCAG
		XhoI_oricoEnvCITM3_R	CCTGCTCGAGCCGCCAGGCCG TCGGCCACCCC
XhoI_oricoEnvCITM4_R	CCTGCTCGAGCCGCATTTAAA TGGGCCTTGCTG		

Tabelle 27: Primernamen und -sequenzen für Klonierungen mittels PCR-Amplifikation.

8.2 Sequenzen

8.2.1 oricoEnv- Sequenz

ATGAACCCCAGCGAGATGCAGCGGAAGGCCCTCCCAGGCGGCGGAGACACCGGAACAGA
GCCCCCTGACCCACAAGATGAACAAGATGGTGACCAGCGAGGAACAGATGAAGCTGCC
AGCACCAAGAAGGCCGAGCCCCCACCTGGGCCAGCTGAAGAAGCTGACCCAGCTGGCC
ACCAAGTACCTGGAACACCAAGGTGACCCAGACCCCGAGAGCATGCTGCTGGCCGCC
CTGATGATCGTGAGCATGGTGGTGTCCCTGCCATGCCTGCCGGCGCCGCGGCTGCCAAC
TACACCTACTGGGCCTACGTGCCCTTCCCCCCCCTGATCCGGGCCGTGACCTGGATGGAC
AACCCCATCGAGGTCTACGTGAACGACAGCGTGTGGGTGCCAGGCCCCACCGACGACCGC
TGCCCCGCAAGCCCGAGGAAGAGGGCATGATGATCAACATCAGCATCGGCTACAGATAC
CCCCCATCTGCCTGGGCAGGGCCCCTGGCTGCCTGATGCCCGCCGTGCAGAACTGGCTG
GTGGAGGTGCCACCGTGAGCCCCATCAGCCGGTTACCTACCACATGGTGTCCGGCATG
AGCCTGCGGCCCAGGGTTAACTACCTGCAGGACTTCAGCTACCAGCGGAGCCTGAAGTTC
CGGCCAAGGGCAAGCCCTGCCCAAAGAGATCCCCAAAGAGTCCAAGAACACCGAGGTG
CTGGTGTGGGAGGAATGCGTGGCCAACAGCGCCGTGATCCTGCAGAACACGAGTTCGGC
ACCATTATCGACTGGGCCCCAGGGGCCAGTTCTACCACAACTGCAGCGGCCAGACCCAG
AGCTGCCCCAGCGCCAGGTGTCCCCTGCCGTGGACAGCGACCTGACCGAGAGCCTGGAC
AAGCACAAGCACAAAAGCTGCAGAGCTTCTACCCCTGGGAGTGGGGCGAGAAGGGGATA
TCCACCCCAGGCCAAGATCATCAGCCCCGTGAGCGGCCCTGAGCACCCCGAGCTGTGG
CGGCTGACCGTGGCCAGCCACCACATCCGGATCTGGTCCGGCAACCAGACCCTGGAAACC
CGGGACCGGAAGCCCTTCTACACCATCGACCTGAACAGCAGCCTGACCGTGCCCCTGCAG
AGCTGCGTGAAGCCCCCTACATGCTGGTGGTGGGCAACATCGTGATCAAGCCGACAGC
CAGACCATCACCTGCGAGAACTGCCGGCTGCTGACCTGCATCGACAGCACCTTCAACTGG
CAGCACCGGATCCTGCTCGTACGGGCCAGGGAAGGCGTGTGGATCCCCGTGTCCATGGAC
CGGCCCTGGGAGGCCAGCCCCAGCGTGCACATCCTGACAGAGGTGCTGAAGGGCGTGCTG
AACAGAAGCAAGCGGTTTCTTTACCCTGATCGCCGTGATCATGGGCCTGATTGCCGTG
ACCGCCACAGCCCGCGTGGCCGGCGTGGCCCTGCACAGCTCTGTACAGAGCGTGAAC TTC
GTGAACGACTGGCAGAAAAACAGCACCCGGCTGTGGAACAGCCAGAGCAGCATCGACCAG
AAGCTGGCCAACCAGATCAACGACCTGCGGCAGACCGTGATTTGGATGGGCGACCGGCTG
ATGAGCCTGGAACACCGGTTCCAGCTGCAGTGCAGTGGAAACACCAGCGATTTCTGCATC
ACCCCCAGATCTACAACGAGAGCGAGCACCCTGGGACATGGTGCGGCGCCACCTGCAG
GGCCGGGAGGACAATCTGACCTGGACATCAGCAAGCTGAAAGAGCAGATCTTCGAGGCC
AGCAAGGCCCATTTAAATCTGGTGCCCGGCACCGAGGCCATCGCCGGGGTGGCCGACGGC
CTGGCCAACCTGAACCCCGTGACATGGGTGAAAACCATCGGCAGCACCACCATCATCAAC
CTGATCCTGATCCTGGTGTGCTGTTCTGCCTGCTGCTGGTGTGTGCGGTGCACCCAGCAG
CTGCGGAGAGACAGCGACCACCGGGAGCGGGCCATGATGACCATGGTGGTGTGTCCAAG
CGGAAGGGCGGCAACGTGGGCAAGAGCAAGCGGGACCAGATCGTGACCGTGAGCGTG

