

**Etablierung eines Verfahrens zur Kombination der
Elektronenmikroskopie (EM) mit der Spitzenverstärkten
Raman-Spektroskopie (TERS) sowie Untersuchungen zum
Infektionsprozess und der Ultrastruktur des Humanen
Endogenen Retrovirus K (HERV-K)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

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

vorgelegt von

Veronika Lausch

im Juli 2013

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Angefertigt unter der Betreuung von PD Dr. Norbert Bannert

September 2009 bis Dezember 2012

Erster Gutachter: Prof. PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin

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

Tag der Disputation: 14.10.2013

Für meine Schwester

Am Strande

*Heute sah ich wieder dich am Strand
Schaum der Wellen dir zu Füßen trieb
Mit dem Finger grubst du in den Sand
Zeichen ein, von denen keines blieb.*

*Ganz versunken warst du in dein Spiel
Mit der ewigen Vergänglichkeit
Welle kam und Stern und Kreis zerfiel
Welle ging und du warst neu bereit.*

*Lachend hast du dich zu mir gewandt
Ahntest nicht den Schmerz, den ich empfand:
Denn die schönste Welle zog zum Strand
Und sie löschte deiner Füße Spur.*

(Marie Luise Kaschnitz, 1901 - 1974)

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
1.1 TEM-TERS	1
1.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie und Erregerdiagnostik	1
1.1.2 Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS)	3
1.1.2.1 Raman-Spektroskopie	3
1.1.2.2 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)	3
1.1.2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	3
1.1.3 Bioterroristische Angriffe	5
1.1.4 Pathogene Erreger und Stoffe als Biowaffen	6
1.2 HERV-K(HML-2)	7
1.2.1 Retroviren	7
1.2.1.1 Morphologie, Struktur und Genom der Retroviren	8
1.2.1.2 Replikationszyklus	11
1.2.2 Endogene Retroviren (ERV)	13
1.2.2.1 Humane endogene Retroviren (HERV)	14
1.2.2.2 Pathogenese und Nutzen von HERV	15
1.2.2.3 HERV-K113 als repräsentatives Element der HERV- K(HML-2)-Familie	17
<i>Genomischer Aufbau des Provirus von HERV-K113</i>	18
1.2.3 Antivirale Wirtsabwehr und akzessorische Proteine	19
1.2.3.1 TRIM5 α	23
1.2.4 Herstellung eines originalen HERV-K113 Moleklarklons	25
1.2.5 Studien zum Infektionspotential und Tropismus von HERV-K113	27
1.2.5.1 Infektiosität von HERV-K113	27
1.2.5.2 Tropismusstudien von HERV-K113	29
1.2.5 Zielsetzung	30

2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Geräte	32
2.1.2	Labormaterialien	34
2.1.3	Chemikalien, Enzyme und Größenstandards	35
2.1.4	Antibiotika	37
2.1.5	Puffer, Lösungen und Nährmedien	37
2.1.6	Kits	38
2.1.7	Bakterienstämme	39
2.1.8	Eukaryotische Zelllinien	39
2.1.9	Konstrukte/Vektoren	39
2.1.10	Oligonukleotide/Primer	40
2.1.11	Antikörper	40
2.1.12	Software	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Messungen der gängigen EM Substanzen und Materialien	42
2.2.2	Trägernetzchen	42
	2.2.2.1 Kupfer-Grids	42
	2.2.2.2 Silizium-basierte Grids	43
2.2.3	Präparation und Kontrastierung	43
	2.2.3.1 Präparation von Viren, Bakterien und anderen Mikroorganismen in Lösung	44
	<i>Negativkontrastierung</i>	46
	2.2.3.2 Präparation von Ultradünnschnitte auf Grids	47
	<i>Zellkultivierung für Ultradünnschnitt-Präparationen</i>	47
	<i>Zellpelletpräparation für eine Epon-Einbettung</i>	48
	<i>Trimmen und Schneiden der Präparate</i>	48
	<i>Positivkontrastierung</i>	48
2.2.4	Elektronenmikroskopie-Transmissionselektronenmikroskopie	49

2.2.4.2 Partikelzählung	49
2.2.5 Testsuspension	49
2.2.6 DNA-Analytik	50
2.2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
<i>Amplifikations-PCR</i>	51
<i>Mutagenese-PCR</i>	51
<i>Kolonie-PCR</i>	53
<i>Sequenzierungs-PCR</i>	54
2.2.6.2 Restriktion mit Endonukleasen	54
2.2.6.3 Ligation	55
2.2.6.4 DNA-Agarosegelelektrophorese	56
2.2.6.5 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten	57
<i>PCR-Aufreinigung</i>	57
<i>DNA-Extraktion aus einem Agarosegel</i>	57
<i>Maxi-Präparation</i>	58
<i>Mini-Präparation</i>	58
2.2.6.6 Herstellung kompetenter E.coli One Shot Top 10 und Stbl3	58
<i>Elektrokompetente E.coli</i>	58
<i>Chemischkompetente E.coli</i>	59
2.2.6.7 Transformation	60
2.2.6.8 DNA-Messung	60
2.2.7 Zellkultur	61
2.2.7.1 Zellkultivierung	61
2.2.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	61
2.2.7.3 Zellzahlbestimmung	62
2.2.7.4 Transfektion mittels Calciumphosphat	63
2.2.7.5 Herstellung pseudotypisierter HERV-K-Reporterviren	64
2.2.7.6 Aufreinigung von Zellkulturüberständen mittels Ultrazentrifugation	66

2.2.7.7 Infektion von Zellen	66
2.2.8 Protein-Analytik	67
2.2.8.1 Zelllyse/Proteinextraktion	67
2.2.8.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
2.2.8.3 Western Blot	68
2.2.8.4 Luziferase-Assay	69
2.2.8.5 Quantifizierung von Virusüberständen mittels RT-Aktivitäts-Assay	70
2.2.9 Statistische Berechnungen	70
3 Ergebnisse	71
3.1 TEM-TERS-Korrelation	71
3.1.1 Evaluation von gängigen EM-Materialien und Chemikalien für korrelative Raman-Spektroskopie und Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen	71
3.1.2 Silizium-basierte Grids (Si-Grids)	72
3.1.3 Vergleich der Adhäsionseigenschaften von Partikeln auf Pioloform- und Si-Grids	73
3.1.4 Steigerung der Adhäsionseigenschaften von SiN-Grids durch Beglimmung	75
3.1.4.1 Evaluationen von geeigneter Beglimmungsdauer und Stromstärke für die Beglimmung von SiN-Grids	75
3.1.4.2 Homogenisierung der Partikeladhäsion auf SiN-Grids	77
3.1.4.3 Einfluss von unterschiedlichen Waschsritten auf die Partikeladhäsion von SiN-Grids	79
3.1.4.4 Einfluss von unterschiedlichen Inkubationszeiten der Präparation auf die Partikeladhäsion von SiN-Grids	80
3.1.5 Erste Kopplungsversuche: TEM mit TERS	82
3.2 Charakterisierung und Infektionsstudien des Retrovirus HERV-K113 aus der HERV-K(HML-2)-Familie	85

3.2.1	Herstellung eines originalen HERV-K113 Moleklarklons	85
3.2.2	Untersuchungen der verschiedenen HERV-K113 Moleklarklone auf Morphologie, Proteinexpression und RT-Aktivität	87
3.2.3	Replikationsstudie mit CMVRU5 ori _{st} HERV-K113	89
3.2.4	Identifikation einer möglichen Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition von HERV-K113	91
3.2.4.1	Infektion von humanen Zelllinien mit HERV-K113	93
3.2.4.2	Infektion von tierischen Zelllinien mit HERV-K113	97
3.2.5	Untersuchung des Einfluss von TRIM5 α auf die HERV-K113 Inhibition	99
3.2.6	Einfluss von akzessorischen Proteinen auf die Inhibition von HERV-K113	106
4	Diskussion	109
4.1	TEM-TERS-Korrelation	109
4.1.1	EM-Substanzen und andere EM-Materialien	109
4.1.2	Silizium-basierte Grids	110
4.1.2.1	Optimierung durch Beglimmung der SiN-Grids	112
4.1.2.2	Optimierung der Waschschrirte bei den SiN-Grids	114
4.1.2.3	Optimierung der Inkubationsdauer bei den SiN-Grids	114
4.1.3	TERS-Spektrum	115
4.2	Charakterisierung und Infektionsstudien des HERV-K113	118
4.2.1	Die Rolle der synonymen Mutationen in HERV-K113	118
4.2.2	Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition von HERV-K113	118
5	Zusammenfassung	131
6	Summary	132
7	Anhang	133
7.1	Sequenzprimer	133
7.2	HERV-K113	133

7.2.1	Revertierte nicht synonyme postinsertionale Mutationen und LTR-Mutationen	138
7.2.2	Revertierte synonyme postinsertionale Mutationen und LTR-Mutationen	138
7.3	Reporterkonstrukte	139
8	Abbildungsverzeichnis	147
9	Tabellenverzeichnis	149
10	Formelverzeichnis	151
11	Abkürzungsverzeichnis	152
12	Literatur	157
13	Danksagung	171
14	Eigenständigkeitserklärung	172
	Lebenslauf	173
	Publikationsliste	175

1 Einleitung

1.1 TEM-TERS

1.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie und Erregerdiagnostik

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine mikroskopische Technik, bei welcher ein elektrischer Strahl ein Objekt durchdringt oder von diesem abgelenkt wird und damit eine Abbildung des Objekts durch die Elektronenstrahlen ermöglicht. Im Elektronenmikroskop (EM) besteht ein Vakuum, damit die Elektronen nicht von Luftmolekülen abgelenkt werden. Die zu analysierenden Objekte müssen sehr dünn sein, damit die Elektronen sie durchdringen können und ein Abbild erzeugt werden kann. Dieses Bild kann anschließend durch einen Sensor (z.B. CCD-Kamera) detektiert werden. Das erste TEM wurde von Max Knoll und Ernst Ruska im Jahr 1931 gebaut, 1933 mit einer höheren Auflösung, als das Lichtmikroskop weiterentwickelt und war 1939 erstmals kommerziell zu erwerben. Die Verwendungsmöglichkeit und der Nutzen dieser Technik, als eine diagnostische Methode, wurden erstmals in den 1950er Jahren demonstriert, bei der schnellen Differenzierung zwischen den Pocken und den eher harmlosen Windpocken [1, 2]. Das Protokoll, welches von Brenner und Horne [2] damals eingeführt wurde, wird generell noch für die Probenpräparation verwendet und dauert nur wenige Minuten. Die Partikel in einer Suspension adhären an die Oberfläche eines mit Kohle bedampften, dünnen elektronentransparenten Plastikfilms und werden mit Schwermetallen wie z.B. Uranylacetat (UA) oder Phosphorwolframsäure (PTA) kontrastiert [3, 4]. Die Schwermetalle lagern sich um bzw. an die Partikel (z.B. Viren) und bilden so einen elektronendichten Bereich. Daraus ergeben sich Informationen über die Größe und die Morphologie des Partikels [5]. Dieses Verfahren nennt man Negativ-Kontrastierung. Durch geschultes Personal können sehr schnell potentiell infektiöse oder sogar neue Erreger identifiziert werden [6]. Eine andere Möglichkeit Objekte abzubilden bietet das Verfahren der Positiv-Kontrastierung. Hierfür wird die

Probe mit Osmiumtetroxid kontrastiert, in ein Epoxidharz (Epon) eingebettet, geschnitten (Ultradünnschnitt, 60-70nm) und die Schnitte anschließend mittels Schwermetallen wie z.B. Uranylacetat oder Bleicitrat erneut kontrastiert. Dabei werden die Proteine, Nukleinsäuren und biologische Strukturen kontrastiert, welche sich im EM von dem hellen, nicht kontrastierten Hintergrund abheben. Als Träger für den Plastikfilm oder für die Ultradünnschnitte dient ein kleines Metallplättchen (Trägernetzchen oder auch Grid genannt) mit variabel großen Maschen (Meshes).

Die Fähigkeit Partikel bis hin zu den kleinsten Viren schnell zu visualisieren wird durch das Negativ-Kontrastverfahren im TEM ermöglicht. Dabei lagern sich die Schwermetalle nur um die Partikel und bilden so einen elektronendichten Ring, so dass die Partikel (z.B. Viren) hell abgebildet werden. Das Negativ-Kontrastverfahren ist unverzichtbar für eine zuverlässige diagnostische Anwendung. Dies beinhaltet auch die Untersuchung von weißen Pulvern oder anderen komplexen Proben von potentiellen bioterroristischen Angriffen [7]. Allerdings gibt es einige Beschränkungen des TEMs. Viele hoch pathogene Erreger teilen sich dieselbe Größe, Morphologie und charakteristische Kontrast-Merkmale wie die eher harmlosen Erreger. Zusätzlich ist die Identifikation von Erregern (z.B. Viren) über die Ebene der *Familie* hinaus nicht möglich.

Zusammenfassend gibt die Methode der TEM schnelle und nützliche Informationen über die Partikel in einer Probe, aber eine klare Differenzierung bis zur taxonomischen Ebene der *Art* oder *Gattung* ist oft nicht möglich. In solch einem Fall müssen spezifischere, aber meist zeitaufwendigere diagnostische Methoden zur Hilfe genommen werden. Diese Methoden bauen auf den gewonnenen Erkenntnissen aus der EM auf und können die Partikel in der Probe z.B. durch Antikörper (*Enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA, [8]) oder Primer (Polymerase-Kettenreaktion (PCR), [9]) näher bestimmen. Ein wesentliches Problem dieser Methoden ist jedoch Pathogene zu detektieren, welche in dem Antikörper-spezifischen Antigen-Epitop oder in der Primer-spezifischen Genomsequenz mutiert

sind [7]. Mit der Entwicklung des Lasers [10] bekam die Raman-Spektroskopie eine neue Bedeutung, als eine schnelle und sensitive diagnostische Technik.

1.1.2 Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (TERS)

1.1.2.1 Raman-Spektroskopie

Die Entwicklung des Lasers lieferte eine leistungsfähige monochromatische Licht-Quelle, welches den Einsatz der Raman-Spektroskopie als eine schnelle und sensitive diagnostische Technik ermöglichte [10]. Die Raman-Spektroskopie ist eine spektroskopische Technik, welche Vibrationen, Rotationen und andere Niedrigfrequenz-Arten in einem System untersucht [11]. Weiterhin befasst sich die Technik mit der Untersuchung der inelastischen Streuung von Licht an Molekülen oder Festkörpern (Raman-Streuung). Mit der Raman-Spektroskopie ist es möglich, einzelne biologische Strukturen im Nanobereich zu analysieren. Eine weitaus sensitivere Methode ist jedoch nötig, um einzelne Partikel spezifisch zu analysieren.

1.1.2.2 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)

Ein Weg die sensitive Detektion der Raman-Spektroskopie zu erhöhen, wird erzielt, indem ein verstärkendes elektrisches Feld um die Laser-bestrahlte Edelmetall-Oberfläche in der Nähe der biologischen Struktur gelegt wird [12-14]. Diese Technik ist bekannt als SERS, welche die Streueffizienz um bis zu 10^{11} erhöht [15, 16] und somit eine Detektion von einem einzelnen Molekül ermöglicht [17-19].

1.1.2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Das AFM dient der mechanischen Abtastung von Oberflächen sowie der Messung atomarer Kräfte im Nanobereich. Es wurde in den frühen 1980er Jahren von Gerd

Binnig, Calvin Quate und Christoph Gerber entwickelt [20] und war 1989 erstmals kommerziell erwerblich. Bei der Messung wird eine nanometergroße Spitze (*tip*), welche auf einem Messstab (*cantilever*) befestigt ist, in einem festgelegten Muster über die Probe geführt (*scannen*). Durch die unterschiedliche Struktur der Oberfläche einer Probe wird der Messstab unterschiedlich stark ausgelenkt. Diese Auslenkungen können mit optischen Sensoren gemessen werden und geben Aussagen über die atomaren Anziehungskräfte auf der Oberfläche einer Probe. Die Messung kann in drei Modi erfolgen: dem Kontakt-Modus, dem Nicht-Kontakt-Modus (NK-Modus) und dem intermittierenden Modus. Für biologische Proben eignet sich am besten der NK-Modus, da bei diesem Modus die Spitze das Probenmaterial nicht berührt und damit die Probe nicht zerstört wird.

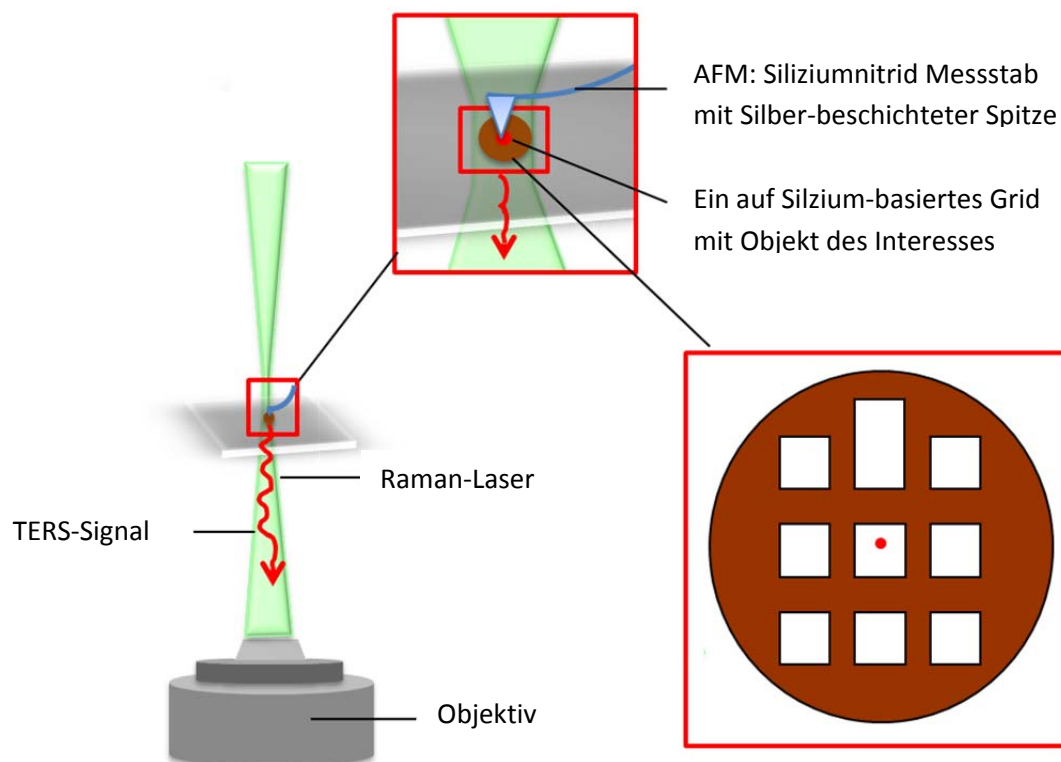


Abb. 1) Schematischer Aufbau einer TERS mit Messung auf einem Silizium-basierten Grid

Mit einem Messstab an deren Ende eine kleine Spitze befestigt ist, wird über die Oberfläche des zu untersuchenden Objektes gescannt und damit das Raman-Signal an diesem Punkt verstärkt.

Die hohe Sensitivität des SERS wird durch die TERS (s. Abb. 1) nochmals gesteigert. Hierbei stellt eine silberbeschichtete Metall-Spitze, auf dem Messstab eines AFM, ein Raman-Spektrum mit einer hohen räumlichen Auflösung von der Nähe des Nanopartikels dar [21]. Mit dieser Technik gelang es Neugebauer *et al.*, Ciolla *et al.*, Bailo *et al.*, Deckert *et al.*, Bohme *et al.* und Hermann *et al.* TERS-Spektren von einzelnen Viruspartikeln und biologischen Makromolekülen aufzunehmen [22-26]. Basierend auf den hoch spezifischen TERS-Banden, soll eine präzisere Identifikation eines einzelnen Virus bis hin zur Gattung ermöglicht werden [22]. Für solch ein Vorgehen müsste vorab eine Sammlung von TERS-Spektren für alle Pathogene generiert werden, um diese dann mit dem zu untersuchenden Erreger abgleichen zu können.

1.1.3 Bioterroristische Angriffe

Vor mehr als 1000 Jahren fanden die ersten biologischen Angriffe statt, als Leichen in die Wasserquellen des Feindes geworfen oder Decken, durch Pestkranke verseucht, dem Feind gegeben wurden [27].

Spätestens seit den Ereignissen im September 2001, als Terroristen, Flugzeuge in das *World Trade Center* steuerten oder im Oktober desselben Jahres Anthraxsporen über den Postweg verschickt wurden, bekam das Wort Terror eine neue Bedeutung [28, 29]. Daher erlangte die Sicherheit der Bevölkerung vor biologischen Angriffen eine immer größere Bedeutung. Ebenso zeigen die jüngsten Ereignisse in Amerika wie wichtig eine schnelle Detektion und spezifische Identifikation von Pathogenen ist [5, 30], ob es nun mit Anthraxsporen (2001), Milzbrand-Erregern (2001) verseuchte oder mit Rizin (2003, 2004, 2013) vergiftete Briefe sind, welche über den Postweg verschickt werden.

1.1.4 Pathogene Erreger und Stoffe als Biowaffen

Pathogene Erreger sind Organismen, die in einem anderen Organismus Krankheiten hervorrufen und je nach Pathogenität des Erregers zum Tod des Organismus führen können. Diese pathogenen Erreger können Viren, Viroide, Pilze, Bakterien, Algen, Parasiten und Prionen sein. Unter den Viren besitzen die Ebola-Viren und die Marburg-Viren die höchste Pathogenität für den Menschen. Aber auch die Pocken dürfen als pathogene Erreger, trotz Ausrottung (1980, WHO), nicht außen vor gelassen werden, denn sie eignen sich besonders für bioterroristische Angriffe.

Es gibt weiterhin pathogene Stoffe, welche Krankheiten oder Tod eines Organismus bewirken können. Hierzu zählen z.B. die Toxine. Eines dieser pathogenen Toxine ist das Botulinumtoxin, auch Botulinum-Neurotoxin (BoNT) genannt [31-33]. Dieses von dem Bakterium *Clostridium* produzierte Toxin hemmt, schon in sehr geringen Dosen, die Signalübertragung der Nervenzellen sowie Synapsen und zählt damit zu einem der stärksten Toxine überhaupt [33].

Um die Sicherheit der Bevölkerung zu erhöhen, ist es von besonderem Interesse, eine schnellere Detektion und Identifikation von pathogenen Erregern zu ermöglichen [5, 30]. Zu diesem Zweck wurde ein Projekt namens BiGRUDI (Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung, ultraschnelle Detektion und Identifizierung von bioterroristisch relevanten Agenzien) etabliert. In diesem Projekt sollten die verschiedenen pathogenen Erreger und Stoffe untersucht, analysiert und Methoden der Früherkennung entwickelt werden, um eine Bedrohung durch Pathogene zu reduzieren oder sogar zu eliminieren.

1.2 HERV-K(HML-2)

1.2.1 Retroviren

Zum ersten Mal wurden Retroviren 1908 von Ellermann und Bang beschrieben. Sie zeigten, dass Mäuseleukämie durch Ultrafiltrate übertragen werden konnte [34]. Anschließend entdeckte Rous 1911, dass Ultrafiltrate, aus Geflügelsarkomen, gesunde Hühner an eben diesen Tumoren erkranken ließen [35]. Das von Rous entdeckte und für die Tumore verantwortliche Retrovirus war das Rous-Sarkomvirus. Im Jahr 1936 konnte Bittner eine weitere Tumorerkrankung mit einem Retrovirus assoziieren. Dabei handelte es sich um das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV), welches in der Maus Tumore in den Milchdrüsen verursacht [36]. Das erste humane Retrovirus, welches im Menschen Krebs verursachte, wurde 1980 von Gallo beschrieben und als das humane T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) bekannt [37-39]. Kurze Zeit später konnten Gallo und Montagnier auch für die humane Immundefizienz, AIDS, Retroviren als Erreger dieser Erkrankung beschreiben, HIV-1 und HIV-2 [40].

Die Retroviren (Reverse Transkriptase Onkoviren, *Retroviridae*) besitzen als Genom zwei einzelsträngige (ss) RNAs in Plusstrangorientierung. Die Viren sind von einer Membran umhüllt und bedienen sich eines Enzyms namens Reverse Transkriptase (RT), um ihre ssRNA in doppelsträngige (ds) DNA umzuschreiben. Dieses Enzym ist auch Teil der Namensgebung dieser Viren und wurde erstmals von Temin, Mizutani und Baltimore 1970 beschrieben [41, 42]. Der zweite Part der Namensgebung stammt von ihrem onkogenen Potential, welches aus der Integration, durch die umgeschriebene ssRNA in dsDNA, in das Genom der Wirtszelle resultiert. Die Retroviren lassen sich in zwei Unterfamilien einteilen, die *Orthoretroviridae* und die *Spumaviridae* [43]. Zu den *Orthoretroviridae* gehören sechs verschiedene Genera, die α -, β -, δ -, ϵ - und die γ -Retroviren, sowie die Lentiviren. Die *Spumaviridae* besitzen nur

ein Genus, das der Spumaviren, zu denen die Foamyviren gezählt werden (s. Abb. 2).

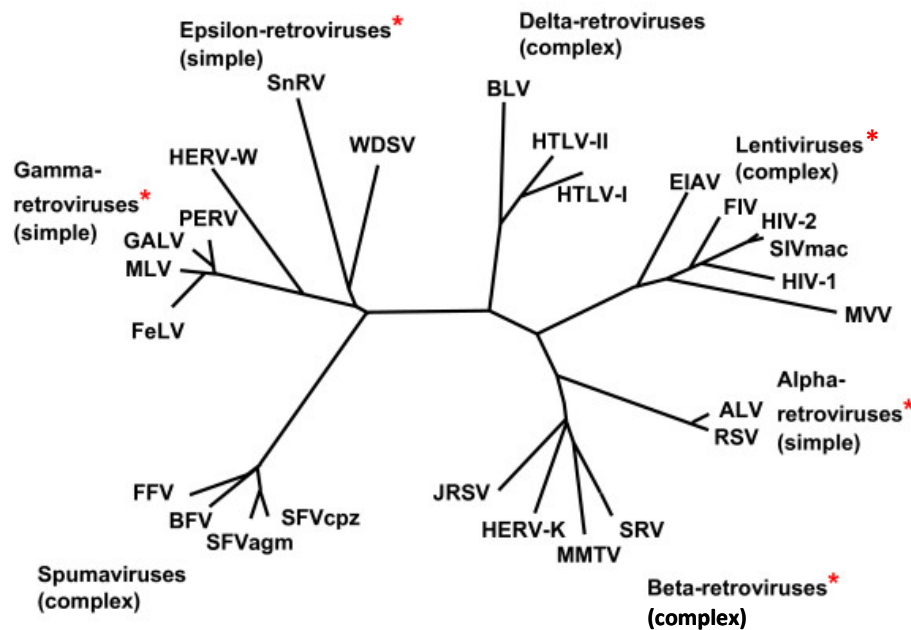


Abb. 2) Taxonomischer Stammbaum der Retroviren

Die sechs Genera der *Orthoretroviridae*, sowie die *Spumaviridae* sind mit ihren Arten abgebildet. Der rote Stern markiert die Genera in welchen auch endogene Retroviren vorkommen, Abbildung verändert nach [44]

Retroviren können verschiedene Krankheiten wie Tumore, Immundefizienz oder neurologische Defekte hervorrufen. Die Retroviren werden des Weiteren in infektiöse exogene oder endogene Retroviren unterteilt und infizieren vorwiegend Wirbeltiere.

1.2.1.1 Morphologie, Struktur und Genom der Retroviren

Alle Retroviren haben einen ähnlichen Aufbau und einen Durchmesser von ca. 100-120 nm. In Abbildung 3 ist anhand von HERV-K, der Aufbau von Retroviren dargestellt. Die mit einer zellulären Lipiddoppelmembran umhüllten Viren tragen auf ihrer Membran Hüllproteine, auch *Envelope*-Proteine genannt. Wobei ein Teil in der Membran verankert (transmembrane (TM) Untereinheit) ist und der andere Teil

sich als externe Glycoproteine (SU) außerhalb der Membran befindet. Dabei kann der aus der Membran herausragende Teil des TM Proteins kovalent oder nichtkovalent mit dem SU Protein verbunden sein. Die Hüllproteine sind im EM als sogenannte *Spikes* sichtbar [45] und liegen als Trimere vor [46]. An der Innenseite der Membran befinden sich die Matrixproteine (MA). Sie sind über Myristinsäurereste mit der Membran verbunden und bilden eine netzähnliche Proteinschicht. Im Inneren des Virus befindet sich das Viruscapsid, welches aus Capsid-Proteinen (CA) besteht. Dabei kann das Capsid eine sphärisch-ikosaedrische Form, wie bei den α -, β -, γ - oder δ -Retroviren und Spumaviren, oder eine eher konische Form, wie bei Lentiviren einnehmen [45]. Im Capsid befindet sich das virale Genom, welches sich aus zwei ssRNAs, mit Nucleocapsid-Proteinen (NC) komplexiert, zusammensetzt. Des Weiteren befinden sich im Inneren des Capsids die Enzyme RT, Integrase (IN) und Protease (PR).

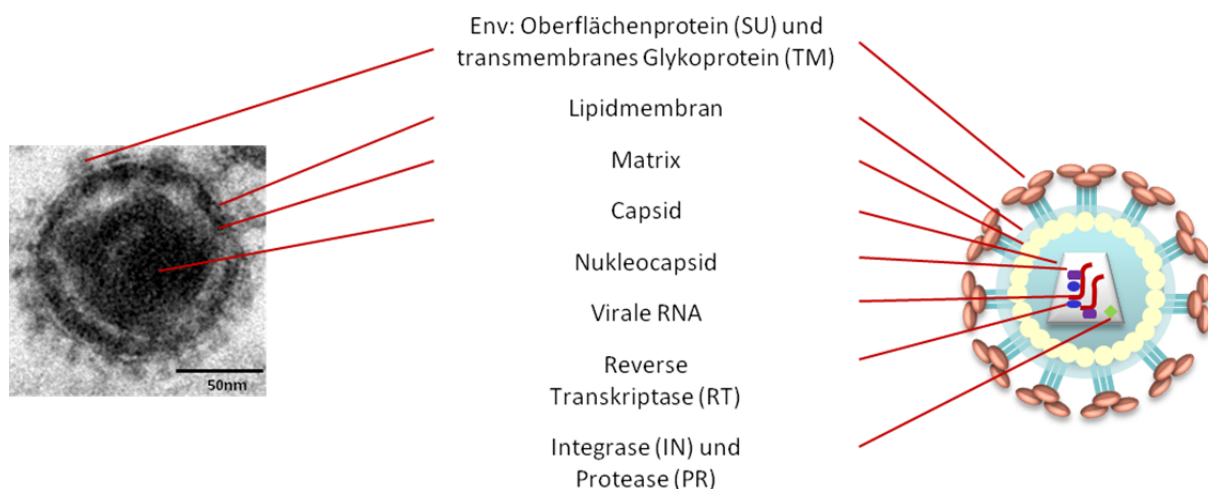


Abb. 3) Elektronenmikroskopische und schematische Abbildung eines reifen β -Retroviruses

Das Virus besteht aus einer Lipidmembran in der sich die viralen Hüllproteine, bestehend aus der Oberflächen- (SU) und der transmembranen Untereinheit (TM), befinden. Matrixproteine umgeben das Capsid. Das (+)ssRNA-Genom liegt zusammen mit Nucleocapsid-Proteinen, RT, IN und PR im inneren des Capsids.