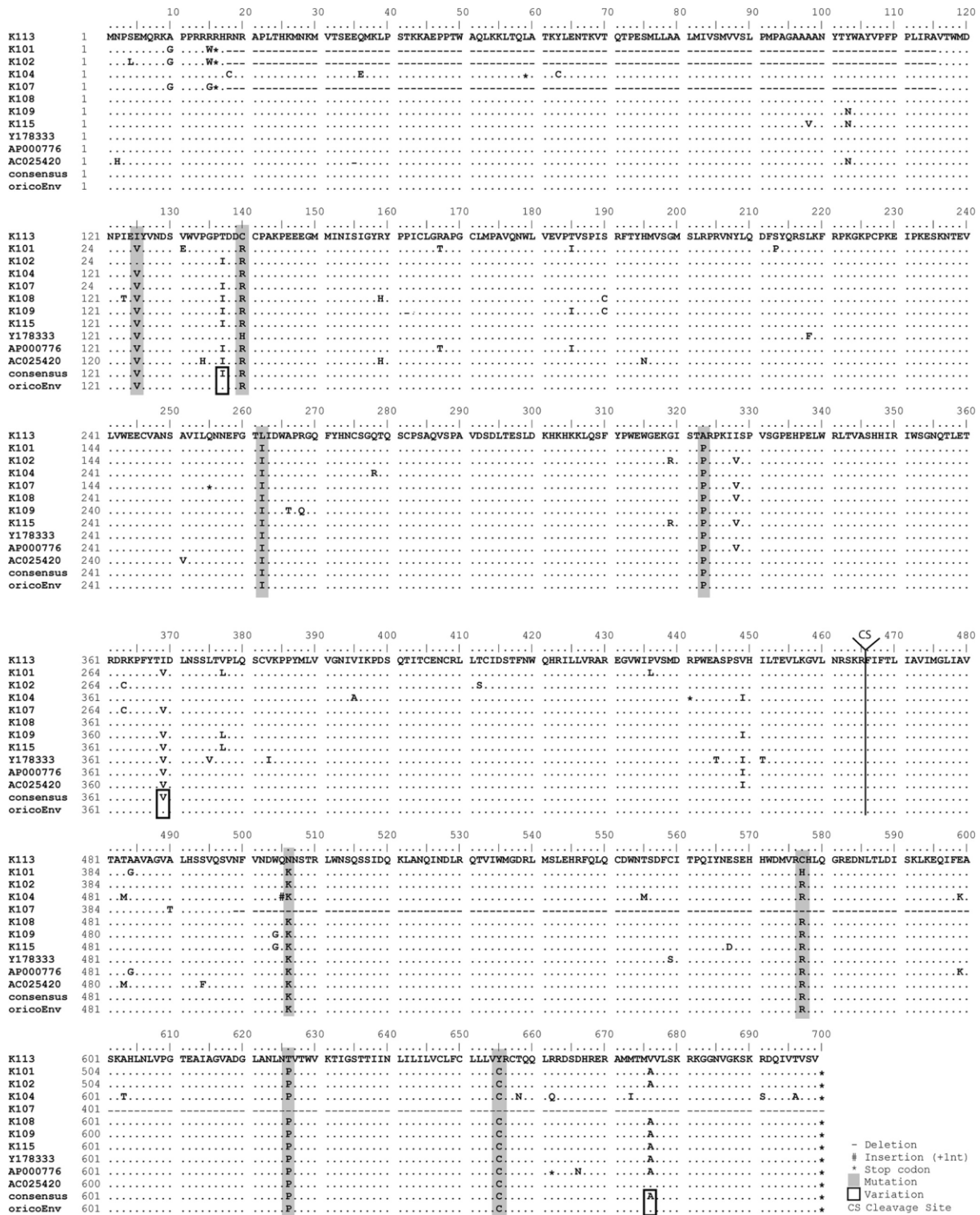


Abbildung 33: Sequenzvergleich zur Wiederherstellung eines funktionellen HERV-K113 Env. Die Aminosäuresequenzen von zehn humanspezifischen, hochkonservierten HERV-K(HML-2) Hüllproteinen (K101, [AF16460]; K102, [AF164610], K104, [AC116309]; K107, [AF164613]; K108, [AC072054]; K109, [AC055116]; K115, [AY037929]; Y178333; AP000776; AC025420) wurden mit HERV-K113 [AY037928] abgeglichen. Zusätzlich wurde eine Consensus Sequenz aus allen Elementen generiert und die oricoEnv-Sequenz aus der Identifizierung und Korrektur postinsertionaler Mutationen (grau hinterlegt). K113 spezifische Polymorphismen (schwarz eingerahmt) blieben unverändert und lagen vor, wenn mindestens zwei weitere provirale Env-Sequenzen an derselben Aminosäureposition wie HERV-K113 von der Consensus Sequenz abweichen. Abbildung aus Hanke *et al.*, 2009.

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	ausgeschriebene Langform
®	eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
A	Adenin
A. bidest	Aqua bidestillata
AK	Antikörper
ALV	<i>Avian Leukosis Virus</i>
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APOBEC3	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic Polypeptide 3
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASLV	<i>Avian Sarcoma and Leukosis Virus</i>
BAC	bacterial artificial chromosome
BaEV	<i>Baboon Endogenous Virus</i>
BLV	<i>Bovine Leukemia Virus</i>
BST-2	bone marrow stromal cell antigen 2
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
CA	Capsid
ca.	circa
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	cluster of differentiation 4
cfHyal2	<i>Canis familiaris</i> Hyaluronidase 2
CHR	C-terminale „heptad repeat“-Domäne
cLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
cm	Zentimeter
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
coEnv	codon-optimiertes Hüllprotein von HERV-K113
CrFK	Crandell feline kidney cells
CS	Spaltstelle (engl. cleavage site)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
cy3	Carbocyanin 3