Das Genom der Retroviren setzt aus den Genen *gag*, *pol*, *env* sowie zwei LTRs (*long terminal repeats*) zusammen. Die beiden identischen LTRs befinden sich jeweils am

Anfang und am Ende des viralen Genoms und bestehen aus den Regionen U3, R und U5. Die LTRs sind für regulatorische Prozesse der Genexpression wichtig und enthalten *cis*-aktive Sequenzen sowie Promotor- und Enhancer-Elemente. Vor allem an der U3-Region binden zelluläre, transaktive Proteine und leiten die Transkription von integrierten Proviren ein. Im Genom von infektiösen Viruspartikeln spielt der U3- und U5-Bereich ebenfalls eine wichtige Rolle, da sich auf ihnen wichtige Kontrollsequenzen für die RT als auch für die Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA befinden. Die R-Region in der LTR dient zum Transkriptionsstart und enthält das Polyadenylationssignal. Auf die LTR folgt eine Primer-Bindungsstelle (PB), an welcher die spezifische, zelluläre tRNA binden kann und die RT-Polymeraseraktion startet. An die PB schließt sich eine Ψ -Region an, welche für die Verpackung der RNA in die Viruspartikel verantwortlich ist. Anschließend folgen die drei Strukturgene des Virus *gag-pol-env*. Das *gag* (*group specific antigen*)-Gen kodiert für die drei Hauptstrukturproteine MA, CA und NC. Das *Pol* (Polymerase)-Gen kodiert für die RT, PR, IN und die RNaseH, welche den RNA-Anteil des Hetroduplexes (RNA:DNA), nach erfolgreicher RT, hydrolysiert [47]. Bei den β - und δ -Retroviren befindet sich für die PR ein eigener Leserahmen (*pro*), welcher zwischen dem *gag*- und *pol*-Gen liegt. Die PR prozessiert die Gag-Vorläufer-Proteine in die jeweiligen MA-, CA- oder NC-Proteine. Das *env*-Gen kodiert für die TM- und SU-Einheit der viralen Glycoproteine. Während sich am 5'-Bereich eine Cap-Gruppe befindet, ist das 3'-Ende polyadenyliert und besitzt ein oder mehrere Polypurinstellen (PP) vor der LTR, die für die RT essentiell ist. Zusätzlich zu den aufgezählten Genen enthalten komplexe Retroviren, wie z.B. HI-Viren oder aber auch HTLV oder HERV-K noch weitere regulatorische Gene, die sogenannten akzessorischen Gene. Diese akzessorischen Gene können die Replikation verstärken oder die antivirale Wirtsabwehr inhibieren, wie z.B. die Gene *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpu* und *vpr* von HIV-1 [48-51].

1.2.1.2 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von Retroviren wird durch das virale Oberflächenprotein Env eingeleitet (s. Abb. 4). Dieses bindet spezifisch an den jeweiligen zellulären Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle. Durch die TM-Einheit des Glycoproteins wird die Fusion von Virusmembran und zellulärer Wirtsmembran eingeleitet [52]. Die Auflösung des Capsids sorgt für die Freisetzung der RT, IN und PR ins Zytoplasma [53]. Nun kann die RT, mit Hilfe einer zellulären tRNA, welche als Primer dient, das virale RNA-Genom in dsDNA umschreiben.

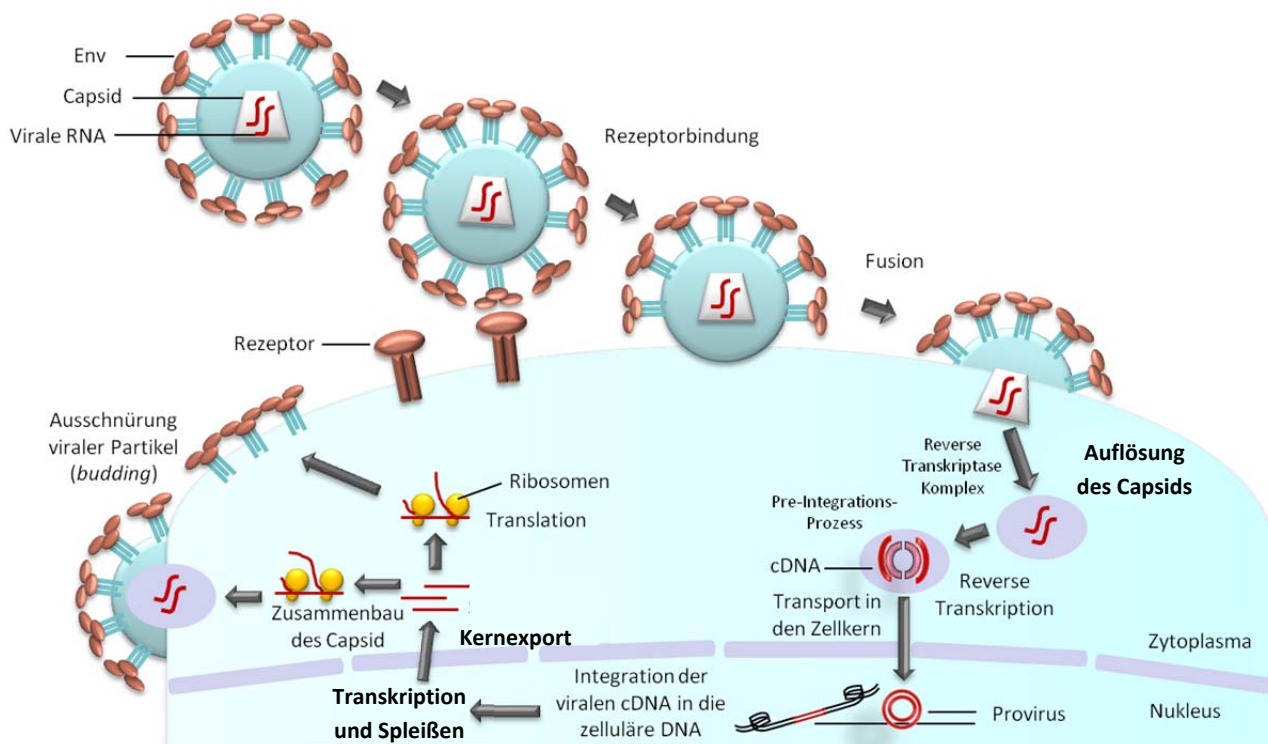


Abb. 4) Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Retroviren

Die Replikation des Retrovirus beginnt mit der Bindung an den Rezeptor der Wirtszelle durch das virale Oberflächenprotein Env. Anschließend findet eine Fusion zwischen Virushülle und Wirtsmembran statt. Das Capsid wird aufgelöst, durch die RT in cDNA umgeschrieben, in den Zellkern transportiert und ins Genom der Wirtszelle mit Hilfe der IN integriert. Nach Transkription des Provirus und dem Spleißen, wird die virale mRNA ins Zytoplasma transportiert, in Gag-, Pro-, Pol-, Env- und gegebenenfalls in weitere akzessorische Vorläufer-Proteine translatiert oder als neues virales RNA-Genom in die Partikel verpackt. Der Zusammenbau der Gag-Proteine erfolgt an der Zellmembran mit anschließendem Einbau des viralen Genoms und der Ausschnürung der Partikel. Die unreifen Partikel reifen zu infektiösen Partikeln durch die proteolytische Prozessierung des Gag-Vorläufer-Proteins und können wieder neue Zellen infizieren (Abb. verändert nach [54]).

Bei der reversen Transkription der ssRNA in dsDNA kommt es oft zu Fehlern durch die RT, da diese keinen Mechanismus zur Kontrolle der Lesegenauigkeit besitzt [55]. Dies führt zu einer sehr großen Fehlerrate, was jedoch auch die hohe Variabilität der Retroviren gewährleistet [56, 57]. Die virale DNA wird in den Zellkern transportiert und durch die Endonuclease- und Ligase-Aktivität der IN ins Wirtsgenom integriert [58]. Der Einbau der viralen DNA in das Wirtsgenom kann sich als problematisch für den Wirt erweisen, wenn durch diese Integration zelluläre Gene deaktiviert oder aktiviert werden. Das Provirus bleibt nun je nach Zustand der Zelle latent oder wird transkribiert [59]. Bei der Transkription der viralen Gene spielen, je nach Virustyp, verschiedene zelluläre Faktoren eine Rolle, welche eine Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II erlauben. Die virale mRNA, die bei der Transkription entsteht, wird ein- oder mehrfach gespleißt und in das Zytoplasma transportiert. Anschließend findet an den Ribosomen die Translation der mRNA statt oder die mRNA wird als neue virale RNA in das Viruspartikel eingebaut. Die Gag-Vorläufer-Proteine werden zur Zellmembran transportiert oder aggregieren direkt an der Zellmembran. Die Env-Vorläufer-Proteine werden an der Membran des zytoplasmatischen Retikulums synthetisiert und über den Golgi-Apparat zur Oberfläche der Wirtszelle transportiert. Das Ψ -Signal in der ungespleißten mRNA sorgt für die Verpackung der viralen RNA in ein Viruspartikel und interagiert mit dem Zink-Finger-Motiv eines Nucleocapsid-Proteinanteils in den Gag- und Gag/Pol-Vorläufer-Proteinen. Anschließend interagieren die Gag-Proteine mit den in der Membran befindlichen viralen Glycoproteinen (Env) und starten die Knospung des unreifen Viruspartikels. Nach erfolgreicher Ausschnürung (*budding*) wird die Protase autokatalytisch aktiviert und prozessiert die Vorläufer-Proteine. Es bildet sich die virustypische Capsid-Form und das reife Virus kann erneut Wirtszellen infizieren.

1.2.2 Endogene Retroviren (ERV)

Endogene Retroviren durchlaufen keinen vollständigen Replikationszyklus. Sie verbleiben als Provirus im Wirtsgenom und können sich vertikal über die Keimbahn verbreiten. So können sie als Provirus an die Folgegeneration weitergegeben werden und entgehen so dem Immunsystem. Eine Vervollständigung des Replikationszyklus der endogenen Viren und somit eine Aktivierung ihrer infektiösen exogenen Form ist aber jederzeit möglich. Durch Replikation des Wirtsgenoms schleichen sich jedoch im Laufe der Replikationszyklen Mutationen ein. Diese können dazu führen, dass die Proviren die Fähigkeit zur Vervollständigung ihres Replikationszyklus verlieren und nicht mehr infektiöse exogene Formen gebildet werden [60, 61]. Durch solche Mutationsereignisse kann es sogar zum Verlust der gesamten proviralen Sequenz kommen, so dass nur eine einzige LTR übrig bleibt [62, 63]. Den Gebrauch des vertikalen Infektionswegs von Retroviren beschrieben erstmals Van Nie *et al.* [64] am MMTV. Sie zeigten, dass MMTV die Zellen nicht nur auf horizontaler Ebene als exogene Viren infizierte, sondern auch in endogener Form als Teil des Genoms einer Keimbahnzelle weitergegeben wurde. Eine Infektion einer Oocyte, Spermatozyte oder einer Vorläuferzelle mit einem Retrovirus resultierte darin, dass auch jede daraus entstehende Folgezelle, dieses Provirus in seinem Genom trägt. Das Provirus befindet sich dabei an derselben Stelle im Genom der Folgezellen und unterliegt den Mendelschen Vererbungsregeln.

Im Laufe der Millionen von Jahren haben sich retrovirale Elemente über das gesamte Genom angesammelt, durch Reinfektion, Retrotransposition und Komplementation *in trans* [65]. Solange keine schädigenden Mutationen im Genom des Provirus durch Replikationszyklen des Wirtsgenoms entstehen, kann aus dem Provirus ein funktionstüchtiges, infektiöses, exogenes Virus wieder assembliert werden. Dies ermöglicht, dass die Viren auch nach längerer Ruhephase reaktiviert werden und erneut Zellen infizieren können. Werden durch Mutationen jedoch essentielle Gene beschädigt, können die daraus resultierenden Proteine nicht mehr korrekt gebildet

werden. Dies kann dazu führen, dass das Virus nicht reaktiviert wird und in der bereits infizierten Zelle latent verbleiben muss. Jedoch gibt es zwei Alternativen der Vermehrung von endogenen Retroviren. Die eine Alternative ist die Retrotransposition, welche ausschließlich intrazellulär abläuft [65, 66]). Die zweite Alternative ist die Komplementation in *trans*. Hierbei bekommt das endogene und inaktive Provirus Hilfe von einem sogenannten Helfer-Virus [67]. Bei Co-Infektion mit einem Helfer-Virus erlangt das inaktive Provirus seine Funktionalität wieder und wird infektiös. Das so entstandene Virus ist jedoch nicht in der Lage weiter zu replizieren. Endogene Retroviren sind weit verbreitet und finden sich in den Genomen vieler Wirbeltiere und Insekten wieder [68]. Lange wurde angenommen, dass nur die einfachen Retroviren zu endogenen Viren werden können [69], bis 2007 das erste Lentivirus entdeckt wurde, welches ebenfalls dazu in der Lage war, als endogenes Provirus, ins Wirtsgenom zu integrieren: Das *rabbit endogenous lentivirus type K* (RELIK) [44, 70].

1.2.2.1 Humane endogene Retroviren (HERV)

Die ersten humanen endogenen Retroviren (HERV) wurden erstmals in den 1970er Jahren im menschlichen Gewebe von Kalter *et al.* [71] sowie Bierwolf *et al.* [72] beschrieben. Durch das humane Genomprojekt wurden im Menschen bisher 31 verschiedene HERVs gefunden [73], die etwa 8% des menschlichen Genoms ausmachen [74]. Alle diese Retroviren lassen sich auf jeweils ein einzelnes Intergrationsereignis zurückführen [75]. Während in vielen Säugetieren sowohl endogene als auch infektiöse exogene Retroviren nachgewiesen werden konnten, wurde bei den HERVs bislang noch kein intaktes, infektiöses Retrovirus gefunden [65, 76]. Die Integration der meisten HERV-Familien erfolgte noch vor der Trennung der Altwelt- von den Neuwelt-Affen, also vor über 35 Millionen Jahren [67]. Zu einer der ältesten Familien der humanen endogenen Retroviren gehört das HERV-L, zu einer der jüngsten Familien das HERV-K [77-79]. Ein Vergleich zwischen den beiden

retroviralen LTRs von HERVs dient neben Stammbaumanalysen der Bestimmung des Integrationszeitpunkts in das Genom. Da zum Zeitpunkt einer Integration die beiden LTRs für gewöhnlich identisch sind [80], geben Veränderungen in dieser hochkonservierten Region eine gute Möglichkeit zur Berechnung des Alters. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $2,3 \times 10^{-9}$ bis 5×10^{-9} findet pro Jahr eine Basenmutation in einer LTR statt [81]. Dies bedeutet, dass eine Veränderung beider LTRs ca. 200.000 bis 450.000 Jahre dauert [79]. Eine Bestimmung des Zeitpunkts der Integration ist schwierig, da die Mutationsraten nicht immer konstant sind und das Auftreten von Genkonversionen die exakte Altersbestimmung ebenfalls erschwert [82].

1.2.2.2 Pathogenese und Nutzen von HERV

Retroviren sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, wie der Mäuseleukämie [34] oder Tumore wie sie durch das Rous-Sarkomvirus [35] oder das MMTV [36] ausgelöst werden. Aber nicht nur in Tieren können Retroviren Krankheiten auslösen, auch in Menschen wurden Retroviren entdeckt, welche für T-Zell-Leukämie (HTLV, [37, 39] oder Immundefizienz (HIV-1 und HIV-2, [40]) verantwortlich sind. Durch die Integration des proviralen Genoms ins Wirtsgenom, kann es zur Tumorgenese der Zellen kommen, wenn die Integration in der Nähe von essentiellen Genen der Zelle liegt, die z.B. der Tumorsuppression dienen [83, 84]. Ebenso können onkogene Proteine, welche vom Retrovirus gebildet werden, mit der Wirtsmaschinerie interagieren, Stoffwechselwege beeinflussen und zu unkontrollierter Zellproliferation führen. Ein Beispiel für solch ein onkogenes Potential haben das *env*-Gen des Jaagsiekt Schaf-Retrovirus (JSRV) oder das *tax*-Gen von HTLV-1 und HTLV-2 ([85-88]. Bisher konnten pathogene, endogene Retroviren nur bei Tieren entdeckt werden, dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass es auch Pathogene unter den human endogenen Retroviren gibt. Insbesondere da HERV-Expression in Tumoren von Menschen, sowie in einer Brustkrebs- und Teratokarzinomazelllinie [89-92] gefunden wurden, ist es möglich, dass auch HERVs potentielle Pathogene

sind [93]. Des Weiteren wurden in verschiedenen Proben von Krebspatienten HERV-K-RNA, Reverse Transkriptase-Aktivität und Retrovirus-ähnliche Partikel nachgewiesen [94, 95]. Arbeiten wie die von Denner *et al.* [96] und Boese *et al.* [97] weisen jedoch auf das onkogene Potential von HERV-Proteinen, wie die akzessorischen Proteine Rec und Np9, hin. Dabei interagieren diese Proteine mit dem Transkriptionsfaktor PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*), welcher für die Spermatogenese benötigt wird und als Tumorchemmer dient. Ebenso konnten Hanke *et al.* [98] zeigen, dass durch die Interaktion von Rec und hSGT (*human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein*) die Stimulierung des Androgenrezeptors beeinflusst wird, so dass die Zellproliferation eingeleitet wird und damit das Tumorwachstum gefördert werden kann. Die HERV-Expressionen werden ebenfalls mit Autoimmunerkrankungen und neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [99-101]. Bisher konnte noch nicht verifiziert werden, ob HERV-Expressionen die Ursache oder die Folge von Krebs-, Autoimmun- oder neurologischen Erkrankungen sind [102].

Auch wenn viele human endogene Retroviren im Verdacht stehen, Krebs und andere Krankheiten auszulösen bzw. daran beteiligt zu sein, haben die Integrationen von HERVs auch ihre Vorteile für die Menschen gebracht. Unter anderem besitzt die virale LTR nicht nur virale Promotoren und Polyadenylations-Signale, sondern reguliert die Genexpression für virale Gene, aber auch für eine Vielzahl an zellulären Genen. Zu diesen LTRs gehört z.B. die HERV-E LTR, welche zu einer starken Expression eines zellulären Amylasegens in der Speicheldrüse führt [103], was eine bessere Aufschließung der Nahrung ermöglicht [104]. Ebenso haben die Viren HERV-W und HERV-FRD einen positiven Einfluss auf die Plazentabildung in der Schwangerschaft [105, 106]. Hierbei setzen sie sich zwischen den Promotor des Plazenta-spezifischen Insulingens (ISNL4), um dort die Expression während der Differenzierung zum Syncytiotrophoblasten zu erhöhen [107]. Des Weiteren kodieren die viralen *env*-Gene dieser HERVs für Syncytin-1 und Syncytin-2, wobei

beide Proteine sehr starke fusogene Membranproteine sind und eine Verschmelzung des plazentalen Trophoblasten vermitteln [108].

1.2.2.3 **HERV-K113 als repräsentatives Element der HERV-K(HML-2)-Familie**

Die Familie der HERV-K(HML-2) wurde erstmals von Kurth *et al.* [109] und Löwer *et al.* [110] in Teratokarzinomzellen beschrieben. Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem MMTV wurde es in die Gruppe der β -Retroviren eingeordnet [109, 111-113] und lässt sich in die humanen MMTV-ähnlichen Viren (HML 1-9), HERV-K(C4) und HERV-K(14C) einteilen [67]. Die ersten Integrationen in die Keimbahnzellen der Altweltaffen erfolgten vor mehr als 35 Millionen (Mio.) Jahren, einige Vertreter der Familie integrierten erst vor ca. 6 Mio. Jahren, als sich die Linie der Menschen und Schimpansen voneinander trennten [114]. Die jüngsten Integrationsereignisse fanden vor ca. 2 Mio. Jahren statt. Damit zählen einige Vertreter dieser Familie, wie z.B. das HERV-K113, zu den jüngsten und besterhaltenen humanen endogenen Retroviren [115-117]. Viele Sequenzen der HERV-K(HML-2)-Familie sind sehr gut erhalten [66] und es konnten bis jetzt 70 humanspezifische Insertionen detektiert werden, wobei 15 bis 20 von ihnen hochkonservierte provirale Genome sind [78, 118].

Das jüngste und damit das am besten erhaltene retrovirale Element wurde 2001 von Turner *et al.* [79] in einer humanen BAC-Bibliothek entdeckt. Dabei handelte es sich um das HERV-K113, welches über vollständig offene Leserahmen für alle viralen Proteine verfügt und in der Sequenz seiner LTRs nur drei Unterschiede besitzt [79]. Weiterhin kommt das auf Chromosom 19p13.11 liegende Provirus nur in einem Teil der menschlichen Bevölkerung vor, was auf einen allelen Polymorphismus hinweist [79, 119, 120]. Dabei gibt es abhängig der Ethnizität eine verschiedene Prävalenz für das Provirus. Während die Prävalenz des Provirus in der afrikanischen Bevölkerung mit ca. 30% sehr hoch ist [120], liegt sie in Polen nur noch bei 8% [99] und in

Großbritannien sogar nur noch bei 4% der Bevölkerung [120]. Dies unterstützt die Hypothese, nach welcher die Integration von HERV-K113 in der afrikanischen Bevölkerung seinen Ursprung hatte. Auch wenn HERV-K113 zu den besterhaltenen, humanen Proviren zählt, führten im Laufe der Millionen von Jahren nach Integration, einige Mutationen dazu, dass HERV-K113 replikationsunfähig ist [119, 121]. Bislang ist es zwar gelungen, diese Mutationen mit Hilfe von Sequenzanalysen und Sequenz-Vergleichen mit anderen HERV-Elementen zu revertieren, welches in infektiöse Partikel resultierte. Jedoch konnten bisher keine replizierenden Viruspartikel nachgewiesen werden [122-124].

Genomischer Aufbau des Provirus von HERV-K113

Das humane Provirus HERV-K113 besitzt, für alle seine viralen Proteine, offene Leserahmen und diese kodieren für die Proteine Gag, Pro, Pol, Env und Rec [61, 104]. Das Genom setzt sich aus 9472bp zusammen und die gruppenspezifischen Antigene werden von Matrix-, Capsid- und dem Nukleocapsid-Proteinen gebildet. Die LTRs flankieren das provirale Genom und setzen sich aus der U3-, R- und U5-Region zusammen. Die RT-Polymerasereaktion wird durch eine spezifische zelluläre tRNA an der Primerbindungsstelle gestartet. Im Falle von HERV-K113 ist das eine Lysin (K)-tragende tRNA, welche HERV-K den Namen gibt [67]. Zwischen den LTRs befinden sich die Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env*, sowie das akzessorische Gen *rec*. Während das *gag*-Gen für die Matrix-, Capsid- und Nukleocapsid-Strukturproteine kodiert, enthält das *pol*-Gen Informationen zur Synthese der RT, IN und RNaseH. Das *pro*-Gen kodiert für die Protease, welche für die Prozessierung der Gag- und Pol-Vorläuferproteine zuständig ist. Das virale Oberflächenprotein wird von dem *env*-Gen kodiert und entsteht bei unvollständig gespleißten Transkripten des *env*-Gens. Bei vollständig gespleißter *env* mRNA entsteht das akzessorische Protein Rec (*regulator of expression encoded by corf*), welches für den Transport der viralen RNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma verantwortlich ist [60, 125]. Ein drittes

Spleißprodukt, welches als *hel* mRNA bezeichnet wird, konnte bisher noch keiner Funktion zugeordnet werden [119, 126].

1.2.3 Antivirale Wirtsabwehr und akzessorische Proteine

Die Auswirkungen, die eine Virus-Infektion auf die Zellen hat, sind enorm und werden als cytopathischer Effekt bezeichnet. Die Zellyse, eine Veränderung der Membranoberfläche sowie Apoptose können das Resultat einer solchen Infektion sein [127]. Die Aktivität der Zelle kann durch spezifische virale Proteine unterdrückt werden, wobei diese Proteine nicht alle, Bestandteil des Virus-Partikels sein müssen [128]. Um eine Virus-Infektion zu verhindern, steht dem Wirt in erster Linie das angeborene Immunsystem zu Verfügung. Da dieses jedoch nicht spezifisch ist, kann es den Körper nicht für lange vor einem Angriff schützen. Die RNA-Interferenz ist ein sehr wichtiger angeborener Schutz gegen Viren [129] und wird bei dsRNA aktiv. Hierbei wird die dsRNA an eine Endonuklease, einen sogenannten Dicer, gebunden und die RNA in kleine dsRNA-Stücke geschnitten. Damit wird ein biochemischer Prozess namens RISC-Komplex eingeleitet und die virale RNA zerstört (s. Abb. 5).

Einige Viren haben verschiedene Methoden entwickelt, um diesen Mechanismus zu umgehen. Bei Rotaviren kommt es, nach Infektion der Zelle, nicht zu einer vollständigen Auflösung des Capsids. Neu gebildete dsRNA-Produkte werden ins Innere des Capsids abgegeben, so dass die dsRNA, im Kern des Virions, vor der Wirtsabwehr geschützt ist [131, 132].

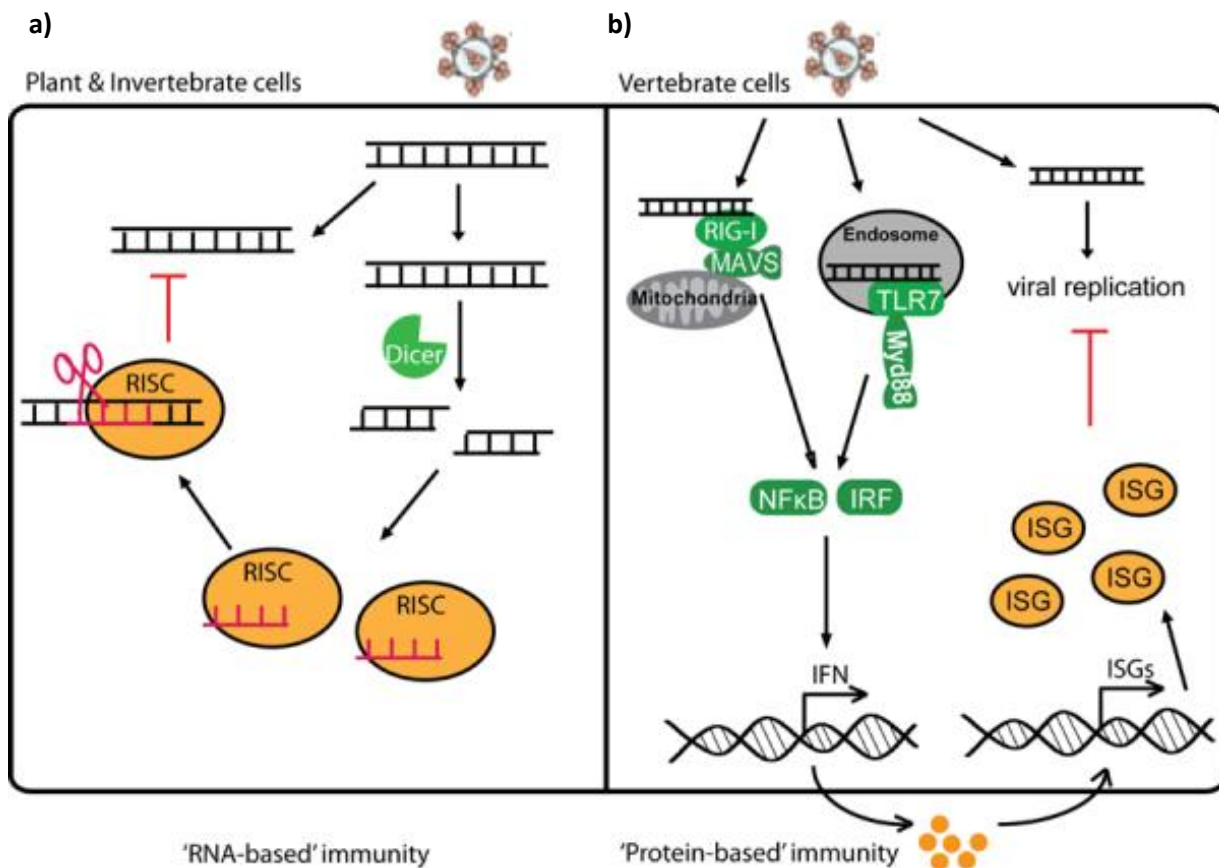


Abb. 5) Schematische Abbildung der RNA-basierten und Protein-basierten Immunität

Die Abbildung zeigt den Prozess der RNA-basierten Immunität in Pflanzen und wirbellosen Tieren **(a)** sowie der Protein-basierten Immunität in Wirbeltieren **(b)**

(a) die virale dsRNA wird durch Dicer erkannt und in kleine RNAs geschnitten, durch RISC-vermittelten RNAi wird das Genom des Virus zerstört. **(b)** Bei der Protein-basierten Immunität wird die virale RNA durch PRRs (*pattern-recognition receptors*) erkannt, welche das Signal zur Aktivierung der Interferon (IFN) Expression geben. Dies aktiviert weitere Expressionen von Interferon-ähnlichen Genen (ISGs), welche die virale Replikation inhibieren. Abb. nach [130]

Das adaptive Immunsystem ist sehr spezifisch und ist ein weiteres effektives antivirales Abwehrsystem. Hierbei werden spezifische Antikörper (AK) produziert, welche das Virus erkennen und binden. Damit wird die humorale Immunantwort eingeleitet. AK sind auch sehr effizient bei der Bekämpfung von Viren, sogar wenn es den Viren bereits gelungen ist, in die Zelle einzudringen. So gibt es ein Protein namens TRIM21 in den Zellen, welches die AK auf den Viren erkennt und den Proteasomen-Prozess einleitet, der das Virus zerstört [133]. Zu den weiteren Restriktionsfaktoren der Zelle (s. Abb. 6) zählen unter anderem auch das APOBEC3G und APOBEC3F aus der APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic,*

polypeptide-like 3)-Familie [134, 135]. APOBEC3G und -3F deaminieren die viralen Nukleinsäuren dC zu dU, welches zu einer G- zu A-Hypermuation führt.

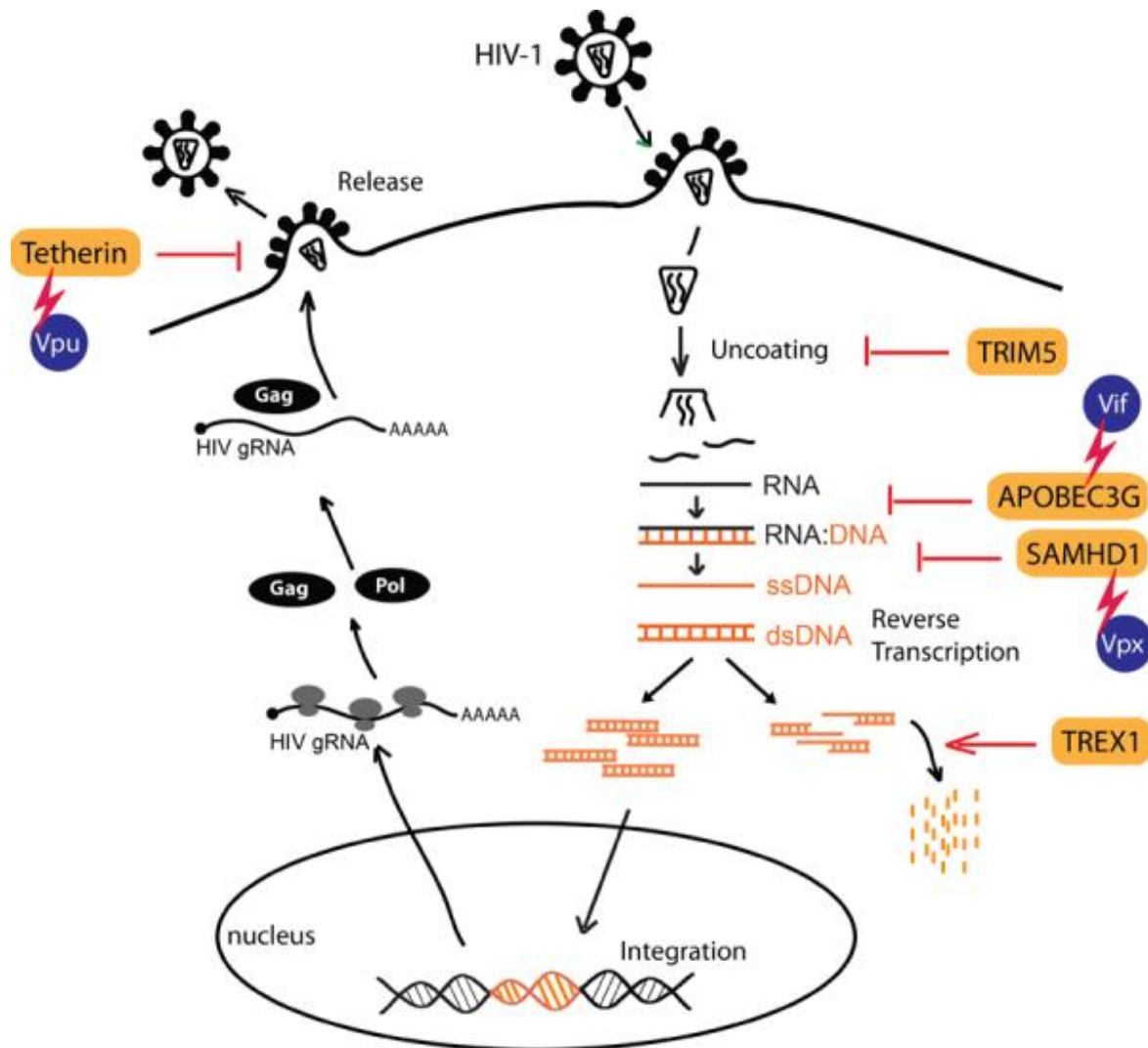


Abb. 6) Schematische Abbildung der Wirkung von akzessorischen Proteinen auf das virale Genom, sowie die Wirkung der viralen akzessorischen Proteine auf die Restriktionsenzyme

Die Abbildung zeigt den Prozess der antiviralen Wirtsabwehr am Infektionsbeispiel von HIV. Nach dem Eindringen von HIV in die Zelle, kann der Auflösungsprozess des Capsids durch TRIM5 α inhibiert werden. Durch APOBEC3G wird die virale genomische RNA so beschädigt, dass die RNA funktionslos wird. Ein Gegenspieler ist das akzessorische Protein Vif, welches APOBEC3G bindet und es über den Proteasomen-Weg abbauen lässt. SAMHD1 baut Nucleosidtriphosphate (NTPs) in Nucleoside und Triphosphate ab, so dass die reverse Transkription verhindert wird. Das Protein Vpx bindet an SAMHD1 und führt das Protein dem Abbau zu. TREX1 (*3'-Reparatur-Endonuklease 1*) degradiert offene 3'-Enden von DNAs schnell und baut so auch offene virale DNA ab. Tetherin bildet den Schluss der antiviralen Wirtsabwehr und verhindert eine Ausschüßung der fertigen Viruspartikel. Der virale Antagonist ist das Protein Vpu. Abb. nach [130]

Diese schädigt das virale Genom und verursacht eine fehlerhafte Informationsweitergabe [123, 136-138]. Ein weiteres Restriktionselement ist TRIM5 α , welches im Folgenden noch genauer beschrieben wird (s. 1.2.3.1) sowie das antivirale transmembrane Glycoprotein Tetherin oder BST-2 (*bone marrow stromal cell antigen 2*). Tetherin besitzt, neben einer N-terminalen Membrandomäne, einen weiteren am C-Terminus liegenden GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker [139]. Mit diesem Anker kann Tetherin Virionen an der Membran festhalten und verhindert so die Freisetzung der Partikel [48, 140]. Ein ziemlich neu entdeckter Restriktionsfaktor ist das Protein SAMHD1 (*SAM-and HD-domain-containing protein 1*), welches von den *SAMHD1*-Genen kodiert wird und eine Phosphohydrolase ist [141]. SAMHD1 spaltet Nukleosidtriphosphate (NTPs) in Nukleoside und Triphosphate und verringert auf diese Weise den Vorrat an verfügbaren Nukleotiden für die Synthese der viralen cDNA [142]. Dies verhindert die virale Replikation [142]. SAMHD1 kann u.a. die Replikation von HIV in dendritischen Zellen [143, 144], Makrophagen [145] und Monozyten [146] inhibieren.

Es gibt noch weitere Mechanismen und Proteine die zu einem erfolgreichen Abwehrsystem beitragen, wie z.B. die Antigen-Präsentation der Makrophagen [147], die zelluläre Immunantwort, welche durch cytotoxische T-Zellen (*killer T-Zellen*) vermittelt wird oder die Ausschüttung von Interferonen [148]. Es gibt jedoch auch Viren wie z.B. das HI-Virus, welches es perfektioniert hat, dem Immunsystem immer einen Schritt voraus zu sein. Das HI-Virus blockiert die Antigen-Präsentation, ist resistent gegen Cytokine, entgeht den natürlichen Killer-Zellen, verhindert die Apoptose der infizierten Zellen [149] und leitet die Apoptose von uninfizierten Nachbarzellen ein [150]. Das erfolgreiche Abwehren und Verstecken vor dem Immunsystem gelingt den HI-Viren vor allem durch die Vielzahl an akzessorischen Proteinen: Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr/Vpx, and Vpu (s. Abb. 6).

Die zwei Tat-Proteine (p14 und p16) sind transkriptionale Transaktivatoren für den LTR-Promotor und binden an den TAR (*trans-activation response*)-RNA Elementen.

Diese TAR-Elemente können auch in microRNAs prozessiert werden und damit die Regulation der Apoptose Gene *ERCC1* und *IER3* regulieren [151, 152]. Das Vif-Protein inhibiert die Wirkung von APOBEC3G [153], das Vpr-Protein hält die Zellteilung auf [154-156], das Nef-Protein reguliert u.a. CD4 herunter [157-159], das Vpx-Protein interagiert mit SAMHD1 [143, 144, 160] und das Vpu-Protein interagiert mit Tetherin und führt es dem Abbau in den Endosomen zu [48, 140].

1.2.3.1 TRIM5 α

Das TRIM5 α (*tripartite motif protein 5 alpha*) gehört zu einer Protein-Familie von TRIM-Motiven, welche durch Interferon induziert werden und wichtige Komponenten im Kampf gegen Pathogene sind. TRIM-Proteine sind beteiligt an der Erkennung von Pathogenen und bei der Regulation von Transkriptionswegen in der Wirtsabwehr [161]. Das dreigeteilte Motiv besteht aus drei Domänen. Diese Domänen setzen sich aus einer Ring-Finger (R)-Domäne, ein bis zwei B-Box-Zinc-Finger (B)-Domänen und einer doppelt-gewundenen-Region (*coiled-coil*; CC) zusammen [162, 163]. Die Proteine der TRIM-Familie werden in zwei Gruppen unterteilt. Diese unterscheiden sich in ihrer Domänen-Struktur und in ihrer genomischen Organisation [164]. Die Proteine der ersten Gruppe zeichnen sich durch ihre Vielzahl an unterschiedlichen C-Termina aus und kommen sowohl in Wirbeltieren als auch in wirbellosen Tieren vor. Die Proteine der zweiten Gruppe kommen ausschließlich in den Wirbeltieren vor und besitzen im C-Terminus eine SPRY-Domäne [165]. Zu dieser Gruppe gehört auch das Protein TRIM5 α (s. Abb. 7), welches im Menschen von den *TRIM5*-Genen kodiert wird [162].

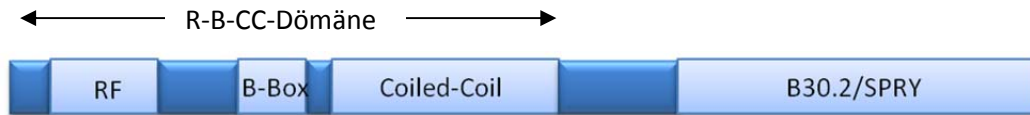


Abb. 7) Schematische Abbildung der strukturellen Domänen von TRIM5 α

Das TRIM5 α -Protein enthält die Ring-Finger (RF)-Domäne, das B-Box-Motiv, eine Coiled-Coil-Domäne sowie die virale Capsid-erkennende SPRY-Domäne (B30.2).

Die mRNA von TRIM5 kann in verschiedene Isoformen von TRIM5 gespleißt werden [166]. Dabei werden die R-B-CC-Domänen, welche von den Exons 2-4 kodiert werden, immer gebildet (s. Abb. 8). Bei den anderen Isoformen wird die SPRY-Domäne durch andere kürzere alternative Sequenzen ersetzt [166].

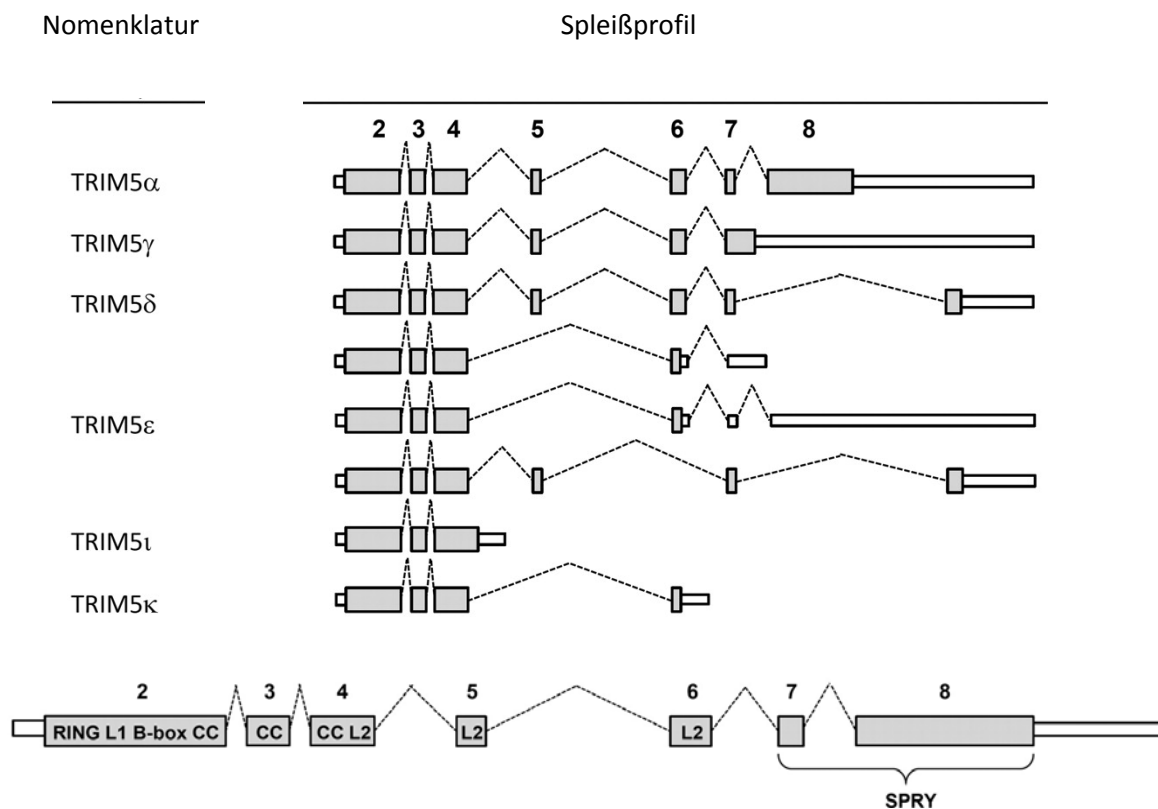


Abb. 8) TRIM5 Isoformen, welche durch humane Zelllinien exprimiert werden

TRIM5 Isoformen wurden mittels cDNA Sequenzen in der GenBank durch AceView kuratiert [167]. Die Exons sind im Spleißprofil als graue Balken dargestellt, die Introns als gestrichelte Rechtecke zwischen den Exons. Die Exons kodieren für die Ring-Finger-, Linker 1 (L1)-, B-Box-, Coiled Coil-, Linker 2 (L2)- und die SPRY-Domäne. Abb. verändert nach [166].

Die α -Isoform dieses Proteins ist ein retroviraler Restriktionsfaktor, welcher Spezies-spezifisch die frühe Infektion durch Retroviren inhibieren kann. TRIM5 α besteht aus

493 Aminosäuren, befindet sich auf dem Chromosom 11 und gehört zusammen mit den Proteinen der APOBEC3G-Familie sowie Tetherin zur angeborenen Immunität gegen Retroviren [168-171]. Das Protein TRIM5 α liegt im Zytoplasma der Zelle vor und erkennt Motive im Capsid des Retrovirus. Dabei wird der Prozess des Capsid-Zerfalls (*uncoating*) verhindert, die RNA kann nicht freigesetzt werden, es kommt nicht zur reversen Transkription und nicht zum Einbau des Virusgenoms ins Genom der Zelle [172-175]. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass das Capsid durch Proteasomen abgebaut wird [176]. Weiterhin gibt es jedoch auch zelluläre Wirtsfaktoren, welche eine Inhibition des Virus durch TRIM5 α entgegen wirken, so wie z.B. Cyclophilin A (CypA), welches in humanen Zellen produziert wird und entscheidend am Inhibitionsprozess bei HIV-1 mitwirkt [177]. Hierbei können die HIV-1 Viren nur durch ein modifiziertes TRIM5CypA, nicht jedoch durch humanes TRIM5 α , erfolgreich inhibiert werden. Die Spezifität von TRIM5 α , Retroviren zu erkennen, wird durch die 332 Aminosäure große SPRY-Domäne ermöglicht [178-180]. Das humane TRIM5 α kann zwar HIV-1 nicht oder nur sehr schwach inhibieren, jedoch kann es einige Stämme des murinen Leukämievirus (MLV, [181, 182] und des equinen infektiösen Anämievirus (EIAV) inhibieren [183, 184]. Über eine Inhibition von HERV-K113 durch TRIM5 α ist noch wenig bis gar nichts bekannt, jedoch konnten Lee und Bieniasz zeigen, dass ein synthetisch rekonstituiertes HERV-K_{con} durch APOBEC3F aber nicht durch APOBEC3G oder humanes bzw. aus Rhesus-Affen stammendes TRIM5 α inhibiert wird [123]. Ebenfalls konnte bei γ -Retroviren eine Inhibition durch APOBEC3, jedoch keine Inhibition durch TRIM5 α gezeigt werden[207].

1.2.4 Herstellung eines originalen HERV-K113 Moleklarklons

Um die evolutionäre Geschichte des in der BAC-Bibliothek [79] gefundenen HERV-K113 zu studieren, wurde die originale Sequenz des Provirus rekonstituiert. Hierfür wurde die HERV-K113-Sequenz mit den zehn jüngsten human-spezifischen

HERV-K-Elementen verglichen. Es wurde ein Algorithmus angewandt, mit welchem postinsertionale Mutationen von Variationen unterschieden werden konnten. Um gemeinsame Polymorphismen zu beachten, wurde eine postinsertionale Mutation als solche deklariert und revertiert, wenn mehr als acht Sequenzen ein anderes Nukleotid an derselben Position besaßen (s. Abb. 9, rote Umrandung). Eine natürliche Variation zeigte sich hingegen, wenn mindestens zwei weitere Sequenzen an derselben Stelle das gleiche Nukleotid wie HERV-K113 aufwiesen (s. Abb. 9, grüne Umrandung). Diese Variationen stellten keine postinsertionale Mutation dar und wurden nicht revertiert. Mit Hilfe dieses Algorithmus konnte der ursprüngliche Molekularklon von HERV-K113 rekonstruiert werden (Dissertation, Nadine Beimforde).

BAC_K113	GTTAGTCTACAGGTGTACCCAACAGCTCCGACGAGACAGCGACCATCGAGAACGGGCCATGATGACGATGGTGGTTTTGT										
K101	G	.	A	.	.	A	A	.	T	.	C
K102	G	.	A	.	.	A	A	.	T	.	C
K104	G	.	A	.	.	A	A	.	T	.	C
K107	G	.	A	.	.	A	A	.	T	.	C
K108	G	C
K109	G	C
K115	G	.	T	.	.	A	.	.	T	.	C
Y178333	G	A	.	.	T	.	C
AP000776	G	.	.	T	.	A	.	A	.	T	C
AC025420	G	A	.	.	T	.	C
Consensus	G	A	.	.	T	.	C
ori_K113	G	A	C

Abb. 9) Teil aus der Env-Sequenz als Beispiel für den verwendeten Algorithmus
 Grün umrandet stellt eine Variation dar, rot umrandet eine postinsertionale Mutation

Basierend auf diesem Algorithmus konnten 25 nicht synonyme postinsertionale Mutationen sowie drei Mutationen in der LTR gefunden werden, welche mittels Mutagenese revertiert wurden. Daraus entstand ein Molekularklon namens ori HERV-K113 (s. Abb. 10) mit allen nicht synonymen Mutationen, wie er wahrscheinlich zum Integrationszeitpunkt im Genom vorlag.

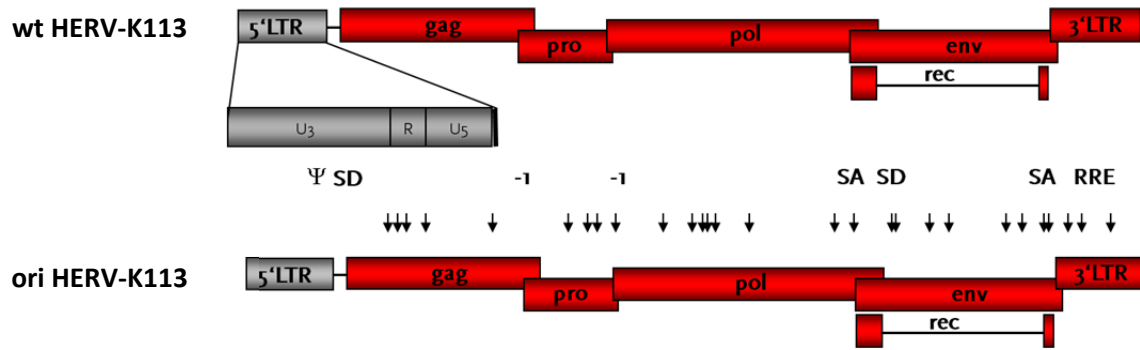


Abb. 10) schematische Darstellung des Genoms von wt HERV-K113 und vom generierten ori HERV-K113 Konstrukt mit allen nicht synonymen Mutationen sowie den drei LTR-Mutationen wt HERV-K113 und ori HERV-K113 mit 5'LTR-gag-pro-pol-env-3'LTR. Die revertierten postinsertionalen Mutationen sind mit Pfeilen markiert und im Anhang tabellarisch aufgeführt

1.2.5 Studien zum Infektionspotential und Tropismus von HERV-K113

1.2.5.1 Infektiösität von HERV-K113

Die Integrationsfähigkeit von HERV-K113, welches mit EnvVSV-G oder einer verkürzten HERV-K113 Env-Variante pseudotypisiert wurde, konnte durch Philipp Kramer (Dissertation) validiert werden. Hierbei konnte in einem Versuch gezeigt werden, dass das Oberflächenprotein Env von HERV-K113 nach Revertierung der acht nicht synonymen Mutationen, im *env*-Gen, funktionstüchtig ist und die Zellen mit HERV-K113 infiziert werden können. Dabei verwendete er ein HERV-K113 Reporterkonstrukt, welches ein *EGFP*-Gen anstelle des *env*-Gens trug. Er transfizierte Zellen mit einem HERV-K113-Reportervirus und HERV-K113-Env-Plasmiden, welche sich durch unterschiedlich lange C-Termina auszeichneten. Mit den pseudotypisierten Viren wurden anschließend Zellen infiziert und mit Hilfe eines Konfokalmikroskop (cLSM) die EGFP-leuchtenden Zellen detektiert. Er zeigte, dass eine Deletion der zytoplasmatischen Domäne des HERV-K113-Envs, von 41 AS, einen fünfmal besseren Einbau des Virus ermöglichte, als die volllängen Variante. Die Viren, welche mit dieser Env-Mutante (im folgenden Env Δ C genannt)

pseudotypisiert wurden, konnten die Zellen am besten infizieren. In einem weiteren Versuch wurden sowohl HERV-K113 als auch SHIV-Partikel mit verschiedenen Envs pseudotypisiert (s. Abb. 11). Hierbei konnte eine bis zu 2-log Stufen höhere Infektiösität bei Zellen detektiert werden, welche mit EnvΔC pseudotypisierten SHIV-Partikeln infiziert wurden, als bei den Zellen, die mit EnvΔC pseudotypisierten HERV-K113-Partikeln infiziert wurden. Ein Grund dafür könnte eine mögliche Inhibition von HERV-K113 nach Eintritt in die Zelle und vor der Expression der Proteine sein, welche HERV-K113 inhibiert, jedoch nicht SHIV.

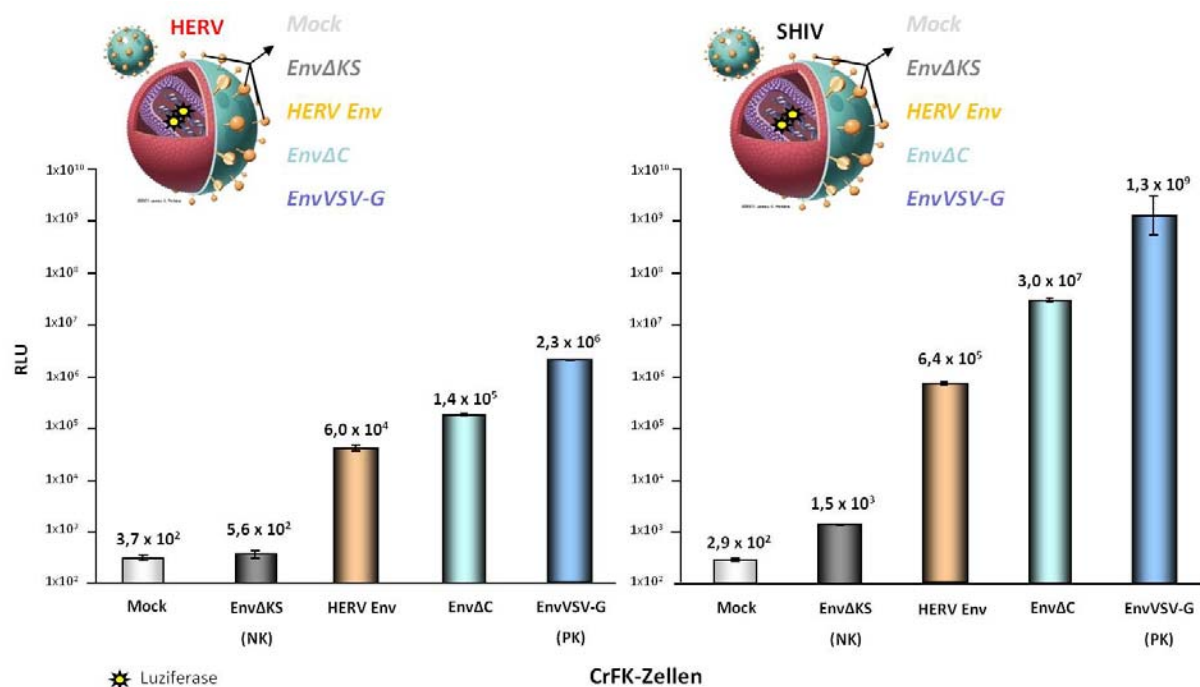


Abb. 11) Infektiösität von pseudotypisierten HERVs und SHIVs

CMVoriLuzi HERV-K113 bzw. SHIVLuzi Reporterkonstrukte wurden mit verschiedenen Env-Plasmiden pseudotypisiert. Feline CrFK-Zellen wurden mit normalisierten pseudotypisierten Viren infiziert und ca. 48h später die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle (NK) diente ein funktionsloses HIV EnvΔKS, als Positivkontrolle (PK) wurde ein EnvVSV-Glycoprotein verwendet. Abb. verändert nach Dissertation, Philipp Kramer

1.2.5.2 Tropismusstudien von HERV-K113

Auf der Suche nach dem Rezeptor für HERV-K113 wurden verschiedene humane und tierische Zelllinien mit pseudotypisierten Env Δ C-Viren infiziert und die Permissivität gegenüber HERV-K113 bestimmt (Dissertation, Philipp Kramer). Mit diesem Versuch konnte einerseits gezeigt werden, dass HERV-K113 einen amphotropen Zelltropismus, andererseits eine breite Wirtsspezifität besitzt. Die Zellen, welche sich als besonders permissiv gegenüber dem Hüllprotein Env Δ C von HERV-K113 zeigten, wurden in den späteren Versuchen verwendet.

1.2.5 Zielsetzung

Sowohl die jüngsten bioterroristischen Ereignisse in Amerika (Rizin Briefe, April 2013), als auch ältere Ereignisse aus dem Jahr 2001 (Briefe mit Anthraxsporen), zeigen die Bedeutung einer raschen Diagnostik zur Detektion von Pathogenen und Toxinen [5, 30]. Ein Standardverfahren in diesem Zusammenhang ist die EM-Diagnostik. Aufgrund des offenen Blickes (*open view*) im Negativ-Kontrastverfahren können alle Viren und Bakterien einer Probe visualisiert werden [7]. Ein Nachteil der EM ist die zu geringe Spezifität, um pathogene von apathogenen Mikroorganismen derselben Familie zu unterscheiden. Diese Spezifität bietet die Raman-Spektroskopie, der jedoch die hohe Ortsauflösung der EM fehlt. Aus diesem Grund erscheint eine Kombination der Methoden am Präparat sinnvoll, um von einem im EM visualisierten Erreger mit Hilfe der Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) nachfolgend ein charakteristisches Spektrum aufzunehmen. Im Zuge des Projekts sollte ein TERS-kompatibles Negativ-Kontrastverfahren erarbeitet werden. Diese Kombination ermöglicht die Gewinnung von morphologischen und spektroskopischen Informationen über ein Viruspartikel oder das eines anderen Mikroorganismus. Daher war ein Ziel dieser Arbeit EM-Grids zu evaluieren und die Methode der Negativ-Kontrastierung so zu optimieren, dass diese für eine Korrelation von TEM und TERS verwendet werden kann. Des Weiteren sollten alle in der EM gängigen Substanzen und Materialien auf Raman-Signale untersucht werden und falls nötig eine Alternative für diejenigen gefunden werden, die für eine Kopplung von TEM und TERS nicht geeignet sind. Dieses korrelative Verfahren sollte sich auch für die Untersuchung biologisch und medizinisch relevanter Erreger, zu denen auch exogene und endogene Retroviren gehören, eignen. Bisher konnten TERS-Spektren von TMV [24], Pocken und AAV [22] gezeigt werden. Für wissenschaftliche Fragestellungen sollten jedoch auch andere Viren wie z.B. HIV oder HERV vermessen werden. So könnten eventuell die viralen HERV-K-Partikel, welche in Geweben von Krebspatienten gefunden wurden [94, 95], mittels TERS-

Spektrum spezifisch identifiziert werden und helfen, Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Das menschliche Genom besteht aus ca. 8% endogener retroviraler Elemente, die zum Teil hochkonserviert vorliegen. Einige dieser endogenen Retroviren besitzen für alle viralen Proteine offene Leserahmen. Seit der Integration der Retroviren ins Genom kam es zu einigen postinsertionalen Mutationen, welche dazu führten, dass keine funktionstüchtigen Partikel von HERV-K113 gebildet werden können. Nach Revertierung von 25 nicht synonymen, sowie drei weiteren postinsertionalen Mutationen in der LTR von HERV-K113, konnte ein originaler Moleklarklon von HERV-K113, namens ori HERV-K113, erfolgreich hergestellt werden. Mit ori HERV-K113 ließen sich infektiöse Partikel bilden, eine Replikation des Virus konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Dissertation, Nadine Beimforde). Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein humanes endogenes Retrovirus der Familie K(HML-2) mit allen 25 nicht synonymen und den 17 synonymen postinsertionalen Mutationen rekonstituiert und so ein neuer originaler Moleklarklon hergestellt werden, wie er höchstwahrscheinlich zum Zeitpunkt der Integration vorlag. Dieses Retrovirus sollte in der EM dargestellt und ein TERS-Spektrum, als „*Proof of Principle*“ für TERS, eines Retrovirus aufgenommen werden. Des Weiteren sollte das Replikationspotential des Retrovirus sowie eine potentielle Inhibition durch zelluläre antivirale Faktoren untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere eruiert werden, ob eine Inhibition nach Eintritt der Virionen in die Zelle und vor der Transkription des integrierten Provirus (Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition) stattfindet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1) Geräteauflistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle

Geräte	Hersteller
CO ₂ -Inkubator C 200 für eukaryotische Zellen	Labotect, Göttingen, Deutschland
Coulter-Counter Z2	Coulter Electronics Inc., Miami, USA
Diamantmesser Ultra 45°	Diatome AG, Biel, Schweiz
DNA Engine Thermocycler	BioRad, Hercules, USA
Einbettautomat Leica EM TP	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Feinwaage TE	Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Filmentwicklermaschine Agfa Curix 60	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Freezing container, Nalgene® Mr. Frosty	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Gelelektrophoresekamern: 1. Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System 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
Kryo-Einfriergerät	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kühl-Heiz-Thermomixer KTMR-133	HLC, Bovenden, Deutschland
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Oak Ridge, USA
Magnetrührer IKA RTC	IKA Labortechnik GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Osterod, Deutschland
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrofuge 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Mikroskope:	
1. Transelektronenmikroskop Tecnai 12 CCD-Kamera MegaView II	FEI Company, Hillsboro, USA Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
2. Inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Nanowizard II AFM	JPK Instrumenten AG, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
pH-Meter	Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Photometer UV-1202	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg, Deutschland
Power Pac HC	BioRad, Hercules, USA
Raman Spektrometer LabRam HR 800	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Deutschland
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
TAO Gestell	JPK Instrumenten AG, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, USA
Trimmer EM Rapid	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Ultramikrotom Ultracut S	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Ultramikrotom Ultracut UCT	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Ultrazentrifugen:	
1. Optima L100K SW 32Ti Rotor	Beckman Coulter, Fullerton, USA Beckman Coulter, Fullerton, USA
Ultrazentrifugen-Tubes:	
1. Thinwall Ultra-Clear™ Tubes	Beckman Coulter, Fullerton, USA
2. Thinwall Polyallomer konical Tubes	Beckman Coulter, Fullerton, USA
UV-Transilluminator	BioView, Billerica, USA
Vortex Mixer	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad HB4 Basic	IKA Labortechnik GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Zentrifugen:	
1. Hereaus Multifuge 1S-R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
2. Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

2.1.2 Labormaterialien

Tab. 2) Materialienauflistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle