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DDM	Dodecyl-β-D-maltosid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
Dol-P	Dolicholphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
ECL	engl. enhanced chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Abkürzung	ausgeschriebene Langform
EF1 α	human elongation factor 1 α -Promoter
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. enzyme linked immunosorbent assay)
enFeLV	<i>endogenes felines Leukämie Virus</i>
ENTV	<i>Enzootic Nasal Tumor Virus</i>
<i>env</i>	Hüllprotein-Gen (engl. envelope)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERV	Endogene Retroviren
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et altera</i>)
EtOH	Ethanol
exTM	extrapartikuläre Domäne des transmembranen Hüllproteins
FACS	fluorescence activated cell sorting
fcTfR1	<i>Felis catus</i> Transferrin Rezeptors 1
FeLIX	<i>Feline Leukemia Virus</i> infection X-cessory protein
FeLV	<i>Feline Leukemia Virus</i>
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigungskonstante 9.81 m/s ²
G	Guanin
GA	Glutaraldehyd
<i>gag</i>	gruppenspezifische Antigene
GALV	<i>Gibbon Ape Leukemia Virus</i>
GFP	green fluorescent protein
GlcNAc	N-Acetylglucosamine
Gly	Glykosylierung
gp120	Oberflächenglykoprotein von HIV
gp41	transmembranen Fusionsprotein von HIV
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
h	Stunde
HBS	HEPES buffer saline
<i>hel</i>	1,5 kb große Spleißvariante von HERV-K, Funktion unbekannt
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HERV	Humane Endogene Retroviren
HHV-8	<i>Human Herpesvirus Typ 8 (Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus)</i>
HIV	<i>Human Immundeficiency Virus</i>
HML	human MMTV-like
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
hsHyal2	<i>Homo sapiens</i> Hyaluronidase 2
hsTfR1	<i>Homo sapiens</i> Transferrin Rezeptor 1
hSGT	human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein
HTLV	<i>Human T-Cell Leukemia Virus</i>
Hyal2	Hyaluronidase 2
I	Isoleucin
IAPE	<i>Intracisternal A-Particle-Related Envelope-Encoding Element</i>
IgG	Immunglobulin G
IN	<i>Integrase</i>

Abkürzung	ausgeschriebene Langform
<i>in vitro</i>	im Glas
<i>in vivo</i>	im Lebendigen
ITCV	International Committee on Taxonomy of Viruses
JSRV	<i>Jaagsiekte Sheep Retrovirus</i>
K	Lysin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KoRV	<i>Koala Retrovirus</i>
l	Liter
L	Leucin
LTR's	long terminal repeats
m	Meter
M	Maßeinheit für die molare Masse
MA	Matrix
McERV	<i>Mus caroli Endogenous Retrovirus</i>
MEM	Minimum Essential Media
min	Minute
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
mmTfR1	<i>Mus musculus</i> Transferrin Rezeptors 1
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
mol	Maßeinheit für die Stoffmenge
MoMLV	<i>Moloney-Murine Leukemia Virus</i>
MPMV	<i>Mason-Pfizer Monkey Virus</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSD	membrandurchspannende Domäne (engl. membran spanning domain)
MuLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
N	Asparagin
N-terminal	Amino-terminal
NC	Nukleocapsid
NEAA	Non Essential Amino Acids
<i>nef</i>	negativer Regulationsfaktor (engl. negative regulatory factor)
NHR	N-terminalen „heptad repeat“-Domäne
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
oricoEnv	codon-optimiertes, originales Hüllprotein von HERV-K113 zum Zeitpunkt der Integration ins menschliche Genom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PBS	Primerbindungsstelle (engl. primer binding site)
PcEV	<i>Papio Cynocephalus Endogenous Retrovirus</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PERV	<i>Porcine Endogenous Retrovirus</i>
PFA	Paraformaldehyd
PK	Positivkontrolle

Abkürzung	ausgeschriebene Langform
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger
PNGaseF	N-Glycosidase F
<i>pol</i>	Polymerase-Gen
Poly(A)	Polyadenylierung
PPT	Polypurin-Trakt
<i>pro</i>	Protease-Gen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin
R	redundant
<i>rec</i>	Regulator der Expression bei HERV (engl. regulator of expression encoded by corf)
<i>rev</i>	Regulator der Expression bei HIV (engl. regulator of expression)
REV	<i>Avian Reticuloendotheliosis Virus</i>
RLU	Lumineszenz (engl. relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RSV	<i>Rous Sarkoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
S	Serin
SA	Spleißakzeptor
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SCF	Stammzellfaktor (engl. stem cell factor)
SD	Spleißdonor
SDS	Sodium Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SERV	<i>Simian Endogenous Retrovirus</i>
SHIV	<i>Simian/ Human Immunodeficiency Virus</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SIVmac	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> von Rhesusmakaken
SNV	<i>Spleen Necrosis Virus</i>
SP	Signalpeptid
SRV	<i>Simian Retrovirus</i>
ssRNA	einzelsträngige (engl. single stranded) Ribonukleinsäure
SU	Oberflächenglykoprotein (engl. surface unit)
t	Zeit
T	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<i>tat</i>	Transaktivator der Transkription (engl. transactivator of transcription)
<i>tax</i>	Regulator der Expression bei HTLV-1
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TfR1	Transferrin Rezeptor 1
T _{go}	<i>Thermococcus gorgonarius</i>
™	Trademark
TM	transmembrane Untereinheit (engl. transmembrane unit)
T _m	Schmelztemperatur