Material	Hersteller
auf nicht poröses Silizium basierende Grids	TEMwindows SiMPore Inc., New York, USA
auf Siliziumdioxid basierende Grids	TEMwindows SiMPore Inc., New York, USA
auf Siliziumnitrid basierende Grids	TEMwindows SiMPore Inc., New York, USA
Blottmembran Roti® PVDF-Membran, 0,45µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Blottpapier, extra dick	Biorad, Hercules, USA
Einwegspritzen, steril, 20ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Elektroporationsküvetten, 2mm	Biorad, Hercules, USA
Eppendorfgefäß 1,5/2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falkon Tubes, steril, 15ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Falkon Tubes, steril, 50ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Film 18 x 24cm, Kodak Medical X-ray	Carestream Health Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland
Filmkassette, Kodak X-Ray	Carestream Health Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland
Filterpapier, ø 90cm	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland
Glasperlen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gridbox für 100 Grids	Agar Scientific, Stansted, England
Gridbox für 25 Grids	SiMPore UltraSM™, New York, USA
Kryoröhrchen, 2ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Kupfergrids, Cu 400 Mesh	Agar Scientific, Stansted, England
Parafilm, Größe S und M	Pechiney Plastic Packing, Chicago, USA
Pasteurpipetten, Einweg	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	neolab GmbH, Heidelberg, Deutschland
PCR-Tubes 200µl, Softstrips	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Petrischalen, steril, 10cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Polystyrol Beads 204nm ± 1,9nm	Agar Scientific, Stansted, England
Präzisionswischtücher KIMTECH Science	Kimberly-Clark Professional, Koblenz, Deutschland
Serologische Pipetten, Einweg	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Sterilfilter, Porengröße 0,45µm	Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland

Zellkulturflaschen, steril, 150cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen, steril, 75cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Petrischale 60cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten, steril, 6/12/24 Loch	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber, 24cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Tab. 3) Chemikalien-, Enzym- und Größenstandardauflistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle

Chemikalien/Enzyme	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ammoniumsulfat (APS, 10%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BigDye 3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
Bleicitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Complete Protease-Inhibitor (Tablette)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
dNTP's	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Epon-Epoxidharz (Glycilether 100, DMP-30, DDSA, MNA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Generuler 1kb Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Glutaraldehyd (GA, 2,5%)	TAAB Laboratories Equipment Ltd, Berkshire, England
Glycerin	Serva, Heidelberg, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Laufpuffer, 10x	BioRad, Hercules, USA

Magermilchpulver, Sucofin	TSI GmbH & Co.KG, Zeven, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad, Hercules, USA
Natriumazid, 3x	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 10%	BioRad, Hercules, USA
Natriumhydroxid, Plätzchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Orange-G	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Osmiumtetroxid, 99,9%	Koch-Light-Laboratories Ltd., Colnbrook, England
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Phosphowolframsäure (PTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pioloform	Agar Scientific, Stansted, England
Polybrene®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Propylenoxid, 100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Red-Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, 96%	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>T4</i> -DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Transferpuffer, 10x	BioRad, Hercules, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin (0,25%)/EDTA (0,2%)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat-Dihydrat (UA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Antibiotika

Tab. 4) Antibiotikaaufstellung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle

Antibiotika	Bezugsquelle
Ampicillin (Amp)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep 100x)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

2.1.5 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tab. 5) Puffer-, Lösungs- und Nährmedienaufstellung mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung

Puffer/Lösungen und Nährmedien	Zusammensetzung
2x TY-Agar	2xTY-Medium mit 20g/l Agar
2x TY-Medium	1% Bacto-Trypton, 1% Bacto-Hefe-Extrakt, 0,5% Natriumchlorid; pH 7,0
APS, 10%	10% Ammoniumpersulfat in <i>A.bidest.</i> , steril filtriert
Blockingpuffer	5% Milchpulver in PBS/Tween20 (1%)
Blot Processing-Puffer	10% 10xTris/Glycerin/SDS Puffer + 90% <i>A.bidest.</i>
Blot Transfer-Puffer	10% 10xTris/Glycerin Puffer + 20% Methanol + 70% <i>A.bidest.</i>
DNA-Ladepuffer, 6x	10mM Tris-Acetat, 50mM EDTA, 10% Ficoll-400 (w/v), 0,4% Orange-G (w/v) in <i>A.bidest.</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low Glucose (g/l) with L-Glutamin (584mg/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Einfriermedium für eukaryotische Zellen	90% FKS, 10% DMSO
HEPES Buffer Saline (2xHBS),	1M Natriumchlorid (NaCl), 0,5M HEPES, 0,15M Na ₂ HPO ₄ ; (pH 7,1)
Laemmli-Puffer (4x)	200mM Tris Cl, pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 40% (w/v) Glycerin, 400mM Dithiothreitol (DTT)
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar
LB-Medium	1% Bacto-Hefe-Extrakt, 1% NaCl in <i>A.bidest.</i> ; pH 7,0
Milchpulverpuffer	5% (w/v) Magermilchpulver + 0,1% Tween20 in PBS
Phosphate Buffer Saline (PBS)	123mM NaCl, 2, 7mM Kaliumchlorid (KCL), 10mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 2mM Kalium-Di-Hydrogenphosphat; pH 7,0
PBS/Tween20 (0,1%)	0,1% Tween20 in PBS

RPMI-1640 with L-Glutamin (300mg/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
SOB-Medium	20g Bacto-Tryptone, 5g Bacto-Hefe-Extrakt, 0,186g KCl, 0,584g NaCl in 970ml <i>A.bidest.</i> ; pH 7,0
SOC-Medium	97% SOB-Medium, 1% Mg-Mix, 2% Glukose
TAE, 1x	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA; pH 7,2
TE, 1x	10mM Tris/HCl, 1mM EDTA; pH 8,0
TFB 1	100mM Rubidiumchlorid, 50mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂), 30mM Kaliumacetat, 10mM Kalziumchlorid, 15% Glycerin, pH 5,8, steril filtriert
TFB 2	10mM MOPS, 10mM Rubidiumchlorid, 75mM Kalziumchlorid, 15% Glycerin, pH 6,8 mit Kaliumhydroxid eingestellt, steril filtriert
Zelllysispuffer	1% Triton X-100, 20mM Tris (pH 7,7), 150mM Natriumchlorid

LB-Medium bzw. LB-Agar wurden mit Ampicillin (100µg/ml) versetzt. DMEM-Medium (PAA) war mit L-Glutamin versetzt (laut Hersteller) und wurde, vor dem Gebrauch, zusätzlich mit FKS (10%) und Penicillin und Streptomycin (100µg/ml) komplementiert. RPMI-1640 wurde zusätzlich mit 10% FKS versetzt.

2.1.6 Kits

Tab. 6) Kitauflistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle

Kits	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
HS-Mg RT Activity Kit	Cavidi, Uppsala, Schweden
Luciferase 1000 Assay System	Promega Corporation Madison, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuickChange [®] Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland

Super Signal West Dura Extendet Duration Substrate

Thermo Scientific, Logan, USA

2.1.7 Bakterienstämme

Es wurde mit elektrokompenten *Escherischa coli* (*E.coli*) One Shot® Top10 oder mit chemischkompetenten *E.coli* One Shot® Stbl3 von der Firma Invitrogen gearbeitet.

2.1.8 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 7) Zelllinienauflistung mit Angabe zur Herkunft und ihrer jeweiligen Bezugsquelle

Zelllinien	Organismus	Ursprungsgewebe	Zellkulturmedium	Bezugsquelle
HEK 293T	Mensch	Niere	DMEM, 10% FKS, 0,5% Penicillin, Streptomycin	Bannert <i>et al.</i>
Huh7	Mensch	Leber	DMEM, 10% FKS, 0,5% Penicillin, Streptomycin	Bannert <i>et al.</i>
LNCaP	Mensch	Prostata	RPMI, 10% FKS	Bannert <i>et al.</i>
DU 145	Mensch	Prostata	DMEM, 10% FKS, 0,5% Penicillin, Streptomycin	Bannert <i>et al.</i>
CrFK	Katze	Niere	DMEM, 10% FKS, 0,5% Penicillin, Streptomycin	Norley <i>et al.</i>
Cf2Th	Hund	Thymus	DMEM, 10% FKS, 0,5% Penicillin, Streptomycin	Bannert <i>et al.</i>

2.1.9 Konstrukte/Vektoren

Tab. 8) Konstruktaufistung mit ihrem jeweiligen Vektor und Bezugsquelle

Konstrukte	Vektor	Bezugsquelle
CMVoricoGPP	pcDNA 3.1	[185]
CMVoriEGFP	pTH	Philipp Kramer, n.p.
CMVoriLuci	pTH	Philipp Kramer, n.p.
CMVRU5ori_st	pcDNA 3.1	Veronika Lausch, n.p.
ori	pcDNA 3.1	Nadine Beimforde, n.p.
ori_st	pcDNA3.1/pBSK	Veronika Lausch, n.p.
orico Env _{Δ659-699} (EnvΔC)	pcDNA 3.1	[122]

orico Rec_V5	pcDNA 3.1	Dissertation, Kirsten Hanke, 2010
pSVIII-KS (HIV-1 EnvΔKS)	pcDNA 3.1	[186, 187]
VSV-G (EnvVSV-G)	pcDNA 3.1	[186, 188]

2.1.10 Oligonukleotide/Primer

Die Herstellung von Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Invitrogen. Primer wurden auf eine Endkonzentration von 10µM gebracht und bei -20°C gelagert. Die Anwendung von Oligonukleotiden bezog sich auf die Sequenzierung, Amplifikations- und Mutagenese-PCR-Reaktionen. Eine detaillierte Liste der Sequenzen und Verwendung von den Primern befindet sich im Anhang (s. 7.1)

2.1.11 Antikörper

Tab. 9) Antikörperauflistung mit ihrer jeweiligen Spezies und Bezugsquelle

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
HERV-K_Env (A-h HERV K env 79kDa IgG2a 100)	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA
α-Capsid-HERV-K	Ratte	Hohn et. al.
α-Gag-HERV-K	Ratte	Hohn et. al.
α-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV-K) capsid protein IgG	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA
α-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV-K) envelope protein IgG	Maus	Austral Biologicals, San Ramon, USA
α-Human IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α-Mouse IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α-Rabbit IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α-Rat IgG-HRP	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α-TRIM5α hu IgG1	Maus	Thermo Scientific, Rockford, USA
α-Tubulin (monoklonaler Ak)	Kaninchen	Epitomics Inc., Burlingame, USA
α-V5	Maus	AbD Serotec, Raleigh, USA

2.1.12 Software

Tab. 10) Softwareauflistung mit der jeweiligen Bezugsquelle

Software	Hersteller
Adobe® Illustrator CS5.1	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Adobe® Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Berthold Luminometer Analysis Software	Berthold Technologies, Oak Ridge, USA
Clone Manager 9 Professional Edition	Sci-Ed Software, Cary, USA
EndNote	Thomson Reuters, Philadelphia, USA
GraphPad Prism5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
iTEM	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Power Point 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop ND-1000 v.3.3	Nanodrop, Wilmington, USA
SPSS Statistics	IBM, New York, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Messungen der gängigen EM Substanzen und Materialien

Hierbei wurde ein Tropfen der verschiedenen Substrate auf Calciumfluorid-Plättchen gegeben und mittels Raman-Spektrometer auf ihr Spektrum untersucht. Pioloform-befilmte Trägernetzchen wurden ebenfalls mit Hilfe der Raman-Spektroskopie untersucht.

2.2.2 Trägernetzchen

Trägernetzchen (Grids) bestehen meistens aus Metallen wie z.B. Kupfer und können verschieden viele Maschen (sogenannte Meshes) besitzen (s. Abb. 12). Die bei der Probendiagnostik gängigen Grids besitzen ca. 400 Maschen.

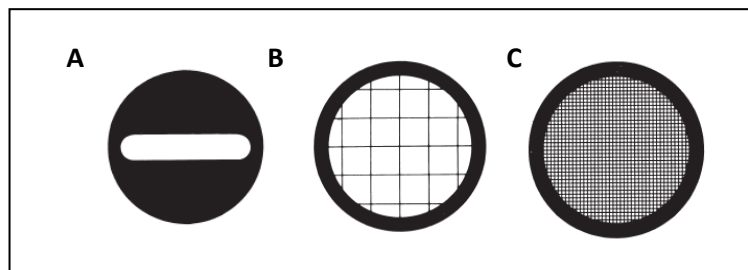


Abb. 12) Trägernetzchen mit verschiedenen großen Meshes

Trägernetz mit A) Schlitzelektrode, B) 50 Mesh und C) 400 Mesh, (Abb. nach Plano GmbH)

In der EM werden Grids verwendet, um auf ihnen Viren, Bakterien und andere Mikroorganismen oder ebenso Zellschnitte sowie Proteine anzulagern. Anschließend werden diese biologischen Proben elektronenmikroskopisch analysiert.

2.2.2.1 Kupfer-Grids

Die Grids, welche als Kontrolle für die Auszählungen und Evaluierungen dienen, waren mit Pioloform-befilmte 400 Mesh Kupfer-Grids (s. Tab. 3). Die Meshes haben

eine Größe von ca. $46\mu\text{m} \times 46\mu\text{m}$. Die Grids wurden mit einer dünnen Kohleschicht bedampft. Grids, welche für Präparationen von Ultradünnschnitten (s. 2.2.3.2) verwendet wurden, wurden nicht befilmt oder bekohlt. Im weiteren Verlauf der Doktorarbeit werden Pioloform-befilmte und Kohle-bedampfte Kupfer-Grids nur noch Pioloform-Grids genannt.

2.2.2.2 Silizium-basierte Grids

Die auf Silizium-basierten Grids (Si-Grids) sind mit einem 15nm dicken nicht porösen Silizium-Film (n.p. Si-Grid), einem 20-50nm dicken Siliziumnitrid-Film (SiN-Grid) oder einem 40nm dicken Siliziumdioxid-Film (SiO_2 -Grid) beschichtet. Die Grids besitzen neun Meshes, wobei acht Meshes eine Größe von $100 \times 100\mu\text{m}$ haben und ein Mesh eine Größe von $350 \times 100\mu\text{m}$ hat. Eine Bekohlung der Si-Grids wurde nicht vorgenommen.

2.2.3 Präparation und Kontrastierung

Mikroorganismen können mit Hilfe verschiedener Schwermetalle wie z.B. Uranylacetat (UA) oder Phosphorwolframsäure (PTA) kontrastiert werden, so dass die Organismen anschließend im EM visualisiert werden können. Ebenso gibt es verschiedene Schwermetalle wie Bleicitrat und Osmiumtetroxid, welche z.B. für die Kontrastierung von Zellschnittpräparate verwendet werden. In der EM gibt es zwei verschiedene Kontrastierungstechniken: Positiv-Kontrastierung und Negativ-Kontrastierung.

2.2.3.1 Präparation von Viren, Bakterien und anderen Mikroorganismen in Lösung

Die Probenpräparation für kleinere Partikel und Organismen wie kleinen Viren, z.B. Adeno-assoziierte Viren, erfolgte nach der „Grid-auf-Tropfen“- (*grid on drop*) Methode, wobei ein Grid mit der hydrophilen Seite nach unten auf den Probentropfen (ca. 25 μ l) gelegt wurde. Die Hydrophilisierung der Grids erfolgte entweder chemisch mit Hilfe von Alcianblau (Sigma-Aldrich) oder physikalisch mit Hilfe von Beglimmung (s. Abb. 13). Für eine chemische Hydrophilisierung wurden die Grids vor der Präparation ca. 20 min auf einem Tropfen 1%iger Alcianblau-Lösung (ca. 25 μ l) inkubiert. Die Inkubation von Grids mit Alcianblau sorgt für eine höhere Hydrophilität und Klebrigkeit [189]. Für eine physikalische Hydrophilisierung wurden Grids für 2 min bei einer Stromstärke von 25mA beglimmt. Nach 24 Stunden (h) erfolgte die Probenpräparation. Für die Beglimmungsoptimierung von SiN-Grids wurden verschiedene Beglimmungsdauern (zw. 0-4min), Stromstärken (zw. 0-50mA), Abstände (3cm, 7cm (normal)) und Beglimmungsladung (positive oder negative Beglimmung) verwendet. Bei dem Beglimmungsprozess (s. Abb. 13.) werden Elektronen von der Kathode in Richtung Anode beschleunigt. Treffen die Elektronen auf das Grid, wird dieses negativ polarisiert und hydrophiler im Vergleich zum unpolaren SiN-Grid. Aufgrund des elektrischen Feldes werden Elektronen auf der gesamten Strecke zwischen Kathode und Anode beschleunigt. Dies bedeutet, dass die höchste kinetische Energie beim Aufprall auf der Anode erreicht wird. Durch den Zusammenstoß mit einem Grid, wird ein Teil oder auch die gesamte Energie auf den Stoßpartner übertragen, wodurch die Aufprallgeschwindigkeit von der mittleren freien Weglänge der Elektronen abhängt. Eine Verschiebung der Probe Richtung Kathode führt zu einer geringeren Elektronengeschwindigkeit, da die Beschleunigungsstrecke verkürzt wird. Allerdings nimmt die elektrische Feldstärke im Raum zwischen Anode und

Kathode zu, wodurch wahrscheinlich mehr Ladungsträger auf die Probe treffen, so dass die ganze Probe eine homogenere negative Ladung erhält.

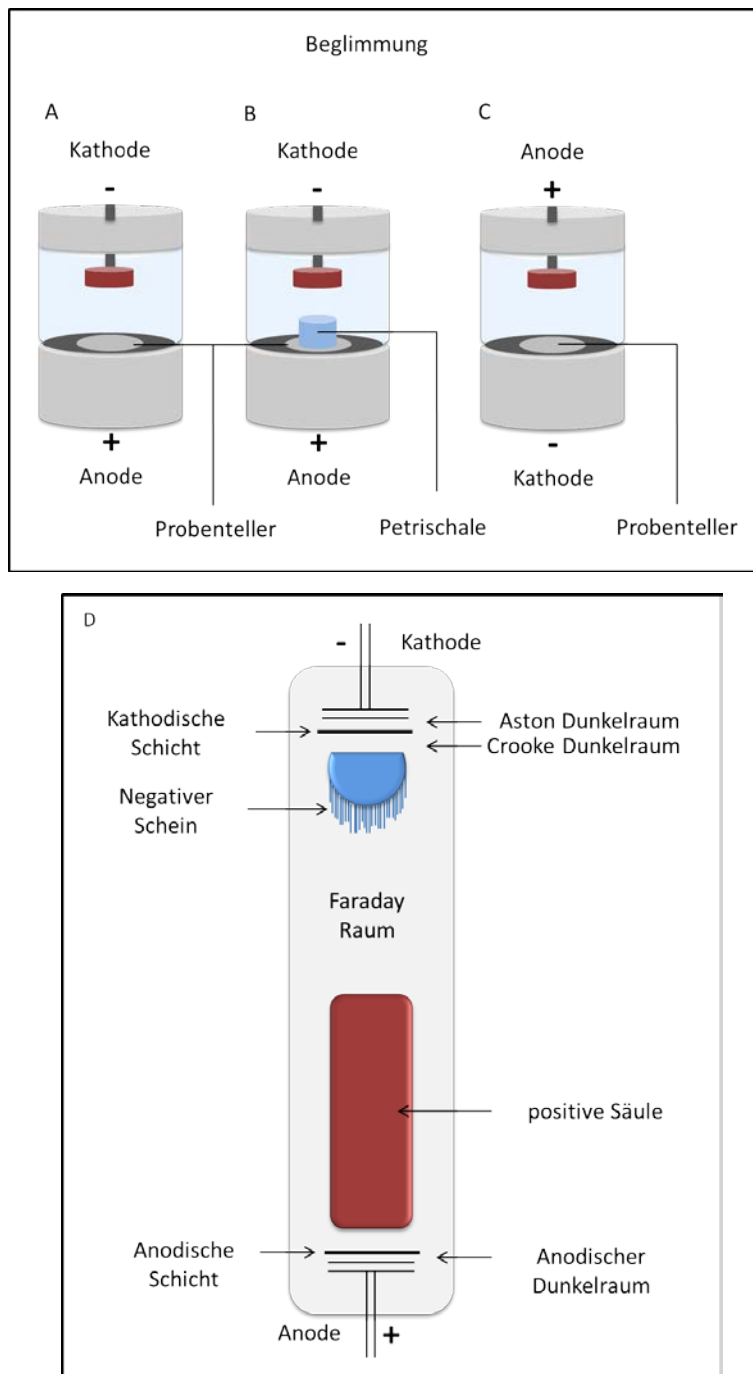


Abb. 13) Schematische Abbildung des Beglimmungsprozess

A) zeigt die Beglimmungs-Apparatur unter normalen Umständen. **B)** zeigt die Apparatur mit Verringerung des Abstandes und **C)** zeigt die Apparatur bei der Einstellung von positiver Beglimmung **D)** Bei dem Beglimmungsprozess werden Elektronen von der Kathode in Richtung Anode beschleunigt. Treffen die Elektronen auf das Grid, werden die Grids negativ polarisiert und hydrophiler im Vergleich zum unpolaren SiN-Grids. Aufgrund des elektrischen Feldes werden Elektronen auf der gesamten Strecke zwischen Kathode und Anode beschleunigt.

Um große Organismen, wie z.B. Pocken oder Bakterien, zu präparieren, wurde die „Tropfen-auf-Grid“- (*drop on grid*) Methode angewendet [4]. Hierbei wurde der Proben tropfen auf die hydrophile Seite des Grids gegeben (ca. 10µl). Die Inkubationszeit betrug bei beiden Präparationsmethoden in der Regel 10 min. Bei der Optimierung der Inkubationsdauer für die SiN-Grids, variierte die Inkubationszeit zwischen 1 und 30 min. Anschließend wurden die Grids mittels Pinzette vorsichtig aufgenommen und die restliche Flüssigkeit mit Hilfe eines Filterpapiers abgezogen. Danach folgten vier Waschschr itte mit *A.bidest.*, wobei die Grids, mit der hydrophilen Seite nach unten, für ca. 5 Sekunden (sek). in jedem *A.bidest.*-Tropfen (ca. 25µl) gewaschen wurden [189, 190]. Bei der Optimierung der Waschschr itte für die Evaluierung der SiN-Grids variierten die Waschschr itte zwischen einem und fünf. Die restliche Flüssigkeit wurde mittels Filterpapier von den Grids abgezogen und anschließend wurden die Grids mittels Schwermetalle negativ-kontrastiert.

Negativ-Kontrastierung

Bei der Negativ-Kontrastierung wurden Grids mit einer 1-2%igen UA- (ca. 25µl) oder einer 0,5-1%igen PTA-Lösung (ca. 25µl) für 5 sek kontrastiert. Hierbei lagern sich die Schwermetalle um die Mikroorganismen und bilden so einen schwarzen Ring. Das Innere des Organismus bleibt ungefärbt, so dass ein typisches Negativbild im EM entsteht (s. Abb. 14). Die Organismen werden in starkstreuenden Schwermetallen eingelagert. Die geringe Massendichte im Bereich der Organismen, wird durch die Strahlstromdichte im Bereich der Partikel erhöht. Die von den Schwermetallen umlagerten Partikel erscheinen hell in dunkler Umgebung [191].

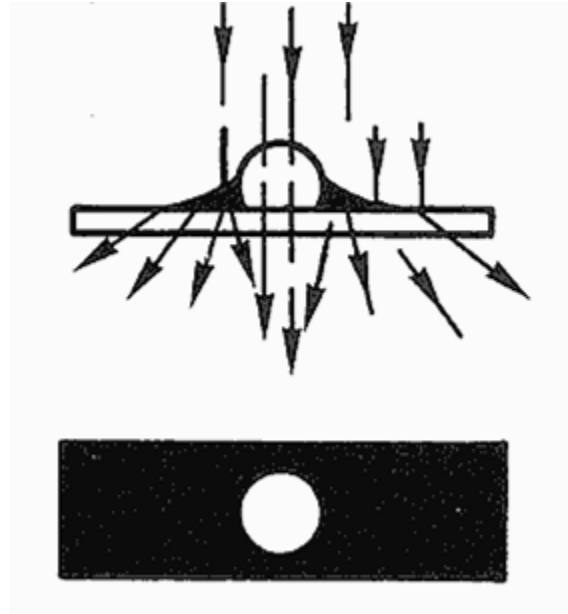


Abb. 14) Schematische Abbildung der Objektabbildung mit Negativ-Kontrastierung

Die Partikel sind mit elektronendichten und -streuenden Materialien wie UAs kontrastiert und die Massendichte in Partikelnähe wird verringert, so dass sich die Strahlstromdichte im Bereich der Partikel erhöht. Die Partikel erscheinen hell, die Umgebung dunkel. Abb. nach [191]

Nach 15 min wurden die Grids im EM analysiert. Bei den Evaluationsversuchen der SiN-Grids für die Kopplung von TEM und TERS sollte die PTA-Konzentration so gering wie möglich gehalten werden, um störende Ramansignale zu minimieren bzw. zu verringern. Daher wurde für die Negativ-Kontrastierung bei der Evaluation der SiN-Grids eine 0,5%ige PTA-Lösung verwendet.

2.2.3.2 Präparation von Ultradünnschnitte auf Grids

Zellkultivierung für Ultradünnschnitt-Präparationen

Die Zellen wurden, 96 h nach der Transfektion, mit einer 1%igen PBS-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit einer 2,5%igen Glutaraldehyd (GA) in 0,05M HEPES Lösung für 1 h bei Raumtemperatur (RTemp). Die Zellen wurden danach geerntet und in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt.

Zellpelletpräparation für eine Epon-Einbettung

Die Zellen wurden 15 min bei 5000rpm zentrifugiert. Der Überstand (ÜS) wurde verworfen und die Zellen in einer 0,05M HEPES-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde vorsichtig der ÜS von den Zellen abgenommen und verworfen. Anschließend wurde, mit 3%iger Agarose, das Zellpellet eingeschlossen und die Probe 2 min bei 15700g zentrifugiert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels Ultrazentrifugation über ein Succrosekissen (20%) aufgereinigt (s. 2.2.7.6). Anschließend wurde, mit 3%iger Agarose, das Viruspellet ebenfalls eingeschlossen und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Das Virus-Agarosepellet wurde mit 1ml einer 2,5%igen GA in 0,05M HEPES Lösung 1 h bei RT fixiert. Die in Agar eingebetteten, Proben wurden zurechtgeschnitten und 2x mit *A.bidest.* gewaschen. Anschließend wurden die Proben 1 h bei RT mit Osmiumtetroxid kontrastiert und fixiert. Das Wasser in den Proben wurde gegen Ethanol und abschließend gegen ein Epon-Propylenoxid-Gemisch ausgetauscht. Zum Abschluss wurden die Proben in Epon eingebettet und zum Aushärten bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Trimmen und Schneiden der Präparate

Die in Epon eingebetteten Proben wurden mit einem Mikrotom für Ultradünnschnitte getrimmt und geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Diamantmessers in 60-70nm dünne Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend auf ein 400 Mesh-Kupfergrid gebracht und positiv-kontrastiert (s. u.).

Positiv-Kontrastierung

Als Positiv-Kontrastierung wird die Kontrastierung von Proteinen, Nukleinsäuren und biologische Strukturen bezeichnet. Diese heben sich daraufhin im EM von dem hellen nicht kontrastierten Hintergrund ab. Für die Kontrastierung wird zum einen Osmiumtetroxid und zum anderen Bleicitrat und UA verwendet. Hierbei wirkt Osmiumtetroxid auf die Lipide, dringt in die Zellmembranen ein und oxidiert

Doppelbindungen, das daraus entstehende Osmiumdioxid ist wasserunlöslich und kontrastiert die Partikel. Die Grids, mit den Ultradünnschnitten, wurden 20 min mit einer 2% UA-Lösung (ca. 25 μ l) kontrastiert. Anschließend wurden die Grids 3x mit *A.bidest.* gewaschen und mit Bleicitrat (ca. 25 μ l) für ca. 3 min erneut kontrastiert. Die Grids wurden danach einmal mit 0,02M NaOH gewaschen, mittels Filterpapier die restliche Flüssigkeit abgezogen und zweimal mit *A.bidest.* gewaschen. Die Grids waren nach 15min trocken und wurden im EM analysiert.

2.2.4 Elektronenmikroskopie-Transmissionselektronenmikroskopie

Ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) betrieben mit 120V, wurde zum Auszählen der Partikel auf den Grids verwendet. Die Bilder wurden mittels CCD-Kamera aufgenommen.

2.2.4.1 Partikelzählung

Die Auszählung von Partikeln auf Pioloform-befilmten Grids erfolgte auf 22 Meshes an unterschiedlichen Positionen von einem Grid (Gesamtfläche: 46.552 μ m²). Für Si-Grids wurden alle neun Meshes ausgezählt (Gesamtfläche: 115.000 μ m²) und die Partikel/Grid (46.552 μ m²) rechnerisch bestimmt, um die Si-Grids mit den Pioloform-Grids vergleichen zu können. Es wurden jeweils vier bis acht Grids jeden Typs pro Versuch ausgezählt und der Durchschnitt der Partikelanzahl/Grid (46.552 μ m²) rechnerisch mit Standardabweichung bestimmt.

2.2.5 Testsuspension

Ectromelia Virus Stamm Nu-1 (ECTV), ein Mäusepockenvirus, zur Verfügung gestellt von Dr. Hermann Meyer (Institute für Mikrobiologie, Deutsche Bundeswehr,

München), wurde als Stellvertreter für Viruspartikel und andere Mikroorganismen mit einer Konzentration von 10^6 PFU/ml (*plaque forming units*) eingesetzt. Des Weiteren wurde eine Suspension von Polystyrol Beads (Plano GmbH, Deutschland) mit einem Durchmesser von $204 \pm 1,9$ nm verwendet und in einer Konzentration von 10^8 Beads/ml eingesetzt.

Neue ECTVs wurden in Hep-2-Zellen produziert, welche 3-4 Tage zuvor mit einer *molecules of infection* (MOI) von 0,2 infiziert wurden. Die Zellen wurden geerntet und zerstört durch Dounce-Homogenisation (50 Zyklen), das Lysat wurde mittels niedrigtouriger Zentrifugation ($1500 \times g$) gereinigt und der ÜS über ein 30% Succrose-Kissen ultrazentrifugiert. Das Viruspellet wurde in 10 mM Tris Puffer (pH 9,0) aufgenommen und die infektiöse Viruspartikel Konzentration mit Hilfe einer Plaque-Assay-Verdünnungsreihe in Vero E6-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden 4-5 h nach Infektion mit einer Schicht von 1,6% Carboxy-Methylcellulose (CMC, Sigma Aldrich) bedeckt und für 3-4 Tage inkubiert, bevor die Zellen mit einer 3,7%igen Formaldehyd in PBS-Lösung für 20 min fixiert wurden. Anschließend erfolgte ein Waschschrift der Zellen mit Naphtalen Blauschwarz (Sigma Aldrich), um die Plaques zählen zu können. Die ECTV-Suspensionen wurden freundlicherweise von Daniel Stern (ZBS1, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland) hergestellt.

2.2.6 DNA-Analytik

2.2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird für die *in vitro* Vervielfältigung eines kompletten DNA-(Desoxyribonukleinsäure) Stranges oder Abschnittes verwendet und besteht aus mehreren Phasen: Denaturierung (D), Annealing (A) und Elongation (E). Im Folgenden sind die verschiedenen PCRs aufgeführt, welche für die Arbeit verwendet wurden.

Amplifikations-PCR

Die Amplifikations-PCR dient der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes. Diese PCR wurde in den folgenden Versuchen für die gezielte Insertion von Schnittstellen verwendet und unter folgenden Bedingungen durchgeführt (s. Tab. 11):

Tab. 11) Bedingungen und Komponenten für eine Amplifikations-PCR

Komponenten	Menge [μ l]	Cyclerbedingungen	
		Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
dsDNA Template (50ng)			
Primer 1	5	95	2 min
Primer 2	5	D: 95	30 sek
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase	1	A: 40-60	30 sek
Reaction Puffer (10x) <i>PfuTurbo</i>	5	E: 72	1 min/kb
dNTPs	2	72	2 min
QuickSolution (optional)	1	4	∞
<i>A.bidest.</i>	<i>ad 50</i>		

} 32-36
Zyklen

Die Annealingtemperatur ist primerabhängig und richtet sich nach den chemischen Eigenschaften der verwendeten Primer, z.B. Basenverhältnis und Molekulargewicht [192, 193] und wurde für jedes Primerpaar so berechnet, dass die Temperatur für beide Primer geeignet war. Die Elongationsdauer ist von der Polymerase und dem DNA-Abschnitt, welcher amplifiziert werden soll, abhängig. Nach Amplifikation des gewünschten Abschnitts, wurden DNA-Fragmente mittels DNA-Gelelektrophorese (s. 2.2.6.4) aufgetrennt und extrahiert (s. 2.2.6.5). Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels PCR-Purifikation Kit aufgereinigt (s. 2.2.6.5) und die DNA-Konzentration gemessen (s. 2.2.6.8). Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

Mutagenese-PCR

Eine Mutagenese-PCR dient zur Einführung einer gezielten Mutation an einer bestimmten Stelle in einem DNA-Strang oder Abschnitt. Hierbei können mehrere

Nukleotide (nt) (Multimutagenese, s. Tab. 12) oder nur ein einziges nt mutiert (Singlemutagenese, s. Tab. 13) werden. Für die nachfolgenden Versuche wurde mit Hilfe eines Mutagenese Kits bestimmte nt mutiert und folgende Komponenten und Bedingungen verwendet (s. Tab. 12, 13).

Tab. 12) Bedingungen und Komponenten für eine Multimutagenese-PCR

Komponenten	Menge [μ l]	Cyclerbedingungen	
		Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
dsDNA Template (100ng)			
Primer 1-3 (100ng/Primer)		95	1 min
Primer 4-5 (50ng/Primer)		D: 95	1 min
QuickEnzym	1	A: 55	30 sek
QuickChange Puffer (10x)	2,5	E: 65	2 min/kb
dNTPs	1	4	∞
QuickSolution (optional)	0,25		
<i>A.bidest.</i>	<i>ad 25</i>		

} 30
Zyklen

Tab. 13) Bedingungen und Komponenten für eine Singlemutagenese-PCR

Komponenten	Menge [μ l]	Cyclerbedingungen	
		Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
dsDNA Template (5-50ng)			
Primer 1 (125ng/Primer)		95	30 sek
Primer 2 (125ng/Primer)		D: 95	30 sek
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase	1	A: 55	1 min
Puffer (10x) <i>PfuTurbo</i>	5	E: 68	1 min/kb
dNTPs	1	4	∞
QuickSolution (optional)	1		
<i>A.bidest.</i>	<i>ad 50</i>		

} 12-18
Zyklen

Bei der Singlemutagenese richteten sich die Zyklen nach den betreffenden Mutationen. Lag eine Punktmutation im DNA-Abschnitt vor, so wurden 12 Zyklen gefahren, bei einem einzelnen Aminosäureaustausch 16 Zyklen und bei mehreren Aminosäure-Deletionen oder -Insertionen wurden 18 Zyklen gefahren. Alle Mutagenese-PCRs wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI für 1 h bei 37 $^{\circ}$ C geschnitten. Dabei erkennt das Restriktionsenzym DpnI die methylierten DNA-

Fragmente und schneidet diese, so dass nach einem Restriktionsverdau (s. 2.2.6.2) mit diesem Enzym nur neu synthetisierte DNA-Stränge bleiben. Die mutierten und verdauten DNA-Fragmente wurde anschließend mittels Transformation (s. 2.2.6.7) in *E.coli* überführt, die vereinzelt Kolonien aufgereinigt (s. 2.2.6.5), die DNA-Konzentration (s. 2.2.6.8) bestimmt und die DNA-Proben mittel Sequenzierungs-PCR (s.u.) für die Sequenzierung vorbereitet. Die Lagerung der DNA-Proben erfolgte bei -20°C.

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Überprüfung einer Kolonie nach einer Ligation (s. 2.2.6.3) anstelle von einer Aufreinigung eines DNA-Fragmentes aus *E.coli*. (s. 2.2.6.5), durchgeführt. Die folgenden Bedingungen und Komponenten wurden in nachfolgenden Experimenten verwendet (s. Tab. 14).

Tab. 14) Bedingungen und Komponenten für eine Kolonie-PCR

Komponenten	Menge [µl]	Cyclerbedingungen	
		Temperatur [°C]	Dauer
Kolonie/dsDNA-Template (5-50ng)			
Primer 1 (vorwärts)	1,25	95	5 min
Primer 2 (rückwärts)	1,25	D: 95	3 sek
<i>RedTaq</i> -DNA-Polymerase	0,25	A: 40-60	30 sek
<i>RedTaq</i> Puffer (10x)	2,5	E: 72	1 min/kb
dNTPs	0,5	72	7 min
QuickSolution (optional)	0,5	4	∞
<i>A.bidest.</i>	<i>ad 25</i>		

} 25-30
Zyklen

Anschließend erfolgte die Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente mittels DNA-Gelelektrophorese (s. 2.2.6.4). Konnte die berechnete Fragmentgröße im Gel detektiert werden, wurde aus dieser positiven Kolonie die DNA aufgereinigt (s. 2.2.6.5), mittels Sequenzierung (s.u.) überprüft und für weitere Verwendungen bei -20°C gelagert.

Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR dient der Vervielfältigung von DNA-Strängen zur Überprüfung von Mutagenese-PCRs, Kolonie-PCRs, Ligationen oder DNA-Restriktion mit Endonukleasen. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode [194] und für eine Sequenzierungs-PCR wurden folgende Komponenten und Bedingungen für nachfolgende Versuche verwendet (s. Tab. 15).

Tab. 15) Bedingungen und Komponenten für eine Sequenzierungs-PCR

Komponenten	Menge [μ l]	Cyclerbedingungen	
		$^{\circ}$ C	Dauer
DNA Template (150-300ng)	1-4		
Primer (10 μ M)	0,5	96	2 min
<i>Abi BigDye 3.1[®] Mix</i>	1	D: 96	10 sek
<i>Abi BigDye 3.1 Puffer (5x)</i>	1	A: 40-60	10 sek
<i>A.bidest.</i>	<i>ad 10</i>	E: 60	4 min
		4	∞

} 25
Zyklen

Der BigDye 3.1 Mix besteht aus einer *AmpliTaq*-DNA-Polymerase, dNTPs und einen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphat-Mix (ddNTPs). Die mittels PCR generierten DNA-Fragmente wurden im Sequenzierungslabor des Robert Koch-Institutes mittels BioEdit Sequence Aligment Editor [195] sequenziert und mit Hilfe des Programms CloneManager ausgewertet.

2.2.6.2 Restriktion mit Endonukleasen

Die Restriktion von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe von Endonukleasen. Diese Enzyme erkennen bestimmte Nukleinsäuresequenzen und können diese spezifisch schneiden. Eine Restriktion mit Endonukleasen wird zur Überprüfung von Ligationen, Mutationen, Vektoren und Genen durchgeführt. Mit den Endonukleasen entstehen durch den Schnitt entweder 5'-, 3'-Überhänge oder glatte Enden. Alle Enzyme, die nicht aus den Kits stammen, wurden von NEB bezogen und unter

Herstellerangaben mit den jeweiligen Puffern verwendet. Für die nachfolgenden Versuche, wurden die folgenden Komponenten und Bedingungen genutzt (s. Tab. 16).

Tab. 16) Bedingungen und Komponenten für einen Restriktionsverdau mittels Endonukleasen

Komponenten	Menge [μ l]	Besondere Restriktionsenzyme		
		$^{\circ}$ C	Dauer	Enzym
DNA Template (ca. 200ng)				
Enzym 1	0,25-0,5	25	15 min	Apal
Enzym 2*	0,25-0,5	37	ü.N.	
Restriktionspuffer (10x)	1	60	2 h	Bzgl*
BSA (enzymabhängig, 100x)	0,1	* bei Doppel-Restriktionsverdau		
<i>A.bidest.</i>	<i>ad 10</i>	** Inaktivierung erfolgte für 20 min bei 80°C		

Alle Restriktionsansätze, die nicht in Tab. 16 unter „besondere Restriktionsenzyme“ aufgeführt sind, wurden bei 37°C für 1-2 h inkubiert. Die Enzyme in den Restriktionsansätzen wurden für 20 min bei 60°C inaktiviert, wenn mit zwei Endonukleasen geschnitten werden sollte. Alle Restriktionsansätze, welche nicht für die Ligation mit einem anderen DNA-Fragment eingesetzt wurden, wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *calif interstine phosphatase* (CIP) für 30 min bei 37°C (bei 3'-Ende) bzw. für 30 min bei 56°C (bei 5'-Ende und glatten Enden) inkubiert. CIP katalysiert die Hydrolyse von freien Phosphatbindungen und dephosphoryliert die DNA, so dass die freien DNA-Enden nicht rekombinieren können. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden mittels Ligation (s. 2.2.6.3) in *E.coli.* transformiert (s. 2.2.6.7) oder mittels DNA-Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.6.4) nach ihrer Größe aufgetrennt.

2.2.6.3 Ligation

Mit Hilfe einer Ligation werden DNA-Fragmenten miteinander verbunden. Dabei wird ein kleines DNA-Fragment (Insert, bis ca. 3000kb) mittels des Enzyms Ligase an ein großes DNA-Fragment (Vektor), welches vorzugsweise eine Antibiotika-Resistenz besitzt, ligiert. Hierbei werden die freien 3'-Hydroxy- und die 5'-Phosphat-Enden miteinander verknüpft. Für die nachfolgenden Ligationen wurden die in Tab. 17 aufgeführten Komponenten und Bedingungen verwendet.

Tab. 17) Bedingungen und Komponenten für einen Restriktionsverdau mittels Endonukleasen

Komponenten	Menge [µl]	°C	Dauer
DNA (Insert) [ng]		25	1-4 h
DNA (Vektor) ca. 25ng	1	oder	
T4 DNA Ligase	0,5	16	ü.N.
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	1		
<i>A.bidest.</i>	<i>ad 10</i>		

Die Menge des DNA-Inserts lässt sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{5x \text{ Vektor[ng]} x \text{ Insertgröße [bp]}}{\text{Vektorgröße [bp]}}$$

Nach Ligation von DNA-Insert mit DNA-Vektor wurde der Ligationsansatz mittels Transformation (s. 2.2.6.7) in kompetente *E.coli*. Top10 oder Stbl3 überführt, auf LB-Amp-Platten selektiert, vereinzelte Kolonien aufgereinigt (s. 2.2.6.5) und sequenziert (s. 2.2.6.1) oder mittels Kolonie-PCR (s. 2.2.6.1) überprüft.

2.2.6.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Agarosegelelektrophorese dient zur Qualitätskontrolle und um DNA-Fragmente nach ihrer Größe und Ladung aufzutrennen und zu analysieren oder zu extrahieren (s. 2.2.6.5). Dabei wurde für große DNA-Fragmente ein 0,8% Agarosegel

hergestellt, ansonsten wurde ein 1% Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer vollständig aufgelöst und mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt [196]. Mit Hilfe des EtBr, welches mit den Nukleotiden der DNA-Fragmente interkaliert, werden die Fragmente unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302nm sichtbar. Die DNA-Fragmente wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und bei einer angelegten Spannung zwischen 70-100V (PowerPac) in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Gelkammer aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde der Größenstandard Generuler 1kb Ladder Plus mitgeführt. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe eines Geldokumentationsgeräts fotografiert oder die DNA-Fragmente extrahiert (s. 2.2.6.5).

2.2.6.5 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

PCR-Aufreinigung

Die Aufreinigung von Nukleinsäure aus PCR-Reaktionen wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt. Es wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren und die Elution erfolgte in 50µl *A.bidest.*

DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpells auf einer UV-Schneideplatte ausgeschnitten. Die DNA-Gelstücke wurden in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und gewogen. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mittels QIAquick Gel Extraction Kit. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und die Elution wurde in 30-50µl *A.bidest.* aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoDrop 1000 bestimmt und für spätere Versuche bei -20°C gelagert.

Maxi-Präparation

Die Herstellung von großen Mengen Plasmid-DNA erfolgte in kompetenten *E.coli* Top10 oder Stbl3 Bakterien. Hierfür wurden vereinzelte DNA-Kolonien in ca. 5ml LB-Amp-Medium für 8 h bei ca. 200rpm angeschüttelt und anschließend 250µl der Suspension in Schikanekolben mit 250ml LB-Amp Medium ü.N. weiter kultiviert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Endo-free Plasmid Maxi Kit. Die Durchführung wurde nach Herstellerangaben vorgenommen und die Elution der DNA erfolgte mit ca. 200µl *A.bidest.* Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoDrop 1000 bestimmt und für spätere Versuche bei -20°C gelagert.

Mini-Präparation

Die Herstellung von kleinen Mengen DNA-Plasmid wurde in kompetenten *E.coli* Top10 oder Stbl3 Bakterien produziert. Hierfür wurden vereinzelte DNA-Kolonien in ca. 5ml LB-Amp-Medium ü.N. bei 37°C, 200rpm angeschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit laut Herstellerangaben. Eine Elution der DNA erfolgte mit ca. 50µl *A.bidest.* Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA mit Hilfe des NanoDrop 1000 gemessen und für spätere Versuche bei -20°C gelagert.

2.2.6.6 Herstellung kompetenter *E.coli* One Shot Top 10 und Stbl3

Elektrokompetente E.coli

Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurden bei -80°C gelagerten *E.colis* verwendet. Weiterhin wurden diese auf 2xTY-Platten selektiert, um anschließend ü.N. Einzelkolonien in 10ml 2xTY-Medium bei 37°C, ca. 220rpm anzuschütteln. Aus den Übernachtskulturen wurden je 2,5ml in jeweils einen Schikanekolben mit 250ml 2xTY-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von ca. 0,6-0,8 bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Die OD wurde mit

Hilfe eines Photometers bestimmt. Aus jeweils zwei Kolben wurden die Bakteriensuspensionen vereinigt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in Zentrifugenbecher überführt, welche mittels 0,1N HCl desinfiziert und mit *A.bidest.* ausgewaschen wurden. Die Bakterien wurden 20 min bei 4256g, 4°C zentrifugiert und der ÜS verworfen. Das Pellet wurde in 250ml eiskaltem 1mM HEPES resuspendiert und erneut bei 4256g, 4°C für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 125ml 1mM HEPES resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen und die Pellets in je 25ml 1mM HEPES/10% Glycerin aufgenommen, in ein 50ml Falcongefäß überführt und bei 4000g, 4°C für 20 min zentrifugiert. Der ÜS wurde erneut verworfen und nochmal 5 min, 4000g, 4°C zentrifugiert. Nach der Entfernung des restlichen ÜS mit einer Pipette wurde das Bakterienpellet in 3ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert, in 1,5ml Eppendorfgefäße à 55µl aliquotiert und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Bakterien-Aliquots wurden bei -80°C gelagert und ein Effizienz- und Kontaminationstest mittels pUC19-Kontrollvektors am nächsten Tag durchgeführt.

Chemischkompetente E.coli

Die Herstellung der chemischkompetenten Bakterien erfolgt ähnlich der Herstellung von elektrokompenten Bakterien (s.o.). Dabei wurde 5ml der ü.N. Kultur in 500ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden wie oben zentrifugiert und das Pellet mit eiskaltem TFB 1 Puffer (30ml Puffer/100ml Bakterienkultur) resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend zentrifugiert (5min, 4000g, 4°C) und der ÜS verworfen. Das Pellet wurde in TFB 2 Puffer (4ml Puffer/100ml Bakterienkultur) resuspendiert, aliquotiert (200µl) und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Bakterien-Aliquots wurden bei -80°C gelagert und ein Effizienz- und Kontaminationstest mittels pUC19-Kontrollvektors am nächsten Tag durchgeführt.

2.2.6.7 Transformation

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in kompetente Bakterien chemisch oder mittels Elektroporation eingeschleust und dient zur Vervielfältigung dieser. Hierbei wurden für die Elektroporation elektrokompetente *E.colis* (s. 2.2.6.6) verwendet. Es wurden ca. 1-50ng Plasmid-DNA zu 55µl Bakterien gegeben. Nach Elektroporation in einer Küvette mit einem Elektrodenabstand von 2mm, wurden ca. 250-1000µl SOC-Medium auf die Bakterien gegeben und diese dann 1 h bei 37°C, 200rpm angeschüttelt (Innova 4200 Inkubator). Die Elektroporation erfolgte bei 2,5kV, 25µF und 200 Ohm. Daraufhin wurden die Bakteriensuspensionen auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

Bei der chemischen Transformation der Bakterien wurden die in Abschnitt 2.1.7 beschriebenen Bakterienstämme verwendet. Diese wurden mit 2,5µl DNA-Ansatz/50µl Bakterien versetzt und 30-40 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1,5 min. Die Bakterien wurden 5 min auf Eis inkubiert und mit 600µl SOC-Medium vermischt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37°C, 200rpm für 1 h. Die Bakteriensuspension wurde bei ca. 1100-1200g für 10 min pelletiert und ca. 400µl vom ÜS abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde im restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

2.2.6.8 DNA-Messung

Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers NanoDrop ND-1000 gemessen. Die Leereinstellung des Gerätes erfolgte mit *A.bidest.*, die photometrischen Messungen wurden automatisch bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm durchgeführt.

2.2.7 Zellkultur

2.2.7.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der verschiedenen eukaryotischen Zellen erfolgte in 75cm² oder 150cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit in ihren entsprechenden Medien (s. Tab. 7). Bei einer Konfluenz von ca. 80% (alle 48-72 h) wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (1%) gewaschen und anschließend trypsiniert (Trypsin). Nach Vereinzeln der Zellen wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und für weitere 48-72 h, bis zu einer Konfluenz von ca. 80% inkubiert. In der nachfolgenden Tabelle 18 sind alle eukaryotischen Zellen mit den entsprechenden Medien aufgeführt.

Tab. 18) Eukaryotische Zellen und ihr entsprechendes Medium

Eukaryotische Zellen	Medium	FKS	Antibiotikum
HEK 293T	DMEM*	ja	Pen/Strep
Cf2TH	DMEM*	ja	Pen/Strep
CrFK	DMEM*	ja	Pen/Strep
Huh7	DMEM*	ja	Pen/Strep
LNCaP	RPMI	ja	
DU 145	DMEM*	ja	Pen/Strep

* DMEM mit L-Glutamin

Für experimentelle Untersuchungen wurden die Konzentration der Zellen mittels Coulter-Counter Z2 oder Neubauer Zählkammer bestimmt und entsprechend der Wachstumsrate in 24, 6 Lochplatten oder Zellkulturflaschen überführt. Alle Arbeiten mit Zellen erfolgten unter einer Sterilbank (Heraeus, Hera safe).

2.2.7.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen wurden diese bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90% kultiviert, das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS (1%) gewaschen und trypsiniert. Die Zellen wurden in 4ml frisches Medium aufgenommen, in ein 50ml

Falcongefäß überführt und zentrifugiert (300g, 10 min). Das Pellet wurde in 1-2ml FKS + 10% DMSO resuspendiert und 1ml in je ein Cryo-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Cryo-Röhrchen in Zellstoff eingewickelt und 1 h bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden ü.N. bei -80°C gelagert und am nächsten Tag in Stickstofftanks überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C, die Zellen wurden mit 10ml PBS (1%) in ein 50ml Falcongefäß überführt und 8 min bei 77g und RTemp zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen, die Zellen in frisches Medium aufgenommen und in eine 75cm² Zellkulturflasche überführt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen, wie in Abschnitt 2.2.7.1 beschrieben.

2.2.7.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Coulter Counter Z2 oder einer Neubauer Zählkammer. Bei der Bestimmung der Zellen mittels Coulter Counter Z2 wurden die Zellen in einem 50ml Falcongefäß bei für 8 min bei 77g zentrifugiert und der ÜS verworfen. Die Zellen wurden mit frischem Medium resuspendiert und 10µl in einen Messbecher mit 10ml Isoton (Verdünnung 1:1000) gegeben. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben. Alternativ wurden die Zellen mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Zur Vitalfärbung wurden 50µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit einer 0,4%igen Tryptophanblaulösung versetzt. Es wurden 10µl der gefärbten Zellsuspensionslösung zwischen ein Deckgläschen auf eine Zählkammer gegeben und die Zellzahl auf allen vier Großquadraten ausgezählt und mittels folgender Formel die Konzentration der Zellen berechnet:

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

Die ausgezählten Zellen konnten für weitere Versuche in Lochplatten oder Zellkulturflaschen je nach gewünschter Konzentration ausgesät werden.

Die nachfolgende Tabelle 19 zeigt die jeweiligen Zellkonzentrationen in den verschiedenen Lochplatten bzw. Zellkulturflaschen bei Transfektion oder Infektion.

Tab. 19) Konzentration der Zellen bei Infektion oder Transfektion in verschiedenen Kultivierungsgefäßen

Kultivierungsgefäß	Zellkonzentration	Medium bei Infektion	Medium bei Transfektion
24 Lochplatte	2×10^4	300-500µl/Loch	300-500µl/Loch
6 Lochplatte	1×10^5	0,5-1ml/Loch	2ml/Loch
60cm ² Petrischale	1×10^6		9ml
75cm ² Zellkulturflasche	1×10^6		9ml
150cm ² Zellkulturflasche	$1,5-2,5 \times 10^6$ * $7,5 \times 10^6$		20ml

* bei Weiterbearbeitung der Zellen 48-72h später

Die optimale Konfluenz der Zellen lag bei einer Infektion zwischen 40 und 60% und bei einer Transfektion um die 70%.

2.2.7.4 Transfektion mittels Calciumphosphat

Die Transfektion von Zellen erfolgte mittels Calciumphosphat [197] und diente u.a. der Herstellung von großen Mengen an pseudotypisierten Viren. Hierbei wurde Plasmid-DNA in HEK 293T-Zellen mit Hilfe von Calciumphosphat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] transient transfiziert. Dabei bindet die DNA an ausfallendes Calciumphosphat, die dabei entstehenden Kristalle werden von den Zellen aufgenommen. In der nachfolgenden Tab. 20 stehen die Volumina von DNA, Calciumphosphat, HBS-Puffer, Medium und *A.bidest.* für unterschiedlich große Reaktionsansätze.

Tab. 20) Volumina eines Transfektionsansatzes in den jeweiligen Kultivierungsformaten

Kultivierungsgefäß	2xHBS [μ l]	DNA [μ g]	<i>ad A.bidest.</i> [μ l]	2,5M CaCl ₂ [μ l]	Medium [ml]
24 Lochplatte	16	0,76	14	1,6	0,3
6 Lochplatte	75	3-4	67	8	1,2
60cm ² Petrischale	500	25-30	450	50	8
150cm ² Zellkulturflasche	1250	60	1125	125	20

Zur Transfektion wurden die Expressionsplasmide mit *A.bidest.* auf ein bestimmtes Volumina gebracht, Calciumphosphat tropfenweise hinzugefügt, gemischt und tropfenweise auf 2xHBS pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei RTemp wurde der Transfektionsansatz auf die gewaschenen und mit frischem Medium versetzten Zellen getropft. Die Zellen wurden ü.N. bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert, das Medium am nächsten Tag gewechselt und die Zellen bis zur gewünschten Expressionsstärke kultiviert.

2.2.7.5 Herstellung pseudotypisierter HERV-K-Reporterviren

Für die Herstellung von pseudotypisierten HERV-K-Reporterviren wurden HEK 293T-Zellen mit einem Mix aus Plasmid-DNA von insgesamt 60 μ g transfiziert. Dieser Plasmid-Mix setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (s. Tab. 21). Da das aus HIV-1 stammende Env Δ KS nicht funktionsfähig ist, wurde mit diesem Hüllprotein pseudotypisierte CMVoriLuzi/EGFP Reporterkonstrukt als Negativkontrolle hergestellt.

Tab. 21) Plasmid-DNA Mix zur Herstellung pseudotypisierter HERV-Reporterviren

Plasmid-DNA	Konzentration [µg]	Plasmid-DNA	Konzentration [µg]	Plasmid-DNA	Konzentration [µg]
CMVoriLuzi	36	CMVoriLuzi	36	CMVoriE GFP	36
CMVorico GPP	10	CMVorico GPP	10	CMVorico GPP	10
orico Rec_V5	10	orico Rec_V5	10	orico Rec_V5	10
orico EnvΔC	2	orico EnvVSV	2	EnvVSV-G	2
pcDNA	2	pcDNA	2	pcDNA	2
	Σ60		Σ60		Σ60
Endprodukt:	mit EnvΔC pseudotypisierte CMVoriLuzi-Viren		mit EnvVSV pseudotypisierte CMVoriLuzi- Viren		mit EnvVSV pseudotypisierte CMVoriEGFP- Viren

Plasmid-DNA	Konzentration [µg]	Plasmid-DNA	Konzentration [µg]
CMVoriLuzi	36	CMVoriEGFP	36
CMVorico GPP	10	CMVorico GPP	10
orico Rec_V5	10	orico Rec_V5	10
HIV-1 EnvΔKS	2	HIV-1 EnvΔKS	2
pcDNA	2	pcDNA	2
	Σ60		Σ60
Endprodukt:	mit EnvΔKS pseudotypisierte CMVoriLuzi-Viren		mit EnvΔKS pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren

Das *Luziferase*- bzw. *EGFP*-Gen in den Reporter Viren wurde durch den Promotor EF-1 α angetrieben. Nach Transfektion von HEK 293T-Zellen mit dem oben stehenden DNA-Mix wurde wie in 2.2.7.4 beschrieben fortgefahren. Der ÜS wurde 96 h nach Transfektion abgenommen und mittels Ultrazentrifugation (s. 2.2.7.6)

aufgereinigt. Das Pellet wurde in 500µl frischem DMEM-Medium aufgenommen und bei -80°C gelagert. Für die Normalisierung mittels RT-Aktivitäts-Assays wurde ein 50µl Aliquot abgenommen.

2.2.7.6 Aufreinigung von Zellkulturüberständen mittels Ultrazentrifugation

Die Aufreinigung von Zellkulturüberständen erfolgte mittels Ultrazentrifugation. Dabei wurden ÜS von transfizierten Zellen in ein 50ml Falcongefäß überführt, zentrifugiert (1932g, 12 min, RTemp) und der ÜS über einen Filter (\varnothing 0,45µm) in ein 50ml Falcongefäß überführt. Anschließend wurde der ÜS auf eine 20%ige Succroslösung geschichtet und die Zentrifugenröhrchen in Zentrifugenbuckets gegeben. Die Viren wurden mittels Ultrazentrifugation bei 30000rpm, 4°C für ca. 3,5 h aufgereinigt. Der ÜS wurde verworfen und das Pellet in 100-500µl DMEM-Medium bzw. 100-500µl HEPES (0,05M) aufgenommen oder das Pellet in 3%ige Agarose (s. 2.2.3.2) eingeschlossen. Für die Normalisierung der Viren wurden ca. 50µl von den resuspendierten Pellets oder direkt vom ÜS der Zellen abgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C oder -80°C.

2.2.7.7 Infektion von Zellen

Verschiedene eukaryotische Zellen wurden mit pseudotypisierten Viren (s. 2.2.7.5) nach einem Infektionsschema infiziert (s. 3.2.4, Abb. 27). Die pseudotypisierten Viren wurden mittels RT-Aktivitäts-Assays (s. 2.2.8.5) normalisiert, um bei jeder Infektion dieselbe Viruskonzentration zu gewährleisten. Dabei wurde max. 2/3 des normalisierten Virusüberstandes und mindestens 1/3 frisches Medium auf die Zellen gegeben. In einem Infektionsversuch wurden verschiedene Zellen nur mit pseudotypisierten CMVoriLuzi-Viren infiziert oder im Verhältnis von 1:10 oder 1:100 mit pseudotypisierten CMVoriEGFP-Viren co-infiziert. Bei der Untersuchung des

Einfluss von TRIM5 α (s. 3.2.5, Abb. 31) bzw. den akzessorischen Proteine Bet, Vif und Vpx auf die Inhibition von HERV-K113, wurden die Zellen ca. 16 h vor Infektion mit TRIM5 α , Bet, Vif oder Vpx transfiziert. Das Medium wurde ca. 4 h vor Infektion gewechselt. Zur Erhöhung der Adsorption von Viruspartikeln an der Zelloberfläche wurde 8 μ g/ml Polybrene[®] pro Loch dazugegeben [198]. Alle Infektionsversuche wurden in 24 Lochplatten durchgeführt, es wurde ca. 4-5 h nach Infektion 0,5ml frisches Medium in jedes Loch gegeben und die Zellen nach ca. 48 h lysiert. Bis zur Messung der Luziferase-Aktivität (s. 2.2.8.4) am Luminometer wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.8 Protein-Analytik

2.2.8.1 Zelllyse/Proteinextraktion

Zellen, welche nach der Transfektion oder Infektion lysiert werden sollten, wurden mit PBS (1%) gewaschen und mit einem Zelllysepuffer und Protease-Inhibitor lysiert. Hierbei wurde die Zellen einer 150cm² Zellkulturflaschen in ca. 200 μ l Lysispuffer/Protease-Inhibitor und Zellen einer 24 Lochplatte in ca. 50 μ l Lysispuffer/Loch aufgenommen. Die Proteine und restlichen Zellbestände wurden zentrifugiert (5 min, 4°C, 15700g) und der ÜS in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung für weitere Experimente erfolgte bei -20°C.

2.2.8.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine SDS-PAGE [199] ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Es besteht aus einem 5%igen Sammelgel und ein verschieden prozentiges Trenngel (s. Tab. 22), dessen Konzentration von der Größe der zu detektierenden Proteine abhängig ist. Hierbei werden große Proteine in der Regel in einem niedrigprozentigen Trenngel und kleine Proteine in einem hochprozentigen Trenngel

aufgetrennt. Eine Vernetzung von Acrylamid-Monomeren wurde durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) bewirkt. Alle Proteinproben wurden mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt, welcher β -Mercaptoethanol enthält und damit die Disulfidbrücken zwischen den Proteinen reduzieren soll. Anschließend wurden die Proteine bei 95°C für 10 min denaturiert und auf Gele mit einer Dicke von 1,0 oder 1,5mm aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte mit einer Spannung von 80-100V und konnte nach Einlaufen der Proben ins Sammelgel auf 120-180V erhöht werden. Es wurde ein PAGERuler™ Prestained Protein Ladder als Größenstandard verwendet.

Tab. 22) Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel

Komponenten	Sammelgel (2x)	Trenngel (1x)	
	5%	10%	12%
<i>A.bidest.</i>	5,7ml	4,1ml	3,4ml
Acryamid 30%	1,7ml	3,3ml	4,0ml
1,5M Tris pH 8,8	-	2,5ml	2,5ml
0,5M Tris pH 6,8	2,5ml	-	-
SDS 10%	100 μ l	100 μ l	100 μ l
APS 10%	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMES	10 μ l	10 μ l	10 μ l

2.2.8.3 Western Blot

Bei den Western Blots wurden Proteine mittels SDS-PAGE elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine proteinbindende Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran übertragen, so dass die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert und quantifiziert werden konnten. Nach Auftrennung der Proteine über ein SDS-Gel wurde das Gel in Transferpuffer 10 min inkubiert und auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (Porengröße 0,45 μ m) gebracht. Die PVDF-Membran wurde zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren in eine Blotting-Apparatur eingelegt und die Proteine, bei einer Spannung von 20V für 40 min, vom

SDS-Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Unspezifische Bindungen von Antikörpern sollten durch Inkubation (1 h, RTemp) der PVDF-Membran in Blockingpuffer vermieden werden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Ak) für 1 h bei RTemp oder ü.N. bei 4°C. Die Membran wurde 3x mit PBS/Tween 0,1% für 10 min gewaschen und mit einem sekundären Ak für 1 h bei RTemp inkubiert. Danach wurde die Membran 3x mit PBS/Tween 0,1% für 10 min gewaschen und die Proteine mittels Meerrettich-Peroxydase gekoppeltem Ak und anschließender Chemilumineszenz-Reaktion (ECL) detektiert. Die Ak-gekoppelten Proteine wurden mittels Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen.