Abkürzung	ausgeschriebene Langform
Trim5 α	tripartite motif protein 5 alpha
Tris	Trihydroxymethylaminomethan/ Trometamol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
U	Unit
U3	unique 3'
U5	unique 5'
u.a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
ü. T.	über Tag
UZ	Ultrazentrifugation
V	Valin
V	Maßeinheit für die Spannung (Volt)
<i>vif</i>	viraler Infektiositätsfaktor (engl. viral infectivity factor)
VLPs	Virus-ähnliche Partikel (engl. virus like particles)
<i>vpr</i>	virales R-Protein (engl. viral protein R)
<i>vpu</i>	virales U-Protein (engl. viral protein U)
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
wtEnv	Wildtyp Hüllprotein von HERV-K113
X	beliebige Aminosäure
XMRV	<i>Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus</i>
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

8.4 Publikationsliste und Kongressbeiträge

Folgende Publikationen sind bisher aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Reconstitution of the Ancestral Glycoprotein of Human Endogenous Retrovirus K and Modulation of Its Functional Activity by Truncation of the Cytoplasmic Domain

Hanke, K.*; Kramer, P.*; Seeher, S.; Beimforde, N.; Kurth, R.; Bannert, N.

In: *J. Virol.* 83 (2009), Dec, S. 12790-12800.

(*gleichberechtigte Erstautoren)

Eine weitere Publikation zum Tropismus von HERV-K113 ist momentan in Bearbeitung.

Folgende Kongressbeiträge sind bisher aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Expression, Posttranslational Modification and Functional Characterization of the Envelope Protein of the Human Endogenous Retrovirus K113

Kramer, P., Hanke, K., Beimforde, N., Kurth, R., Bannert, N.

18th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV) in Heidelberg, Germany 2008

Improved Incorporation and Infectivity of HERV-K 113 Env Pseudotyped SHIV Particles by Truncation of the Cytoplasmic Tail

Kramer, P., Hanke, K., Kurth, R., Bannert, N.

19th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV) in Leipzig, Germany 2009

Reconstitution of the Ancestral Glycoprotein of Human Endogenous Retrovirus K and Modulation of Its Functional Activity by Truncation of the Cytoplasmic Domain

Kramer, P., Hanke, K., Seeher, S., Beimforde, N., Kurth, R., Bannert, N.

4th European Congress of Virology in Cernobbio, Italy 2010

8.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. Norbert Bannert für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, für seine Unterstützung während des gesamten Promotionszeitraums und die Diskussionsbereitschaft bei allen auftretenden Fragestellungen,

Prof. Dr. Reinhard Kurth, der als ehemalige Leiter des Robert Koch-Instituts die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat und stets großes Interesse bei Vorträgen in Rangsdorf oder im Plenum am Fortgang der Experimente gezeigt hat,

Prof Dr. Rupelt Mutzel, der freundlicher Weise die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und damit meine Promotion im Fachbereich Biologie an der Freien Universität Berlin erst ermöglicht hat,

Kazimierz Madela und dem gesamten ZBS 4: Schnelldiagnostik biologisch relevanter Erreger für die hervorragende technische Unterstützung,

der spitzen Arbeitsgruppe die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, ein hervorragendes Arbeitsklima geschaffen haben, mit der ich aber auch darüber hinaus viel Spaß hatte und ich immer mit Freude zurückblicken werde,

Dr. Kirsten Hanke für die mühevollen Stunden beim Durchlesen meiner Dissertationsentwürfe und die vielen kompetenten Hinweise,

mein herzlichster Dank gilt jedoch meiner Familie und Freundin!

8.6 Erklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 01. Dezember 2008 bis zum 28. Februar 2011 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 21. Juli 2011

Philipp Kramer