2.2.8.4 Luziferase-Assay

Die Luziferase-Aktivität wurde mittels Luminometer quantitativ bestimmt. Hierbei dient ein Biolumineszenz hervorrufendes Gen als Reporter. Dieses Gen namens *firefly-Luziferase* stammt aus dem Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) und verhilft dem Käfer zur Lichterzeugung. Für die Messung der Luziferase-Aktivität wurden pseudotypisierte Reporter Viren hergestellt, welche das *Luziferase*-Gen exprimieren (s. 2.2.7.5). Die Menge an firefly-Luziferase im Zellysat ist proportional zur gemessenen Lichtemission, sodass damit direkt auf die Menge bzw. die Infektionsrate an Luziferase-Viren in den Zellen geschlussfolgert werden kann. Die Präparation der Luziferase-Viren-Lysate erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde in eine 96 Lochplatte das infizierte Zellysat gegeben und mit 50µl Luziferase-Assay-Reagenz/Loch komplementiert. Der Mittelwert der Luziferase-Aktivität wurde durch sechs identische Infektionsansätze bestimmt (n=6). Der Versuchsansatz wurde zwei- bis dreimal wiederholt und ein repräsentativer Datensatz für die Abbildungen im Ergebnissteil ausgewählt.

2.2.8.5 Quantifizierung von Virusüberständen mittels RT-Aktivitäts-Assay

Die Quantifizierung der Virusüberstände erfolgte mittels HS-Mg RT-Aktivitäts-Assay (Cavidi). Dieser Assay ermöglicht sensitiv kleinste Mengen an HERV-K-Reporterviren mit Hilfe der RT zu detektieren. Hierfür wurden jeweils 10µl der in 2.2.7.6 abgenommenen Virusüberstände auf je zwei 96 Lochplatten (Cavidi) verteilt. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll B des Herstellers und die Auswertung wurde mittels ELISA Readers (Wellenlänge 405nm) durchgeführt.

2.2.9 Statistische Berechnungen

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism erstellt. Die p-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests generiert. Ein Stern steht für einen p-Wert $\leq 0,05$, zwei Sterne stehen für einen p-Wert $\leq 0,01$, drei Sterne stehen für einen p-Wert $\leq 0,001$ und ein „ns“ steht für „nicht signifikant“.

3 Ergebnisse

3.1 TEM-TERS-Korrelation

3.1.1 Evaluation von gängigen EM-Materialien und Chemikalien für korrelative Raman-Spektroskopie und Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Die für die Präparation in der EM gängigen Chemikalien und Materialien wurden auf ihre Verwendung und Eigenschaften für die Kopplungsversuchen zwischen TEM und TERS überprüft [200]. Zu diesen Chemikalien und Materialien zählen unter anderem Pioloform-befilmte aus Kupfer bestehende Grids, Schwermetalle wie z.B. Uranylacetat (UA) oder Phosphorwolframsäure (PTA), welche für die Kontrastierung der Proben essentiell sind, sowie das gängige Paraformaldehyd (PFA) für die Fixierung von Pathogenen in der Probe. Hierbei war es essentiell, dass die, für die Präparation der Proben, verwendeten Materialien und Chemikalien keine oder nur sehr geringe Raman-Signale in den biologisch relevanten Bereichen zeigten. Diese biologisch relevanten Bereiche umfassen in der Regel die Wellenzahlen $400-1700\text{cm}^{-1}$ und $2500-3000\text{cm}^{-1}$. Es zeigte sich, dass sowohl PFA als auch UA für die weiteren Versuche ungeeignet waren, da diese Materialien intensive Raman-Signale im diagnostischen Spektralbereich erzeugten [200]. Beim Vergleich der verschiedenen Kontrastmittel stellte sich heraus, dass PTA am geeignetsten für die weiteren Versuche war. Des Weiteren wurden die Substanzen Alcianblau und Pioloform untersucht. Alcianblau, welches für die chemische Hydrophilisierung von Grids verwendet wird, wies eine starke Eigenfluoreszenz in der Raman-Spektroskopie auf, so dass von einer Verwendung abgesehen werden musste. Bei den Raman-Untersuchungen von Pioloform, mit einer geringen Laserleistung ($< 1\text{mW}$), traten keine intensiven Banden im relevanten Spektralbereich auf. Jedoch erfordert die Justageprozedur, zur Bestimmung der optimalen Position einer TERS-

Spitze im fokussierten Laserstrahl, eine höhere Laserleistung, so dass die Hitzestabilität der Filme bei korrelativen TEM-TERS-Untersuchungen ebenfalls berücksichtigt werden musste. Aufgrund der geringen thermischen Stabilität des Pioloform-Films konnte diese Substanz keine Verwendung für die Kopplungsversuche finden.

3.1.2 Silizium-basierte Grids (Si-Grids)

Auf der Suche nach einer geeigneten Alternative für die gängigen Pioloform-befilmten und Kohle-bedampften Kupfergrids (Pioloform-Grids), wurden verschiedene auf Silizium-basierende Grids (Si-Grids) getestet. Da Silizium eine hohe thermische Stabilität, eine gute Wärmeleitung sowie eine geringe Oberflächenrauigkeit besitzt, wurden die Si-Grids für die Kopplungsversuchen zwischen TEM und TERS verwendet. Im Folgenden sollte eine Analyse von drei verschiedenen Si-Grids zeigen, ob diese sich für die weiteren Versuche im TEM eignen (s. Abb. 15).

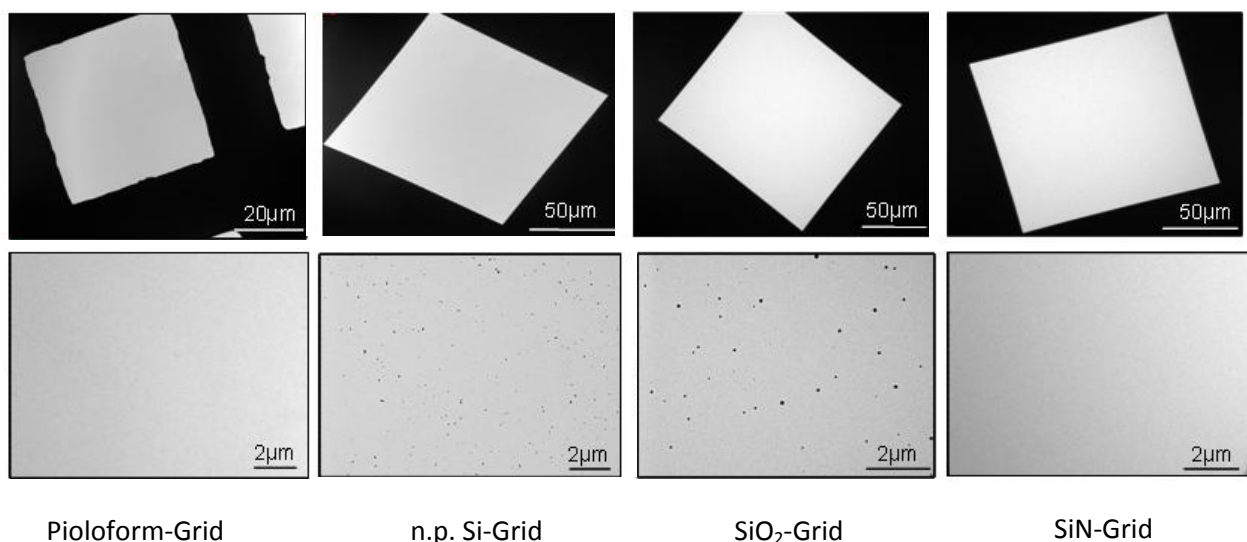


Abb. 15) TEM-Aufnahmen der verschiedenen befilmten Si-Grids und des Pioloform-Grids

TEM-Aufnahmen von den Filmen der unbehandelten Grids als Übersichtsaufnahme eines Mesh und als Detailansicht.

Die Filme, der drei getesteten Si-Grids, bestehen aus nicht porösem Silizium (n. p. Si-Grid), aus Siliziumdioxid (SiO₂-Grid) oder aus Siliziumnitrid (SiN-Grid). Alle Si-Grids wurden mittels TEM im Hinblick auf Elektronentransparenz und störende Verunreinigungen untersucht (s. Abb. 15). Als Vergleichskontrolle wurden die gängigen Pioloform-Grids verwendet. Zunächst wurden Übersichtsaufnahmen eines Mesh sowie Detailansichten von den Filmen der Grids im TEM aufgenommen. Die Pioloform-Grids zeigten eine gute Elektronentransparenz und keine störenden Verunreinigungen bzw. Defekte auf den Filmen. Dies konnte ebenfalls für die SiN-Grids beobachtet werden. Für die n. p. Si-Grids und für die SiO₂-Grids konnte ebenfalls eine gute Elektronentransparenz gezeigt werden, jedoch wiesen diese Grids kleine Verunreinigungen des Films auf, wodurch eine Detektion von möglichen Erregern in der Diagnostik erschwert werden würde. Alle Si-Grids wurden mittels Raman-Spektroskopie untersucht und zeigten keine Signale in den relevanten biologischen Bereichen [200].

Aufgrund der sehr guten Eigenschaften aller Si-Grids in der Raman-Spektroskopie, wurden unter Berücksichtigung der Anforderungen für korrelative TEM-TERS-Untersuchungen, die SiN-Grids für die Verwendung in den Kopplungsversuchen zwischen TEM und TERS gewählt.

3.1.3 Vergleich der Adhäsionseigenschaften von Partikeln auf Pioloform- und Si-Grids

Nach dieser ersten Vorauswahl wurden alle Si-Grids, auf ihre Adhäsionseigenschaften getestet.

Hierfür wurden Si-Grids und Pioloform-Grids mit einer Lösung aus Polystyrolbeads (Beads) oder Ektromelie-Viren (ECTV), nach dem Standardprotokoll für die Negativ-Kontrastierung (s. 2.2.3.1), präpariert. Für den Vergleich der Adhäsionseigenschaften

von Si-Grids wurden zusätzlich die in der EM gängigen Pioloform-Grids mitgeführt, welche, vor der Präparation mit ECTVs oder Beads, mit Alcianblau chemisch hydrophilisiert wurden. Es wurden alle Partikel aus 22 Meshes (Pioloform-Grids) bzw. 9 Meshes (Si-Grids) pro Grid von insgesamt vier bis acht Grids gezählt. Die ausgezählten Partikel pro $46.552\mu\text{m}^2$ Fläche wurden anschließend rechnerisch bestimmt. In Abbildung 16 sind die rechnerisch bestimmten Mittelwerte der Partikel pro $46.552\mu\text{m}^2$ Fläche und Grid dargestellt.

Als Referenz konnten im Mittel ca. 180 Beads (definiert als 100%), für Pioloform-Grids, detektiert werden. Für SiN-Grids konnten ca. 240 Beads gezählt werden, was einem Prozentwert von ca. 131% entspricht. Für die beiden anderen Si-Grids konnten kaum Beads (< 1%) detektiert werden.

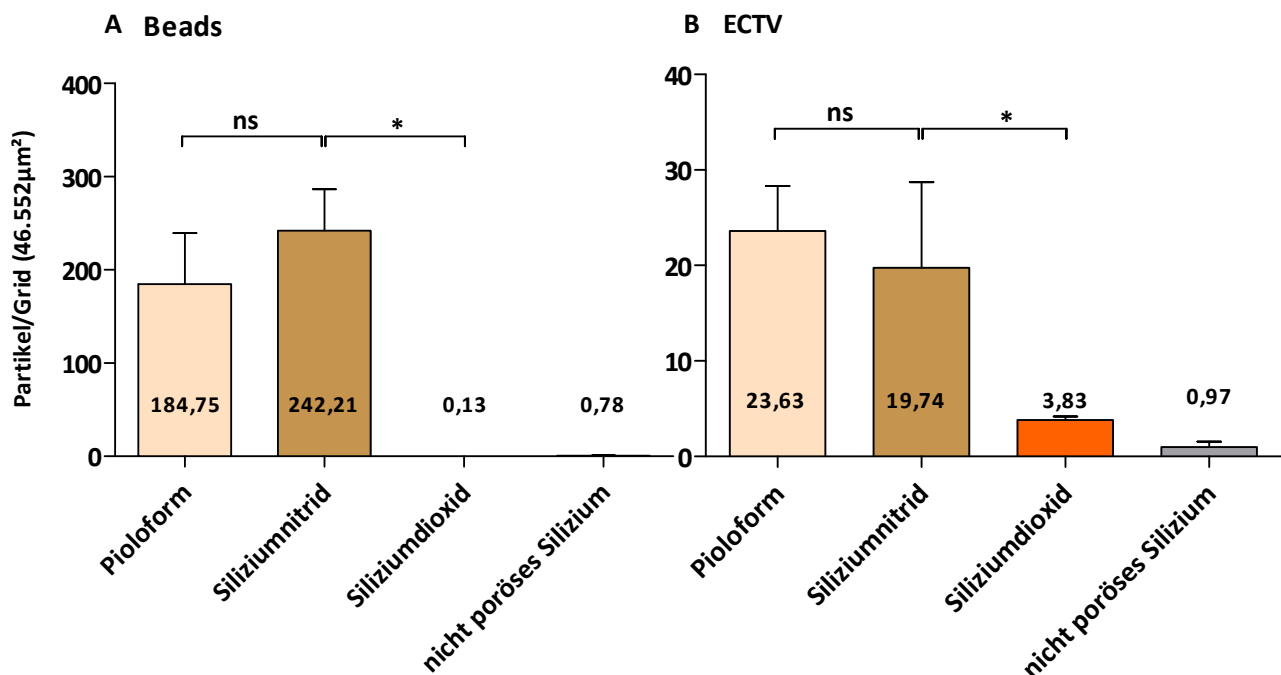


Abb. 16) Bead- und ECTV-Auszählung auf Pioloform-Grids und Si-Grids

(A) Auswertung der Bead-Auszählung auf Pioloform-Grids und auf Si-Grids. (B) Auswertung der ECTV-Auszählung auf Pioloform-Grid und auf Si-Grids.

Alle Grids wurden 10 min mit einer Beadlösung (1×10^8) bzw. ECTV-Lösung (1×10^6 PFU/ml) und nach der Tropfen-auf-Grid-Methode präpariert. Anschließend wurden die Grids 4x mit *A. bidest.* gewaschen und mit PTA (0,5%) kontrastiert. Pioloform-Grids wurden vor Probenpräparation 10 min mit Alcianblau (1%) hydrophilisiert. Alle Grids wurden mittels TEM ausgezählt.

n=4 pro Gridtyp, p-Wert $\leq 0,05$, „ns“ steht für „nicht signifikant“

Bei der Auszählung von ECTVs auf den SiN-Grids konnten ca. 84% ECTVs pro Grid, im Vergleich zu den Pioloform-Grids (definiert als 100%), detektiert werden. Die SiO₂-Grids zeigten, mit ca. 16% ECTVs pro Grid, geringe adhäsive Eigenschaften auf. Mit ca. 4% ECTVs pro Grid zeigten die n. p. Si-Grids die geringsten adhäsiven Eigenschaften. Zusammenfassend zeigte sich bei diesem Experiment, dass SiN-Grids von allen Si-Grids sich am besten, für die Kopplungsversuche zwischen TEM und TERS, eigneten.

Um die Adhäsionseigenschaften der SiN-Grids noch zu steigern, wurden im Weiteren Optimierungsexperimente durchgeführt.

3.1.4 Steigerung der Adhäsionseigenschaften von SiN-Grids durch Beglimmung

3.1.4.1 Evaluationen von geeigneter Beglimmungsdauer und Stromstärke für die Beglimmung der SiN-Grids

Die Methode der chemischen Hydrophilisierung mittels Alcianblau konnte, aufgrund der intensiven Banden von Alcianblau in der Raman-Spektroskopie, nicht bei den SiN-Grids angewandt werden. Aus diesem Grund wurde, für die Hydrophilisierung der Grids, die Methode der Beglimmung angewandt. Hierbei werden Elektronen von einer Kathode aus in Richtung des elektrischen Feldes zur Anode durch den dazwischenliegenden evakuierten Raum hin beschleunigt. Die Elektronen treffen auf die Grids, welche dadurch negativ polarisiert und somit elektrisch hydrophilisiert werden (s. 2.2.3.1, Abb. 13).

Zur elektrischen Hydrophilisierung von Pioloform-Grids mittels Beglimmung werden in der EM-Diagnostik in der Regel eine Dauer von 2 min und eine Stromstärke von 25mA verwendet [4]. Es zeigte sich bei dem Experiment, bezüglich der verschiedenen Variationen von Dauer und Stromstärke, dass die geeignetste

Hydrophilisierung für Pioloform-Grids mit 2 min 25mA erreicht wurde (s. Abb. 17). Die Pioloform-Grids zeigten bei 2 min 25mA die höchste Adhäsionsfähigkeit, von ca. 46 Partikeln/Grid. Die SiN-Grids hingegen, wiesen die höchste Adhäsionsfähigkeit, von ca. 55 Partikeln/Grid, bei 4 min 25mA bzw. bei 2 min 35mA, mit ca. 50 Partikel/Grid, auf. Mit einer ähnlichen Anzahl an Partikeln pro ausgezählte Fläche zeigten die SiN-Grids vergleichbare hydrophile Eigenschaften wie die Pioloform-Grids bei 2 min 25mA. Eine Änderung der Stromstärke auf 10 oder 35mA bzw. eine Änderung der Beglimmungsdauer auf 1, 3 oder 4 min verschlechterten die adhäsiven Eigenschaften der Pioloform-Grids.

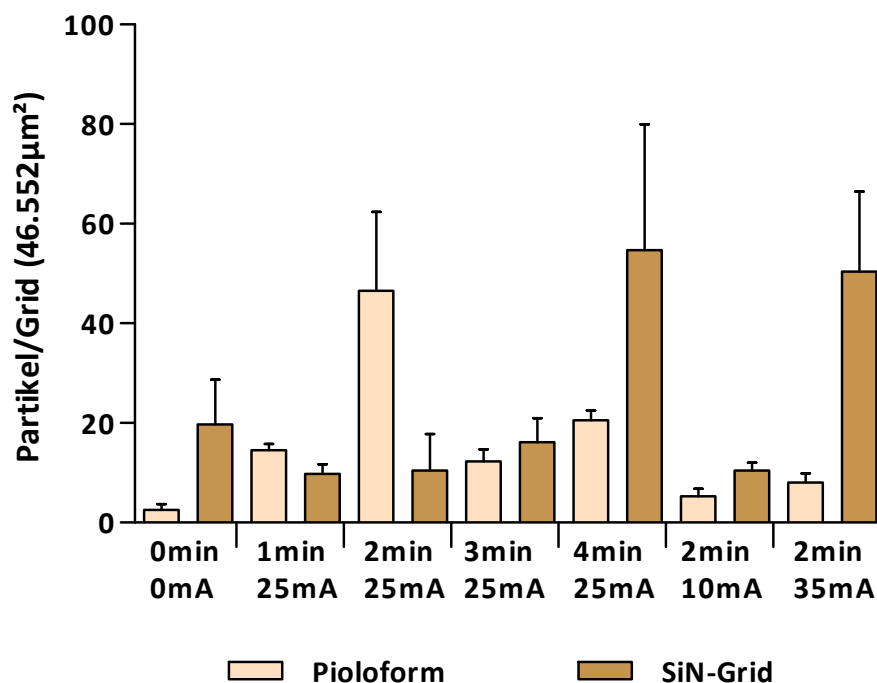


Abb. 17) ECTV-Auszählung auf Pioloform-Grids und SiN-Grids nach Hydrophilisierung durch Beglimmung

Auswertung der ECTV-Auszählung auf Pioloform-Grids und auf SiN-Grids nach Beglimmung mit unterschiedlicher Stromstärke (0-35mA) oder unterschiedlicher Beglimmungsdauer (0-4 min).

Die Grids wurden vor Präparation mittels Beglimmung hydrophilisiert. Nach 24 h wurden die Grids 10 min mit einer ECTV-Lösung (1×10^6 PFU/ml) und nach der Tropfen-auf-Grid-Methode präpariert. Anschließend wurden die Grids 4x mit *A.bidest.* gewaschen und mit PTA (0,5%) kontrastiert. Alle Grids wurden mittels TEM ausgezählt, n=8 Grids pro Beglimmung, alle Werte wurden auf Signifikanz untersucht und als nicht signifikant (ns) bewertet

Zusammenfassend konnte die Adhäsivität der SiN-Grids auf das 2,8-fache gesteigert werden, wenn die Grids elektrisch hydrophilisiert wurden. Aufgrund der hohen Schwankungen der Partikeladhäsion auf den SiN-Grids folgten weitere Optimierungsexperimente bezüglich der Adhäsivität. Einerseits sollte das Ziel sein, dass möglichst viel Partikel auf den Grids adhäreren, andererseits sollten die Schwankungen der Partikeladhäsion auf den SiN-Grids verringert und damit die Verteilung der Partikel auf den Grids homogenisiert werden.

3.1.4.2 Homogenisierung der Partikeladhäsion auf SiN-Grids

Im vorangegangenen Experiment (s. 3.1.4.1) konnte eine geeignete Hydrophilisierung der SiN-Grids mit einer Stromstärke von 35mA für 2 min oder mit einer Beglimmungsdauer von 4 min bei 25mA erreicht werden. Mit dem folgenden Experiment sollte eine höhere Adhäsion von Partikeln bzw. eine homogenere Verteilung der Partikel, auf den Grids, erzielt werden.

Hierfür wurden die geeignetsten Einstellungen (s. 3.1.4.1, Abb. 17) von Stromstärke und Beglimmungsdauer kombiniert, sowie der Abstand zwischen den SiN-Grids und der Kathode verringert. Mit Verringerung der Strecke, kollidieren die Elektronen mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit miteinander und sollten sich besser auf den Grids verteilen.

Die Abb. 18 zeigt, dass eine Beglimmung der SiN-Grids bei 4 min 35mA, mit ca. 53 Partikel/Grid, eine ähnliche Adsorption aufweist, wie eine Beglimmung bei 4 min 25mA, mit ca. 55 Partikeln/Grid. Der einzige Unterschied zwischen den Grids zeigte sich bei der Partikelverteilung. SiN-Grids, welche mit 4 min 35mA hydrophilisiert wurden, zeigten eine homogenere Verteilung der Partikel auf den Grids. Bei einer Umkehrung der Polarität, das heißt bei positiver Beglimmung, wurden die adhäsiven Eigenschaften der SiN-Grids auf ca. 10% reduziert. Bei negativer Beglimmung (der gängigen Polarität bei Beglimmung) mit 4 min 35mA und einem

reduzierten Abstand der SiN-Grids zur Kathode konnte eine deutliche Steigerung auf ca. 67 Partikeln/Grid erzielt werden. Diese so behandelten Grids wiesen zusätzlich eine homogene Partikel-Verteilung auf den Grids auf.

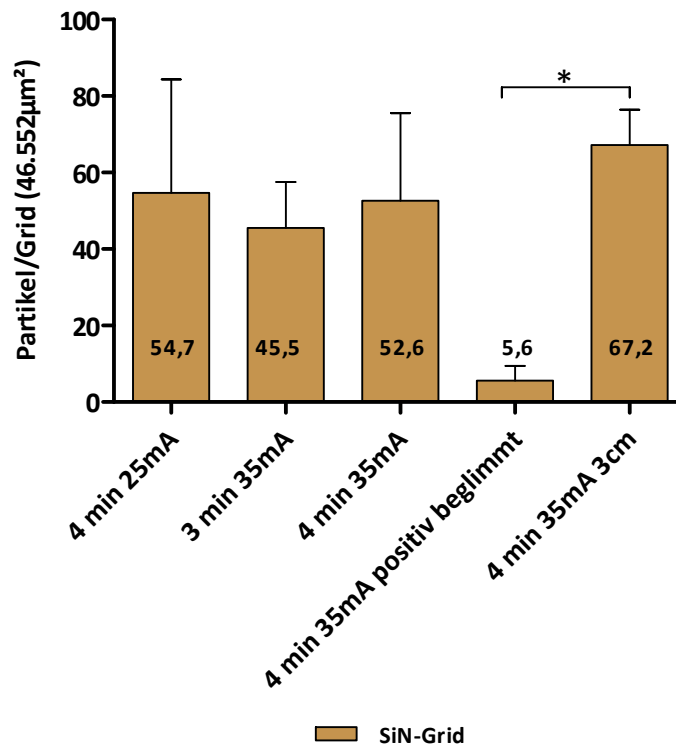


Abb. 18) ECTV-Auszählung auf den SiN-Grids nach Beglimmung

Auswertung der ECTV-Auszählung auf SiN-Grids nach Beglimmung mit unterschiedlicher Stromstärke, unterschiedlicher Beglimmungsdauer, Umkehrung der Polarität oder Verringerung des Abstandes der Grids zur Kathode.

SiN-Grids wurden vor Präparation mittels Beglimmung hydrophilisiert. Nach 24 h wurden SiN-Grids 10 min mit einer ECTV-Lösung (1×10^6 PFU/ml) und nach der Tropfen-auf-Grid-Methode präpariert. Anschließend wurden die Grids 4x mit *A.bidest.* gewaschen und mit PTA (0,5%) kontrastiert. Alle SiN-Grids wurden mittels TEM ausgezählt, n=8 Grids pro Beglimmung, alle Werte wurden auf Signifikanz untersucht und alle ohne Stern als ns bewertet, * = p-Wert \leq 0,05

Zusammenfassend konnte eine Optimierung der SiN-Grids mittels Beglimmung erzielt werden. Dabei erreichten die SiN-Grids, welche mit einer Beglimmungsdauer von 4 min, einer Stromstärke von 35mA, sowie einem reduziertem Abstand zur Kathode (auf ca. 3cm) und negativ beglimmt wurden, eine um ca. 23%ige höhere Adhäsivität, als die SiN-Grids, welche mit 4 min 25mA und gängigen Abstand beglimmt wurden. Im Vergleich zu den Pioloform-Grids, welche ihre optimale

Hydrophilisierung bei 2 min 25mA, mit ca. 47 Partikeln/Grid, erreichen, zeigten die SiN-Grids eine um das 1,45-fache höhere Adhäsivität.

3.1.4.3 Einfluss von unterschiedlichen Waschsritten auf die Partikeladhäsion der SiN-Grids

Wie durch Laue *et al.* [4] gezeigt werden konnte, erfolgt bei einer Reduzierung von Waschsritten, eine höhere Partikeladsorption an Pioloform-Grids. Weiterhin konnten Laue *et al.* [4] zeigen, dass eine Reduzierung von Waschsritten den Verunreinigungsgrad der Oberfläche der Grids erhöht und damit eine Auszählung der Partikel erschwert. Für die SiN-Grids sollte ebenfalls untersucht werden, ob eine Reduzierung von Waschsritten, Einfluss auf die adhärirten Partikel auf den SiN-Grids hat (s. Abb. 19).

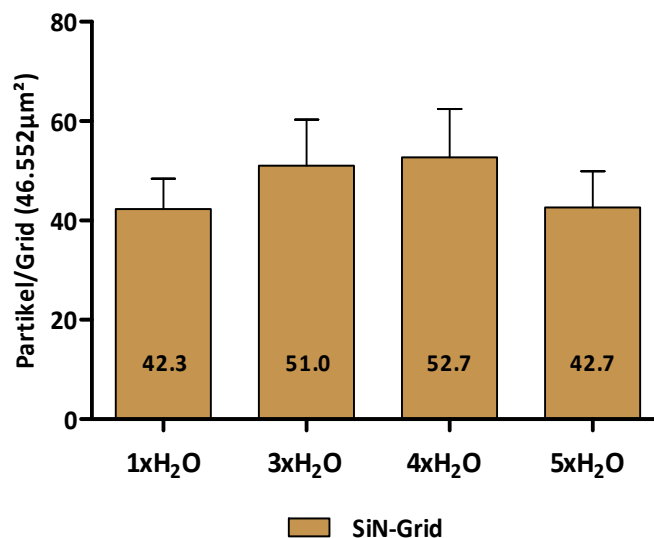


Abb. 19) ECTV-Auszählung auf den SiN-Grids mit unterschiedlichen Waschsritten

Auswertung von ECTV-Auszählung auf SiN-Grids nach Hydrophilisierung durch Beglimmung: 4 min 35mA 3cm.

Nach 24 h wurden SiN-Grids 10 min mit einer ECTV-Lösung (1×10^6 PFU/ml) und nach der Tropfen-auf-Grid-Methode präpariert. Anschließend wurden die Grids 1-5x mit *A.bidest.* gewaschen und mit PTA (0,5%) kontrastiert. Alle Grids wurden mittels TEM ausgezählt, n=8 Grids pro verschiedenen Waschschrift, alle Werte wurden auf Signifikanz untersucht und als ns bewertet

Bei der Auszählung der Partikel auf den unterschiedlich gewaschenen SiN-Grids konnte, im Rahmen der Messgenauigkeit, kein wesentlicher Unterschied der Partikeladhäsion festgestellt werden. Die SiN-Grids zeigten bei einem einzelnen Waschschrift, mit ca. 42 Partikeln/Grid, eine vergleichbar hohe Partikelanzahl in Relation zu den Grids, welche 5x mit *A.bidest.* gewaschen wurden. Die einzigen beobachteten Unterschiede bestanden im Verunreinigungsgrad der SiN-Grids. Nach einmaligem Waschen zeigten sich deutliche Verunreinigungen und Ablagerungen auf den Filmen, im Gegensatz zu den Grids, welche fünfmal gewaschen wurden.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an ECTVs, welche auf die SiN-Grids adhärten, auch nach mehrmaligem Waschen, nicht signifikant reduziert werden und sich daher für die EM-Diagnostik sehr gut eignen. Weiterhin konnten die Verunreinigungen durch mehrmaliges Waschen der SiN-Grids deutlich reduziert werden, ohne das ein wesentlicher Verlust der Partikel auf den Grids in Kauf genommen werden muss.

3.1.4.4 Einfluss von unterschiedlichen Inkubationszeiten der Präparation auf die Partikeladhäsion von SiN-Grids

Ein weiteres Experiment sollte den Einfluss der Inkubationsdauer bei der Präparation auf die Adsorptionsfähigkeit der SiN-Grids zeigen (s. Abb. 20). Eine geringe Inkubationsdauer ist essentiell für eine schnelle EM-Diagnostik. Diese muss jedoch so gewählt werden, dass in dieser Zeit eine möglichst hohe Anzahl von Partikeln auf den Grids adhären kann.

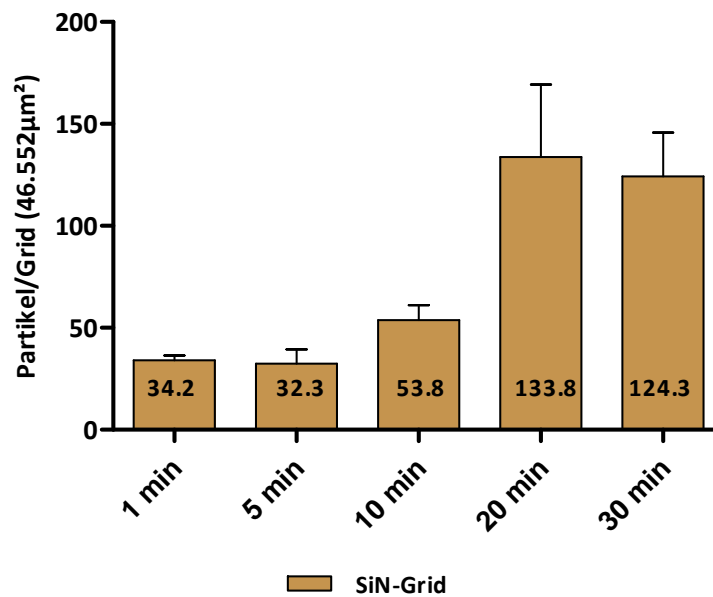


Abb. 20) ECTV-Auszählung auf den SiN-Grids nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei der Präparation

Auswertung der ECTV-Auszählung auf den SiN-Grids nach Hydrophilisierung der Grids mittels Beglimmung: 4 min 35mA 3cm.

Nach 24 h wurden die Grids 1, 5, 10, 20 oder 30 min mit einer ECTV-Lösung (1×10^6 PFU/ml) und nach der Tropfen-auf-Grid-Methode präpariert. Anschließend wurden die Grids 4x mit *A.bidest.* gewaschen und mit PTA (0,5%) kontrastiert. Alle Grids wurden mittels TEM ausgezählt, n=8 Grids pro Inkubation, alle Werte wurden auf Signifikanz untersucht und als ns bewertet

Nach einer Minute konnten ca. 34 Partikel pro ausgezählte Fläche auf den SiN-Grids adhären. Dies konnte um den Faktor zwei auf ca. 54 Partikel/Grid gesteigert werden, wenn die SiN-Grids 10 min lang, mit einer ECTV-Lösung, inkubiert wurden. Eine weitere Steigerung der Partikelanzahl um den Faktor zwei, auf ca. 134 Partikel/Grid, konnte erzielt werden, indem die Inkubationszeit auf 20 min verlängert wurde. Bei einer weiteren Verlängerung der Inkubationszeit auf 30 min konnte, im Rahmen der Messgenauigkeit, keine weitere Steigerung beobachtet werden.

Zusammenfassend stellen die SiN-Grids eine sehr gute Alternative für Pioloform-Grids dar. Die SiN-Grids erfüllten alle Kriterien für die Verwendung in den

Kopplungsversuchen zwischen TEM und TERS. Diese Grids zeigten keine relevanten Raman-Signale in den biologischen Bereichen, keine Verunreinigungen auf der Oberfläche und verfügten zudem über die erforderliche Elektronentransparenz für TEM-Untersuchungen. Die SiN-Grids konnten durch Beglimmung hydrophilisiert werden und wiesen hohe adhäsive Eigenschaften auf. Des Weiteren führte eine Erhöhung der Anzahl an Waschsritten, nicht zu einer signifikanten Verringerung der Adhäsivität der SiN-Grids. Durch die Erhöhung der Inkubationsdauer bei der Präparation der SiN-Grids konnte eine Steigung um den Faktor zwei erzielt werden. Abschließend konnten mit der so optimierten Probenpräparation für die SiN-Grids erste Versuche zur Kopplung von TEM mit TERS durchgeführt werden.

3.1.5 Erste Kopplungsversuche: TEM mit TERS

Die ersten Versuche, Viruspartikel mittels TERS zu detektieren und zu messen, zeigten Cialla *et al.* [31] und Hermann *et al.* [29] in ihren Publikationen. Die Daten demonstrierten erstmalig, dass TERS-Spektren von Tabak-Mosaik-Viren (TMV, [31]), aviären Orthopoxviren (APV), sowie Adeno-assoziierten Viren (AAV, [29]) aufgenommen werden können. Damit zeigten sie erfolgreich, dass TERS-Spektren von biologischen Nanostrukturen, wie einzelnen Viruspartikeln, aufgenommen werden können. Mit Hilfe dieser Vorversuche und der Optimierung der SiN-Grids, sollten erste Versuche zur Kopplung zwischen TEM und TERS erfolgen.

Hierfür wurde ein SiN-Grids mit einer Pocken-Lösung präpariert, gewaschen und mit PTA negativ-kontrastiert. Anschließend wurden die Partikel mit Hilfe des TEMs detektiert (s. Abb. 21a) und im AFM re-lokalisiert (s. Abb. 21b). Nach erfolgreicher Voruntersuchung, wurden die Phase (s. Abb. 21b) und die Topographie (s. Abb. 21c) der Pocken mittels AFM aufgenommen. Abschließend konnten Spektren von Pocken-Partikeln und PTA auf dem SiN-Grid mittels TERS erstellt werden (s. Abb. 21d).

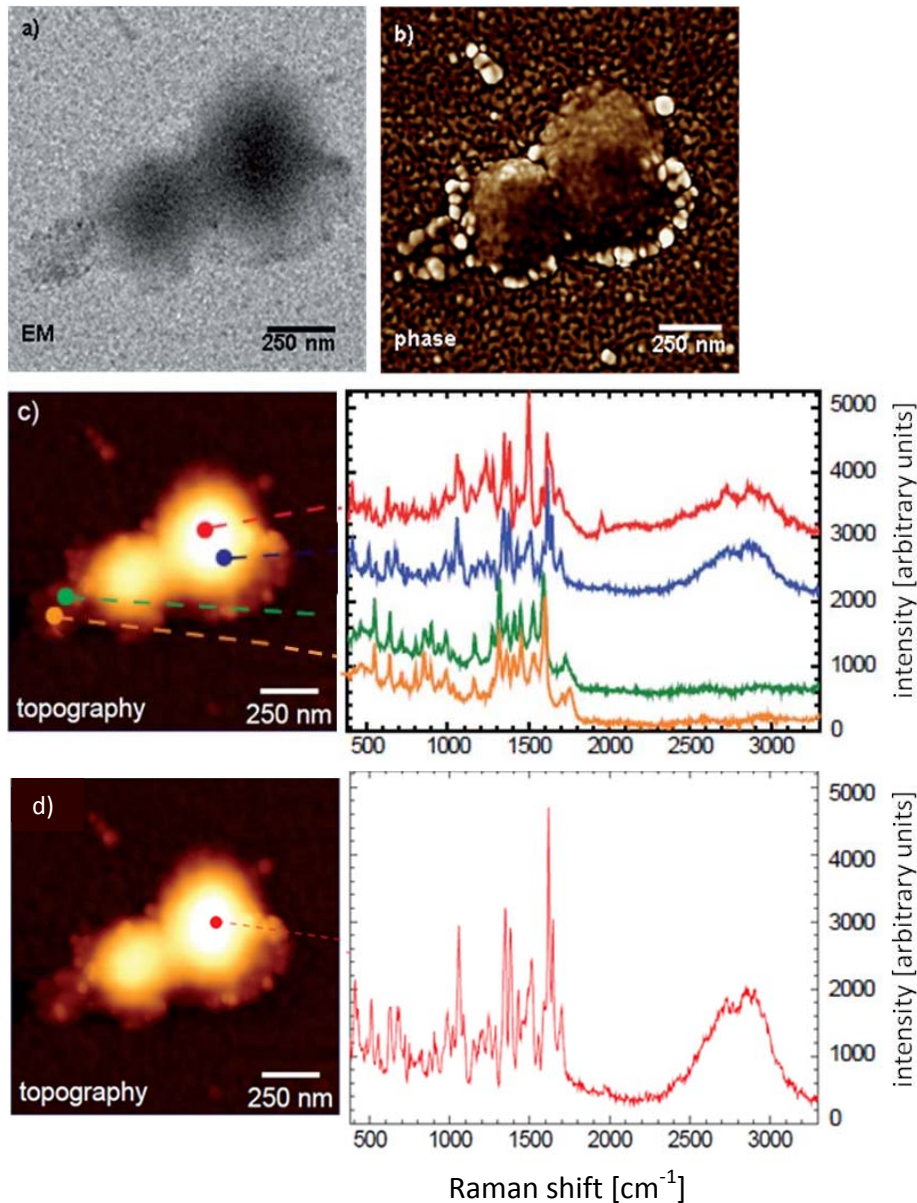


Abb. 21) Pocken-Partikel mittels TEM detektiert, re-lokalisiert im AFM und mittels TERS spezifiziert
a) TEM-Aufnahme von Pockenpartikeln, **b)** Phase von Pocken-Partikeln im AFM, **c)** Topographie von PTA-kontrastierten Pocken-Partikeln im AFM, sowie das dazugehörige TERS-Spektrum von Pocken (rotes und blaues Spektrum) und PTA-Substrat (grünes und oranges Spektrum), **d)** AFM-Aufnahme einer Pocke und ihres TERS-Spektrum (rotes Spektrum; Abbildung b-d wurden freundlicherweise vom Kooperationspartner zu Verfügung gestellt)

In Abb. 21a konnten PTA-kontrastierte Pockenpartikel im EM detektiert werden. Anschließend konnte die Stelle im AFM wiedergefunden werden und die Phase sowie die Topographie des Partikels aufgenommen werden (s. Abb. 21b und 21c). Sowohl die Topographie als auch die Phase der Partikel lassen darauf schließen, dass es sich hierbei wahrscheinlich um Pockenpartikel handelt, daher wurde von diesen

Partikeln ein TERS-Spektrum aufgenommen (s. Abb. 21c, d). Es wurde an vier verschiedenen Stellen gemessen, zweimal neben den beiden Partikeln (oranges und grünes Spektrum) und zweimal an verschiedenen Stellen auf den Partikeln (blaues und rotes Spektrum). Dabei zeigte der Vergleich der beiden Pocken-Spektren Ähnlichkeiten, genauso wie der Vergleich der beiden Spektren von PTA. Des Weiteren konnten einige Unterschiede beim Vergleich der Pocken-Spektren mit den PTA-Spektren detektiert werden. Bei den Pocken-Spektren sind die Amidbande bei ca. $1615\text{-}1660\text{cm}^{-1}$ und die CH_2 -Streckschwingungs-Bande im Bereich von $2500\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ zu detektieren, welche bei den PTA-Spektren fehlten.

Zusammenfassend konnte ein erstes TERS-Spektrum von Pockenpartikeln aufgenommen werden, welche durch vorherige Detektion im TEM lokalisiert wurden. Dies eröffnet die Möglichkeit weitere solcher Spektren in einer Bibliothek zu sammeln, damit neue Proben mit dem vorhandenen Datensatz identifiziert und abgeglichen werden können.

3.2 Charakterisierung und Infektionsstudien des Retrovirus HERV-K113 aus der HERV-K(HML-2)-Familie

3.2.1 Herstellung eines originalen HERV-K113 Molekularklons

Basierend auf einem Algorithmus und mit Hilfe eines Sequenzvergleiches, wurden die zehn jüngsten human-spezifischen HERV-K Elemente verglichen. Dabei konnten 25 nicht synonyme und 17 synonyme Mutationen in der Sequenz sowie vier postinsertionale Mutationen in der LTR von HERV-K113 detektiert werden. Bei diesem Algorithmus wurde eine Mutation als postinsertionale Mutation deklariert, wenn mehr als acht Sequenzen ein anderes Nukleotid an derselben Position aufwiesen. Eine natürliche Variation zeigte sich hingegen, wenn mindestens zwei weitere Sequenzen an derselben Stelle das gleiche Nukleotid wie HERV-K113 zeigten. Diese Variationen stellten keine postinsertionale Mutation dar und wurden nicht revertiert. Die so gefundenen 25 nicht synonymen Mutationen wurden durch Nadine Beimforde revertiert und der Molekularklon, namens ori HERV-K113 rekonstruiert. Dieser Molekularklon konnte Viruspartikel bilden, besaß RT-Aktivität und zeigte sowohl Proteinexpression für Env- als auch für Capsid-Proteine. Bei dem Molekularklon konnte jedoch keine messbare Replikation nachgewiesen werden (Dissertation, Nadine Beimforde). Czech *et al.* [201] Kimchi-Sarfaty *et al.* [202], Komar [203,204] und Beckman [205] zeigten in ihren Publikation, dass stille Mutationen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Effizienz von Proteintranslationen, Proteinfaltung und Proteinfunktionen spielen können. Des Weiteren können stille Mutationen die mRNA Stabilität beeinflussen [206], so dass die mRNA entweder einerseits zu stabil ist und nicht von dem komplementären Strang gelöst werden kann, andererseits zu instabil ist und frühzeitig von Enzymen im Zytoplasma abgebaut wird. Außerdem können synonyme Mutationen gerade auf Promotor- und RNA-Ebene störend sein und die Replikation beeinträchtigt.

Daher wurde zusätzlich zu dem bereits generierten Molekularklon ori HERV-K113 (ori) mit den 25 nicht synonymen Mutationen, zwei weitere Molekularklone generiert, welche die 25 nicht synonymen sowie zusätzlich die 17 synonymen revertierten Mutationen enthielten (s. Tab. 23): ori_st HERV-K113 (ori_st), sowie eine ori_st Variante, namens CMVRU5 ori_st HERV-K113 (CMVRU5 ori_st) (s. Abb. 22). Bei dieser CMV-Variante befindet sich, anstelle des U3-Bereichs in der 5'LTR, ein CMV-Promotor, welcher für eine effiziente Transkription sorgen sollte.

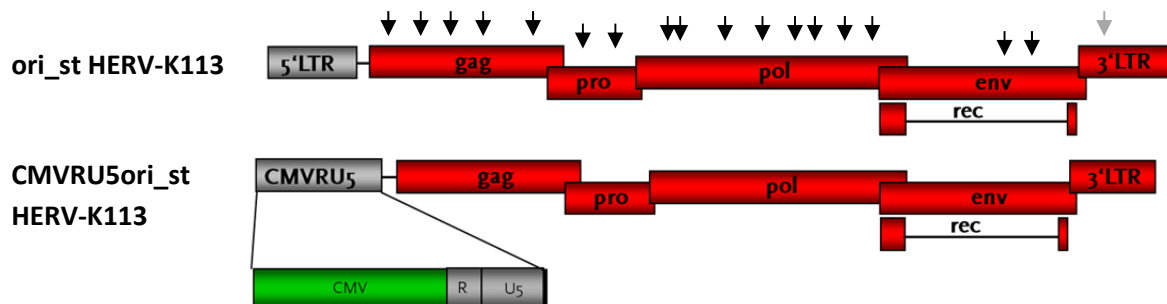


Abb. 22) Schematische Darstellung des Genoms der ori_st und CMVRU5 ori_st Konstrukte mit allen 17 synonymen revertierten Mutationen sowie einer LTR-Mutation

ori_st und CMVRU5 ori_st mit 5'LTR-gag-pro-pol-env-3'LTR. Revertierte Mutationen sind mit Pfeilen markiert, schwarze Pfeile zeigen die synonymen revertierten Mutationen in den Genbereichen, grauer Pfeil zeigt die stille Mutation in der LTR-Region. U3-Bereich der 5'LTR der CMV-Variante wurde durch CMV-Promotor ersetzt. Nicht synonyme Mutationen sind in den Molekularklonen revertiert worden, in der schematischen Abbildung aber nicht eingezeichnet.

Tab. 23) Revertierte synonyme postinsertionale Mutationen und LTR-Mutation

Region	Mutationsstelle	Region	Mutationsstelle
gag	c1288t	pol	c4454t
gag	c1492g	pol	a4856g
gag	a1525g	pol	g5063a
gag	c1741t	pol	c5177t
gag	a2545g	pol	g5408a
pro	t3177g	pol	a5843g
pro	g3429a	env	g8067a
pol	c4061t	env	t8244c
pol	a4067g	3'LTR	c9006g

3.2.2 Untersuchungen der verschiedenen HERV-K113 Moleklarklone auf Morphologie, Proteinexpression und RT-Aktivität

HEK 293T-Zellen wurden mit den neu rekonstruierten ori_st Konstrukten (s. Abb. 22) transfiziert, und mit dem bestehenden Moleklarklon ori verglichen. Der Überstand wurde nach 96 h aufgereinigt und die transfizierten Zellen lysiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung des Viruspellet auf Capsid-Expression mittels Western Blots (s. Abb. 23).

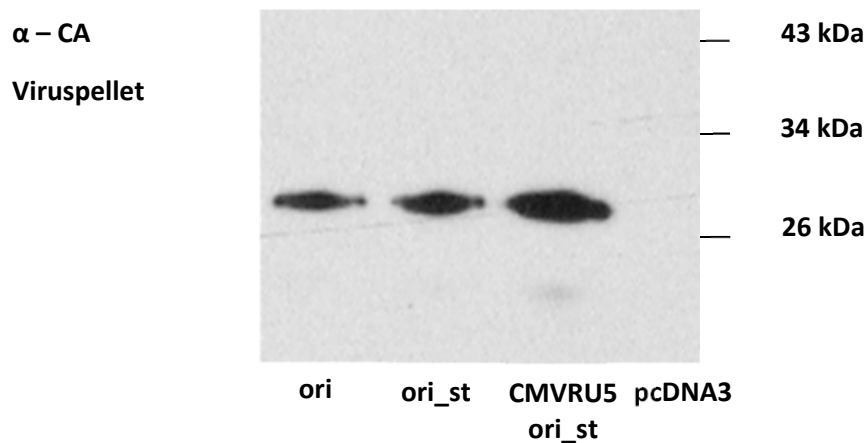


Abb. 23) Detektion von Capsid-Expression in HERV-K113

HEK 293T-Zellen wurden mit ori, ori_st, CMVRU5 ori_st oder pcDNA3 transfiziert und 72-96 h nach Transfektion wurden Capsid (CA)-Proteine aus den Viruspellets mittels SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Western Blot durch Herma6 α -Capsid Antikörpern.

Es konnten für ori und ori_st eine ähnliche Expression von Capsid-Proteinen nachgewiesen werden. Für die CMV-Variante konnte, wie erwartet, eine deutlich höhere Proteinexpression detektiert werden. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase (RT) Aktivität der neu rekonstituierten Konstrukte durch einen HS-Mg abhängigen RT-Assay gemessen (s. Abb. 24).

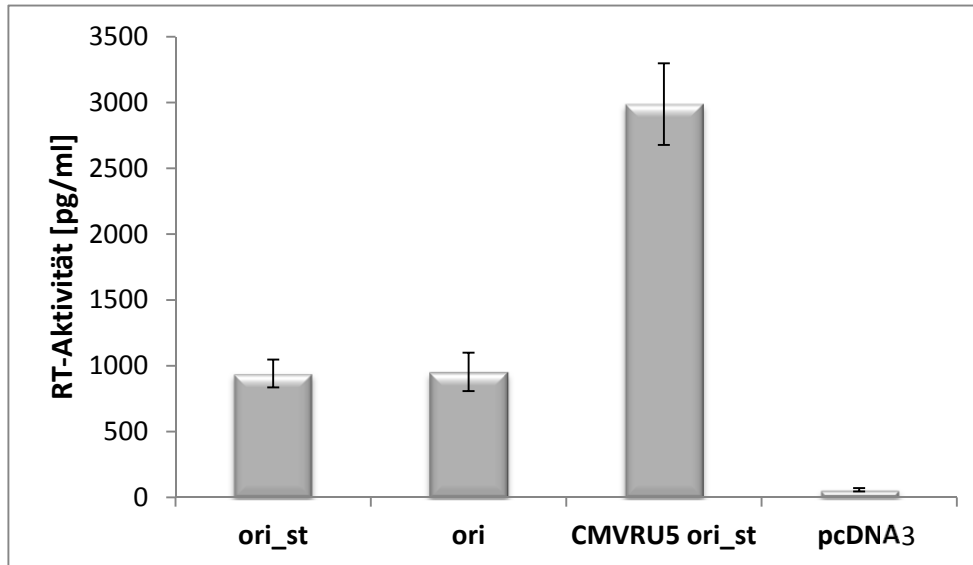


Abb. 24) RT-Aktivitäts-Bestimmung von HERV-K113 Molekularklonen

HEK 293T-Zellen wurden mit ori, ori_st, CMVRU5 ori_st oder pcDNA3 transfiziert und 72-96 h nach Transfektion die RT im Überstand der Zellen bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die Molekularklone ori und ori_st eine ähnliche RT-Aktivität aufwiesen, während die CMV-Variante eine 2-3x höhere RT-Aktivität zeigte. Die verwendeten Molekularklone wurden anschließend im TEM auf Unterschiede in der Viruspartikelanzahl sowie auf strukturelle Unterschiede der Virionen (s. Abb. 25) analysiert. Sowohl die ori als auch die ori_st Varianten zeigten keine Unterschiede im Hinblick auf die Partikelanzahl oder Struktur der Viren im TEM. Beide Viren zeigten Budding-Prozesse, sowie reife und unreife C-Typ-artige Viren. Außerdem gab es bei beiden Molekularklonen einen Hinweis auf das Oberflächenprotein Env (s. Abb. 25, Pfeil). Die CMV-Variante zeigte, wie erwartet eine deutlich höhere Expression der C-Typ-artigen Viruspartikel in den TEM-Präparaten (s. Abb. 25). Es konnten keine strukturellen Unterschiede im Vergleich zu den anderen beiden revertierten Konstrukten nachgewiesen werden.

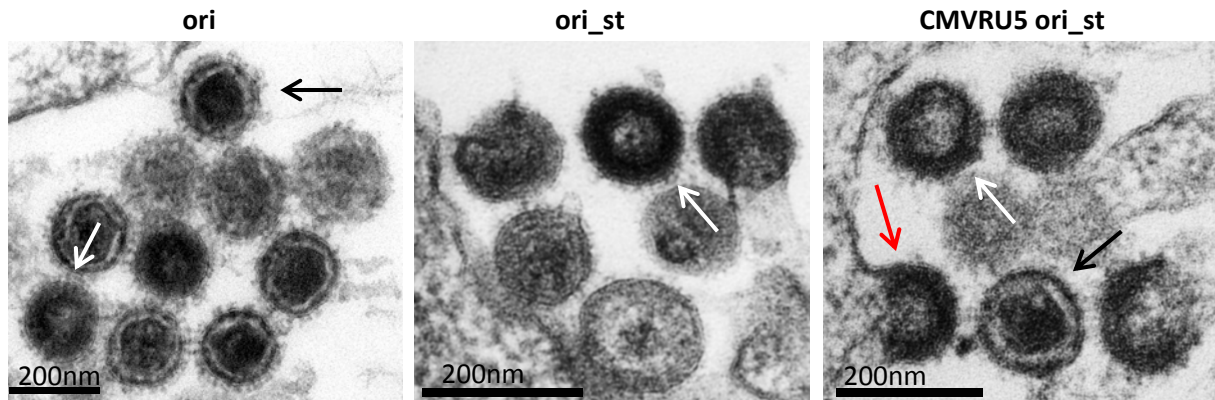


Abb. 25) TEM Aufnahme von ori, ori_st und CMVRU5 ori_st

HEK 293T-Zellen wurden mit ori, ori_st, CMVRU5 ori_st oder pcDNA3 transfiziert. Die Überstände wurden 72-96 h nach Transfektion abgenommen und die Zellen fixiert. Das Pellet wurde in Epon eingebettet und die Ultradünnschnitte im TEM analysiert. Roter Pfeil zeigt Budding-Prozess, schwarze Pfeile reife Viren und weiße Pfeile unreife Viren.

3.2.3 Replikationsstudie mit CMVRU5 ori_st HERV-K113

Aufgrund der deutlich höheren Produktion von Viruspartikeln, Proteinexpression und RT-Aktivität, wurde im Folgenden der Moleklarklon CMVRU5 ori_st HERV-K113 verwendet. Mit diesem wurde in einem Replikationsversuch getestet, ob der Moleklarklon die Fähigkeit besitzt zu replizieren. Hierfür wurden HEK 293T-Zellen mit CMVRU5 ori_st transfiziert. Die Überstände wurden abgenommen und über ein Succrosekissen aufgereinigt. Mit diesen Überständen wurden neue HEK 293T-Zellen infiziert. Es wurden in regelmäßigen Abständen, in einem Zeitraum von 41 Tagen, Probenüberstände der infizierten Zellen abgenommen und die RT gemessen (s. Abb. 26).

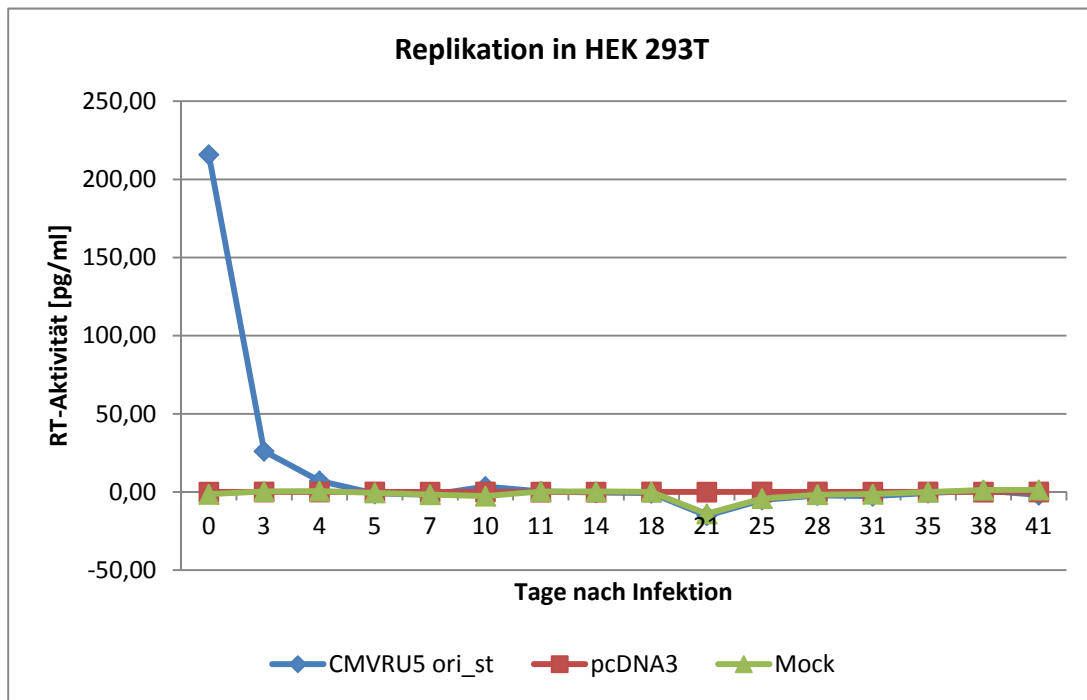


Abb. 26) Bestimmung der RT-Aktivität eines HERV-K113-Molekularklons nach Infektion

HEK 293T-Zellen wurden mit aufgereinigten CMVRU5 ori_st-Viren infiziert und vom Überstand regelmäßig, über einen Zeitraum von 41 Tagen, Proben abgenommen und mittels RT-Aktivitäts-Assay gemessen. Als Negativkontrollen wurden pcDNA3 oder nicht infizierte Zellen (Mock) verwendet.

Fünf Tage nach Infektion der HEK 293T-Zellen konnte kaum noch RT-Aktivität im Überstand nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte die Rekonstitution der originalen HERV-K113-Sequenz basierend auf dem Algorithmus und Revertierung der postinsertionalen Mutationen, Viruspartikeln im TEM, Proteinexpression und RT-Aktivität, jedoch keine messbare Replikation. Eine mögliche Ursache für die nicht detektierbare Replikation des originalen HERV-K113-Molekularklons könnte von einer oder mehreren Inhibitionen zwischen Eintritt des Virus in die Zelle und Expression der Proteine (Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibitionen) verursacht werden.

3.2.4 Identifikation einer möglichen Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibitionen von HERV-K113

Bei einer Inhibition des Virus, zwischen Eintritt in die Zellen und Expression der viralen Proteine, wird das Virus durch einen oder mehreren Inhibitoren neutralisiert oder in seiner Funktion beeinträchtigt. Zu den zellulären Restriktionsfaktoren der Zelle zählen u.a. TRIM5 α , APOBEC3, Tetherin und SAMHD1. Diese Proteine wirken entweder auf bestimmte Motive im Capsid des Virus und verhindert somit seine Replikation (TRIM5 α), oder sie deaminieren die virale Nukleinsäure, so dass die virale RNA soweit mutiert wird, dass keine erneute Replikation stattfinden kann (APOBEC3). Die zellulären Proteine können auch NTPs in Nukleoside und Triphosphate umwandeln und damit die reverse Transkription der viralen cDNA beeinflussen (SAMHD1), oder sie verhindert die vollständige Ausschnürung, indem sie die Partikel in der zellulären Membran festhalten (Tetherin). Um herauszufinden, ob bei HERV-K113 eine Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibitionen stattfindet, wurden HEK 293T-Zellen mit verschiedenen pseudotypisierten HERV-K113-Reporterviren infiziert. Diese Viren wurden mit einem CMVori HERV-K113-Plasmid generiert, welches anstelle der Sequenz für das *env*-Gen ein *Luziferase*- bzw. ein *EGFP*-Gen enthielt. Diese Reporterkonstrukte wurden zusammen mit einem verkürzten HERV-K113-Env-Plasmid (Env Δ C), einem VSV-G-Env-Plasmid (EnvVSV-G) oder einem funktionslosen HIV-Env-Plasmid (Env Δ KS) co-transfiziert. Anschließend wurden die pseudotypisierten Viren aus den Überständen der transfizierten Zellen aufgereinigt und die Virusmenge mittels RT-Aktivitäts-Assays normalisiert. Die pseudotypisierten Viren, welche sich aus den beiden Reporterkonstrukten und den verschiedenen Env-Konstrukten zusammensetzen, sind in Tab. 24 gezeigt.

Tab. 24) Namen der pseudotypisierten Viren und Einsatz von diesen Viren

Pseudotypisiertes Virus	Im folgenden genannt	Einsatz zur/als
CMVoriLuzi mit Env Δ C	oriLuzi/Env Δ C	Detektion der Inhibition
CMVoriLuzi mit EnvVSV-G	oriLuzi/EnvVSV-G	Detektion der Inhibition
CMVoriLuzi mit Env Δ KS	oriLuzi/Env Δ KS	Negativkontrolle
CMVoriEGFP mit EnvVSV-G	oriEGFP/EnvVSV-G	Absättigung der möglichen Post-Entry- Prä-Expression-Inhibition
CMVoriEGFP mit Env Δ KS	oriEGFP/Env Δ KS	Negativkontrolle

Hierbei wurden die oriLuzi-Viren zur Bestimmung der Inhibition von HERV-K113 verwendet und wurden in ihrer Konzentration nicht verändert. Um eine mögliche Inhibition zu detektieren wurden Zellen mit oriLuzi-Viren und oriEGFP-Viren im Verhältnis von 1:10 bzw. 1:100 co-infiziert (s. Abb. 27). Dies sollte einen Überschuss an Viren generieren, so dass ein möglicher Inhibitor durch oriEGFP-Viren abgesättigt wird. Kommt es bei Co-Infektion zu einem Anstieg der Luziferase-Aktivität im Vergleich zu einer Infektion mit oriLuzi-Viren alleine, kann davon ausgegangen werden, dass ein oder mehrere mögliche Inhibitor/en in den Zellen vorhanden sind, welche eine erfolgreiche Replikation von HERV-K113 verhindern. Als Negativkontrollen wurden oriEGFP/Env Δ KS- oder oriLuzi/Env Δ KS-Viren verwendet.

Für die Infektionsversuche wurden Zelllinien verwendet, welche sich, in den Tropismusstudien, unter anderem als besonders permissiv gegenüber dem Env von HERV-K113 zeigten. In diesen Tropismusstudien wurden zum einen mit Env Δ C pseudotypisierten SHIV-Partikeln hergestellt, zum anderen wurden Infektionen mit SHIV-Partikeln durchgeführt, welche mit Env Δ KS (Negativkontrolle) oder mit EnvVSV-G (Positivkontrolle) pseudotypisiert waren. Die Verrechnung der Infektionsraten von SHIV/Env Δ C und SHIV/EnvVSV-G ermöglichten anschließend den Vergleich der Zellen untereinander, so dass auch Inhibitionen nach Eintritt des Virus berücksichtigt wurden (Dissertation, Philipp Kramer). Es konnten unter anderen zwei tierischen Zelllinien detektiert werden, welche eine hohe Permissivität

gegenüber dem Env von HERV-K113 aufwiesen. Das waren zum einen eine aus der Niere stammende feline CrFK-Zelllinie, zum anderen eine aus dem Thymus stammende canine Cf2Th-Zelllinie. Zusätzlich wurden noch vier humane Zelllinien getestet. Die aus der Leber stammende Huh7- sowie die aus der Prostata stammende LNCaP-Zelllinie waren ebenfalls permissiv gegenüber dem Env von HERV-K113. Die aus der Niere stammende humane HEK 293T- sowie die aus der Prostata stammende DU 145-Zelllinie waren nur schwach bis gut permissiv gegenüber Env-HERV-K113.

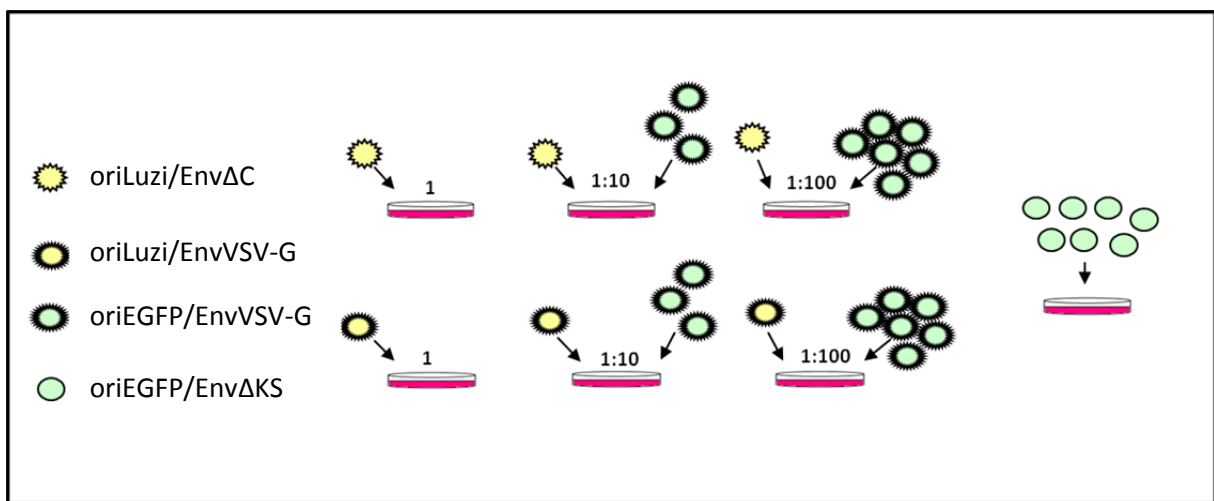


Abb. 27) Schematische Abbildung des Infektionsversuches mit den verschiedenen pseudotypisierten HERV-K113 Konstrukten

Zellen wurden infiziert mit oriLuzi-Viren oder co-infiziert mit oriLuzi-Viren und oriEGFP-Viren im Verhältnis von 1:10 bzw. 1:100. Als Negativkontrolle dienen oriEGFP/EnvΔKS- oder oriLuzi/EnvΔKS-Viren.

Die infizierten Zellen wurden 48 h nach Infektion geerntet und die Luziferase-Aktivität mittels Luminometer gemessen (s. Abb. 28-29).

3.2.4.1 Infektion von humanen Zelllinien mit HERV-K113

Für die Infektion von humanen Zelllinien mit HERV-K113 wurden humane HEK 293T-, Huh7-, LNCaP- und DU 145-Zellen verwendet. In HEK 293T-Zellen (s. Abb. 28) zeigte sich bei Infektion mit oriLuzi/EnvΔC-Viren eine Luziferase-Aktivität

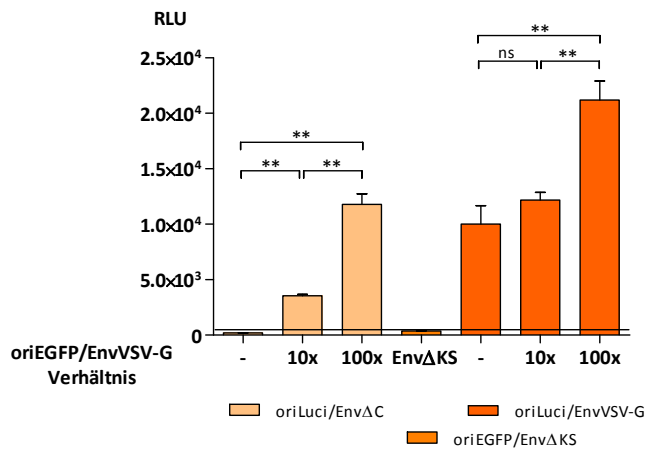
von ca. $1,9 \times 10^2$ RLU. Diese konnte signifikant um das ca. 18,4-fache erhöht werden, wenn mit pseudotypisierten oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, co-infiziert wurde. Die Luziferase-Aktivität ließ sich durch Zugabe von oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:100, nochmals signifikant um das 3,4-fache steigern. Bei Infektion von HEK 293T-Zellen mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren konnte eine Luziferase-Aktivität von ca. $1,0 \times 10^4$ RLU gemessen werden. Bei einer Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, ließ sich die Luziferase-Aktivität um ca. 22% erhöhen. Eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität um das ca. 1,8-fache konnte bei Co-Infektion von oriLuzi/EnvVSV-G- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:100, erzielt werden.

Die Infektionen in Huh7-Zellen mit oriLuzi/Env Δ C-Viren zeigten kaum messbare Luziferase-Aktivität. Bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, konnte die Luziferase-Aktivität signifikant um das ca. 6-fache gesteigert werden. Die Luziferase-Aktivität ließ sich abermals signifikant um das ca. 1,4-fache erhöhen, wenn mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:100, co-infiziert wurde. Bei den Infektionsversuchen mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren konnte keine Steigerung der Luziferase-Aktivität detektiert werden.

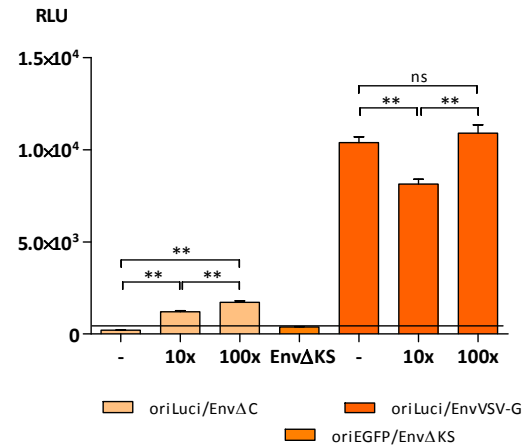
Im Weiteren wurden die zwei aus der Prostata stammenden humanen Zelllinien untersucht. Eine dieser Zelllinien war die LNCaP-Zelllinie (s. Abb. 28). Diese Zelllinie zeigte in der Tropismusstudie eine gute Permissivität für Env-HERV-K113. Bei den Infektionsversuchen mit oriLuzi/Env Δ C-Viren konnte keine Luziferase-Aktivität über den Wert der Negativkontrolle gemessen werden. Hingegen zeigte sich bei den Infektionsstudien mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren, eine Luziferase-Aktivität von ca. $2,4 \times 10^3$ RLU. Die Luziferase-Aktivität konnte signifikant um das ca. 1,4-fache gesteigert werden, wenn die Zellen mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, co-infiziert wurden. Bei einer Co-Infektion, im Verhältnis von

1:100, ließ sich die Luziferase-Aktivität nochmals um das ca. 1,7-fache signifikant erhöhen.

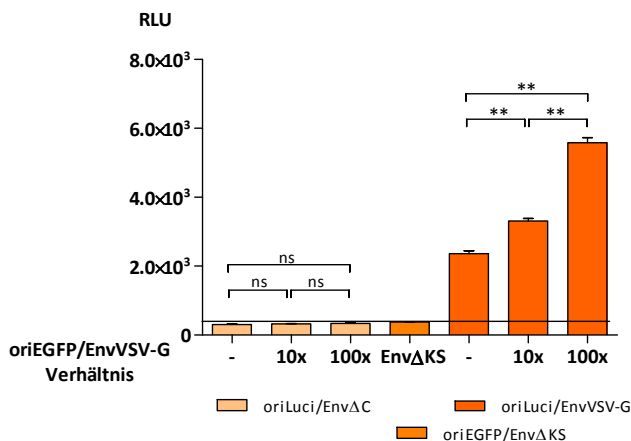
HEK 293T-Zellen



Huh7-Zellen



LNCaP-Zellen



DU 145-Zellen

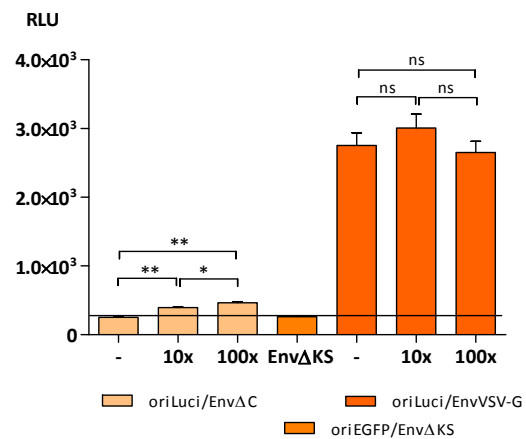


Abb. 28) Repräsentative Luziferase-Aktivitäts-Messung von infizierten humanen Zellen

HEK 293T-, Huh7-, LNCaP- und DU 145-Zellen wurden mit oriLuci/EnvΔC- bzw. oriLuci/EnvVSV-G-Viren infiziert oder mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10 oder 1:100, co-infiziert. Von den Zellen wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit oriEGFP/EnvΔKS-Viren infiziert. Es wurden jeweils 6-fach Bestimmungen (n=6) durchgeführt und der Versuch dreimal wiederholt. ns = nicht signifikant, p-Wert $\leq 0,05$ (*), p-Wert $\leq 0,001$ (**)

Die humanen DU 145-Zelllinie zeigten in der Tropismusstudie eine mäßige Permissivität für Env-HERV-K113 und sollten als Vergleich mit der LNCaP-Zelllinie sowie mit den ebenfalls mäßig permissiven HEK 293T-Zellen dienen (s. Abb. 28). Die

DU 145-Zelllinie zeigte bei Infektion mit oriLuzi/Env Δ C-Viren eine geringe Luziferase-Aktivität von ca. $2,5 \times 10^2$ RLU. Diese Luziferase-Aktivität konnte durch Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, signifikant um das ca. 1,6-fache gesteigert werden. Ebenso konnte eine Co-Infektion, im Verhältnis von 1:100, eine signifikante Erhöhung der Luziferase-Aktivität um ca. 18% erzielen. Bei Infektion von DU 145-Zellen mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren zeigte sich eine höhere Luziferase-Aktivität, von ca. $2,8 \times 10^3$ RLU, als bei Infektion mit oriLuzi/Env Δ C-Viren. Dennoch konnte bei Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10 oder von 1:100, keine Steigerung der Luziferase-Aktivität detektiert werden.

Zusammenfassend konnte eine ca. 63-fache Steigerung der Luziferase-Aktivität in humanen HEK 293T-Zellen detektiert werden, wenn mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren co-infiziert wurde. Ebenso zeigte eine Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren eine bis zu 2,1-fache Steigerung der Luziferase-Aktivität. Die humane Huh7-Zelllinie zeigte eine ca. 3,3-fache Erhöhung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion von oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren. Hingegen ließ sich die Luziferase-Aktivität, durch Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, nicht steigern. In humanen LNCaP-Zellen konnte die Luziferase-Aktivität durch Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, ähnlich wie bei humanen HEK 293T-Zellen, signifikant um das ca. 2,3-fache erhöht werden. Im Gegensatz dazu zeigten humane DU 145-Zellen keine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität durch Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren. Dafür zeigten die Zellen jedoch eine ca. 1,9-fache Erhöhung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, ähnlich der Steigerung der Huh7-Zelllinie bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren.

3.2.4.2 Infektion von tierischen Zelllinien mit HERV-K113

Für diesen Versuch wurden die feline CrFK-Zelllinie und die canine Cf2Th-Zelllinie verwendet. CrFK-Zellen zeigten, bei Infektion mit oriLuzi/Env Δ C-Viren alleine, eine sehr schwache Luziferase-Aktivität von ca. $2,6 \times 10^2$ RLU (s. Abb. 29). Die Luziferase-Aktivität konnte signifikant auf das ca. 5,4-fache erhöht werden, wenn die Zellen mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, co-infiziert wurden. Eine erneute signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität um das ca. 8,6-fache konnte bei einer Co-Infektion, im Verhältnis von 1:100, erzielt werden. Bei den Infektionen, von CrFK-Zellen, mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren konnte eine Luziferase-Aktivität von ca. $1,6 \times 10^4$ RLU gemessen werden. Eine Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, zeigte kaum eine Erhöhung der Luziferase-Aktivität. Hingegen steigerte eine Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:100, die Luziferase-Aktivität signifikant um das ca. 1,6-fache.

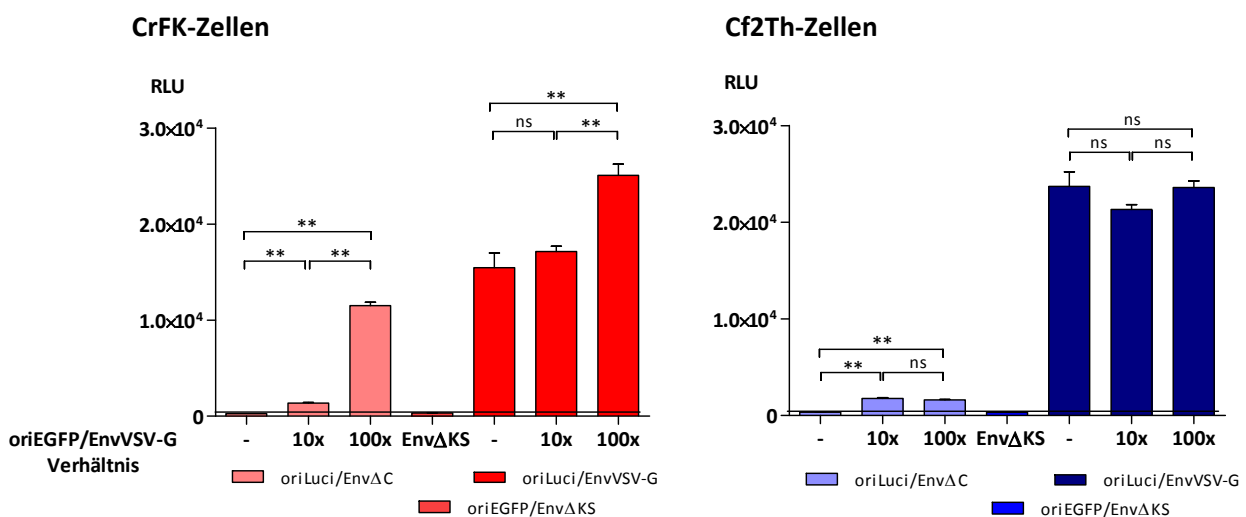


Abb. 29) Repräsentative Luziferase-Aktivitäts-Messung von infizierten tierischen Zelllinien

CrFK- und Cf2Th-Zellen wurden mit oriLuzi/Env Δ C- bzw. oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert oder mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10 oder 1:100, co-infiziert. Von den Zellen wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit oriEGFP/Env Δ KS-Viren infiziert. Es wurden jeweils 6-fach Bestimmungen (n=6) durchgeführt und der Versuch dreimal wiederholt.

ns = nicht signifikant, p-Wert $\leq 0,05$ (*), p-Wert $\leq 0,001$ (**)

In caninen Cf2Th-Zelllinie erzielte eine Co-Infektionen mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, im Vergleich zu einer Infektion mit oriLuzi/Env Δ C-Viren, eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität um das ca. 5,5-fache. Die Luziferase-Aktivität konnte jedoch durch Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:100, nicht erneut erhöht werden (ca. $1,6 \times 10^3$ RLU). Bei Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren konnte eine Luziferase-Aktivität von ca. $2,4 \times 10^4$ RLU gemessen werden. Diese ließ sich durch Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:10, nicht steigern. Eine Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis von 1:100, zeigte ebenfalls keine signifikante Erhöhung der Luziferase-Aktivität.

Zusammenfassend konnte die Luziferase-Aktivität von oriLuzi/EnvVSV-G-Viren, bei Infektion von CrFK-Zellen, signifikant um bis zu 61,1% gesteigert werden, wenn die Zellen mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren co-infiziert wurden. Ebenfalls konnte für oriLuzi/Env Δ C-Viren eine bis zu 46-fache signifikante Erhöhung der Luziferase-Aktivität gemessen werden, wenn zusätzlich zu den oriLuzi-Viren CRFK-Zellen mit oriEGFP VSV-G-Viren co-infiziert wurde. Insgesamt zeigten CrFK-Zellen, welche mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert wurden, wie erwartet eine bis zu 62-fach höhere Luziferase-Aktivität, als bei einer Infektion der Zellen mit oriLuzi/Env Δ C-Viren. In Cf2Th-Zellen konnte durch Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität von oriLuzi/Env Δ C-Viren erzielt werden. Bei Co-Infektion von oriLuzi/EnvVSV-G-Viren mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren konnte keine signifikante Erhöhung der Luziferase-Aktivität gemessen werden. Nachfolgend gibt die Tabelle 25 noch einmal einen Gesamtüberblick über die getesteten Zellen.

Tab. 25) Überblick über den Status einer möglichen Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition der getesteten Zelllinien nach Infektionsstudien mit den absoluten Steigerungsfaktoren

Zelllinie	Steigerungsfaktor bei Co-Infektion mit oriLuzi/EnvΔC- + oriEGFP/EnvVSV-Viren	Steigerungsfaktor bei Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV- + oriEGFP/EnvVSV-Viren	Steigerung durch Co-Infektion? [oriLuzi/EnvΔC vs. oriLuzi/EnvVSV-G]
humane HEK 293T	Steigerung um das 39-fache	Steigerung um das 2,2-fache	positiv/positiv
humane Huh7	Steigerung um das 3,3-fache	keine signifikante Steigerung	positiv/negativ
humane LNCaP	keine Detektion möglich	Steigerung um das 2,3-fache	-/positiv
humane DU 145	Steigerung um das 1,9-fache	keine signifikante Steigerung	positiv/negativ
feline CrFK	Steigerung um das 46-fache	Steigerung um das 1,4-fache	positiv/positiv
canine Cf2Th	Steigerung um das 2,4-fache	keine signifikante Steigerung	positiv/negativ

In einigen der verschiedenen humanen und tierischen Zelllinien konnte eine Steigerung der Luziferase-Aktivität durch eine Co-Infektion mit oriEGFP/EnvVSV-G-Viren erzielt werden. Dies zeigte, dass in einigen Zelllinien, anscheinend unabhängig vom Zelltyp, eine Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition (P-E-P-E-Inhibition) gegen HERV-K113 vorliegt.

3.2.5 Untersuchung des Einflusses von TRIM5 α auf die HERV-K113 Inhibition

Im Weiteren wurden Experimente durchgeführt, die dazu beitragen sollten, einen oder mehrere mögliche Inhibitor/en zu detektieren. Außerdem sollten Experimente mit anderen akzessorischen viralen Proteinen zeigen, ob eine Steigerung der

Luziferase-Aktivität von HERV-K113 mit diesen viralen Proteinen ermöglicht werden kann.

In den Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass mit HERV-K113-Env Δ C pseudotypisierte SHIVs eine um 2-log Stufen höhere Luziferase-Aktivität aufwiesen, als mit demselben Env Δ C pseudotypisierte HERV-K113 (s. 1.2.5.1, Abb. 11). Zur Identifikation einer P-E-P-E-Inhibition kommen verschiedene Restriktionsfaktoren wie z.B. TRIM5 α , APOBEC3G, SAMHD1 oder TREX1 in Frage. Über eine Inhibition von HERV-K113 durch TRIM5 α ist bis jetzt noch nichts bekannt, jedoch konnten Lee und Bieniasz zeigen, dass ein synthetisch rekonstituiertes HERV-K_{con} durch humanes (hu TRIM5 α) bzw. aus Rhesus-Affen stammendes TRIM5 α (rh TRIM5 α), nicht inhibiert wird [123]. Weiterhin konnte weder eine Inhibition durch TRIM5 α bei einigen γ -Retroviren noch bei dem lentiviralen HIV gezeigt werden [207]. Das hu und auch das rh TRIM5 α können jedoch das zu den γ -Retroviren gehörende N-MLV sowie das lentivirale EIAV inhibieren [183, 184, 208]. Demzufolge ist es durchaus möglich, dass das β -retrovirale HERV-K113 durch hu oder rh TRIM5 α inhibiert wird. Daher sollte der Einfluss von TRIM5 α , in den oben getesteten Zelllinien, auf die HERV-K113-Inhibition untersucht werden.

Battivelli *et al.* [166] konnten zeigen, dass Spleißvarianten von TRIM5 α einen dominant-negativen Einfluss auf die Aktivität von TRIM5 α haben, insbesondere die Varianten TRIM5 γ , TRIM5 δ , TRIM5 ι und TRIM5 κ . Daher sollte im folgenden Experiment detektiert werden, ob und wie viel zelluläres TRIM5 α in allen Zelllinien exprimiert werden. Hierbei waren auch die Spleißprodukte von TRIM5 α in den Zelllinien interessant. Dafür wurden untransfizierte und unbehandelte Zellen geerntet und im Western Blot mit einem kommerziell erwerblichen hu TRIM5 α -Antikörper detektiert (s. Abb. 30).

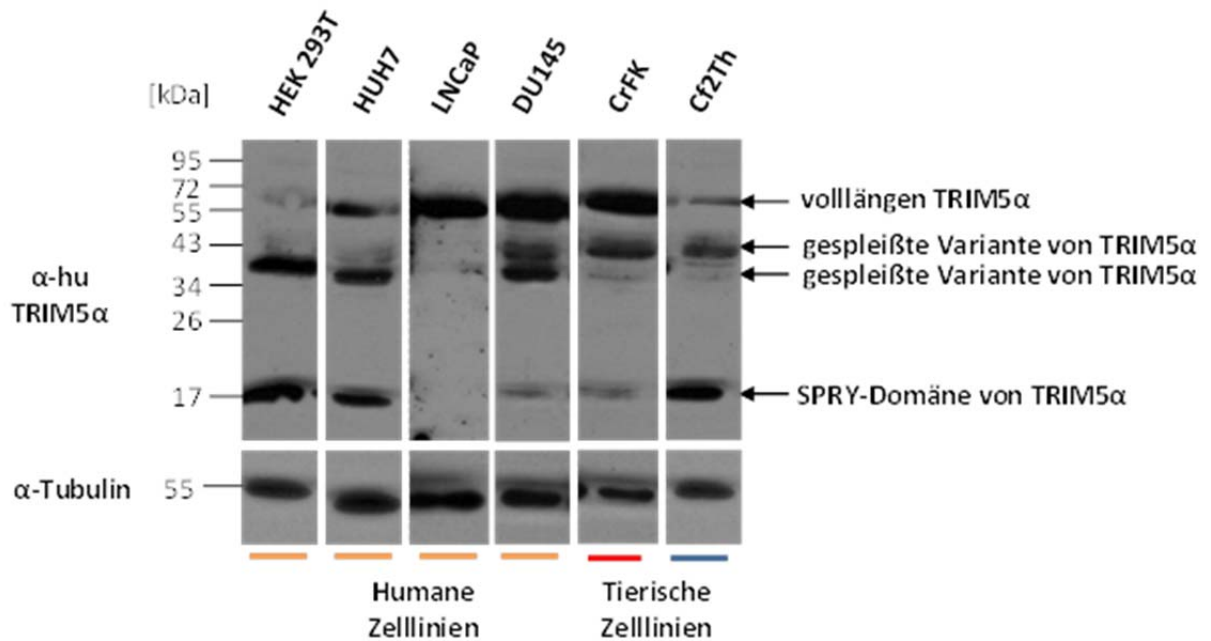


Abb. 30) Nachweis von zelleigenem TRIM5α in unbehandelten Zellen

Zellen wurden bei 80% Konfluenz lysiert und im Western Blot analysiert, Es wurde ein α-hu TRIM5α-Antikörper und als Kontrolle ein α-Tubulin-Antikörper verwendet

Die Abb. 30 zeigt in den humanen und tierischen Zelllinien das erwartete Vollängen TRIM5α mit einer Proteingröße von ca. 57 kDa, sowie Spleißprodukte von TRIM5α mit einer Größe von ca. 43, 40 und 17 kDa. Somit konnte, in allen getesteten Zelllinien, zelluläres TRIM5α nachgewiesen werden.

Nach diesem Vorexperiment wurden die humanen Zelllinien HEK 293T, Huh7, DU 145 und LNCaP, sowie feline CrFK- und canine Cf2Th-Zelllinie mit hu bzw. rh TRIM5α transfiziert und anschließend mit oriLuzi-Viren infiziert. Aufgrund der hohen Infektionsraten von oriLuzi/EnvVSV-G-Viren (s.o.), wurden, in den nachfolgenden Infektionsversuchen, diese pseudotypisierten Viren verwendet. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit Leervektor transfiziert und mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert wurden. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Sinkt die Luziferase-Aktivität bei den Zellen, welche mit TRIM5α transfiziert wurden, lässt das auf eine P-E-P-E-Inhibition durch TRIM5α schließen. Zusätzlich zu der Luziferase-Aktivitätsbestimmung wurde als Kontrolle

das transfizierte und V5-getagte TRIM5 α im Western Blot nachgewiesen. Das Versuchsschema ist in Abb. 31 dargestellt.

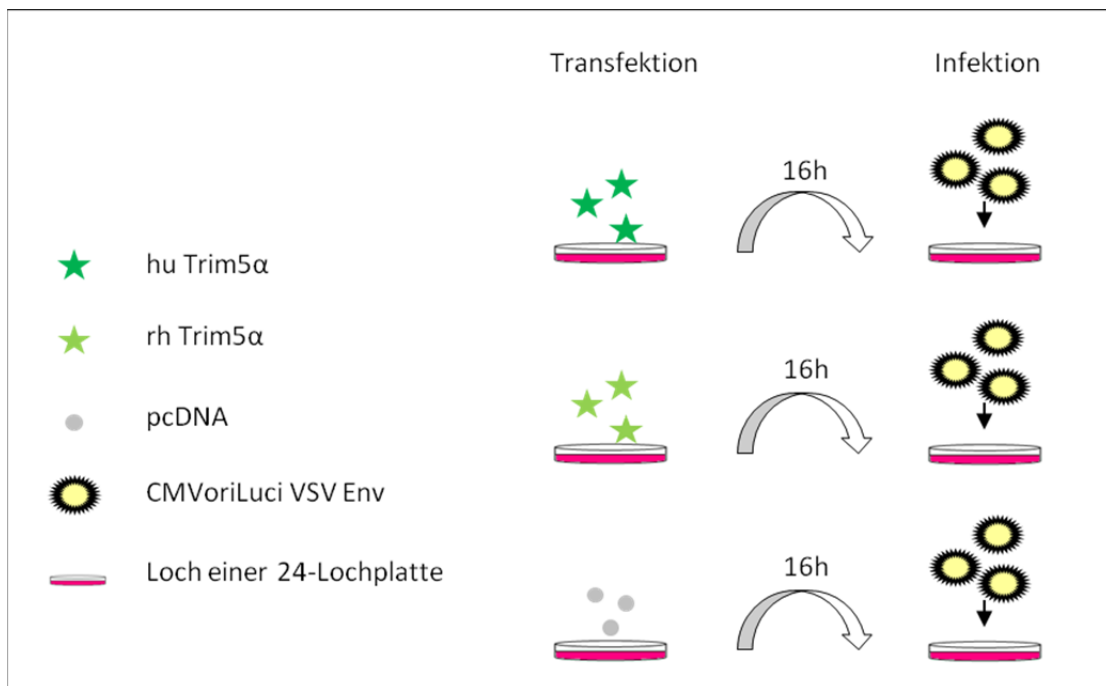


Abb. 31) Transfektions- und Infektionsschema mit TRIM5 α oder pcDNA3 und oriLuzi/EnvVSV-G-Viren

Zellen wurden mit hu TRIM5 α , rh TRIM5 α oder Leervektor transfiziert, 16h nach Transfektion wurden die Zellen mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert und 48 h später die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität gemessen.

Feline CrFK-Zellen zeigten im Infektionsversuch (s. 3.2.4.2) eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität, bei Co-Infektion mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren. Die Zugabe von hu oder rh TRIM5 α führte zu einem signifikanten Anstieg der Luziferase-Aktivität in CrFK-Zellen (s. Abb. 32A). Bei Transfektion mit Leervektor konnte eine Luziferase-Aktivität von ca. $7,74 \times 10^4$ RLU (definiert als 100%) gemessen werden. Mit Transfektion von hu TRIM5 α konnte die Luziferase-Aktivität in den Zellen signifikant um ca. 113% erhöht werden. Eine Transfektion mit rh TRIM5 α steigerte die Luziferase-Aktivität, in CrFK-Zellen, signifikant um ca. 165%. Mit Hilfe eines Western Blots (s. Abb. 32B) konnte transfiziertes und V5-getagtes TRIM5 α in den CrFK-Zellen nachgewiesen werden.

Im weiteren Versuch wurden caninen Cf2Th-Zellen getestet. Diese Zellen zeigten im Infektionsversuch (s. 3.2.4.2) eine geringe bzw. keine Steigerung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren (s. Abb. 32A). Bei Transfektion mit hu bzw. rh TRIM5 α zeigte sich eine signifikante Abnahme der Luziferase-Aktivität. Mit Transfektion von hu TRIM5 α sank die Luziferase-Aktivität signifikant, von ca. $2,4 \times 10^5$ RLU (definiert als 100%) auf ca. $1,8 \times 10^5$ RLU (ca. 75%). Eine Transfektion mit rh TRIM5 α zeigte eine signifikante Abnahme der Luziferase-Aktivität um ca. 33,3% auf ca. $1,6 \times 10^5$ RLU. Des Weiteren ließ sich im Western Blot (s. Abb. 32B) transfiziertes TRIM5 α -Protein mit einer erwarteten Größe von ca. 57kDa detektieren.

Humane HEK 293T-Zellen zeigten im Infektionsversuch (s. 3.2.4.1) eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren (s. Abb. 32A). Bei Transfektion von HEK 293T-Zellen mit hu TRIM5 α zeigte sich eine Verringerung der Luziferase-Aktivität um ca. 4%, im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche mit Leervektor transfiziert und mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert wurden (definiert als 100%). Eine Transfektion von HEK 293T-Zellen mit rh TRIM5 α zeigte eine Reduzierung der Luziferase-Aktivität von ca. 14%. Mit Hilfe des Western Blots (s. Abb. 32B) konnte zudem nachgewiesen werden, dass transfiziertes TRIM5 α in HEK 293T-Zellen vorlag.

Mit humanen Huh7-Zellen konnte kaum eine Steigerung der Luziferase-Aktivität durch Co-Infektion mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren im Infektionsversuch erzielt werden (s. 3.2.4.1). Bei den Zellen ließ sich jedoch eine signifikante Abnahme der Luziferase-Aktivität durch Transfektion der Zellen mit TRIM5 α detektieren (s. Abb. 32A). Die Luziferase-Aktivität konnte für hu TRIM5 α signifikant von ca. $9,6 \times 10^4$ RLU (definiert als 100%) auf ca. $7,7 \times 10^4$ RLU (ca. 82 %) und für rh TRIM5 α auf ca. 8×10^4 RLU (ca. 83%) verringert werden. Bei Huh7-Zellen ließ sich im Western Blot TRIM5 α -Protein mit einer erwarteten Größe von ca. 57 kDa detektieren (s. Abb. 32B).

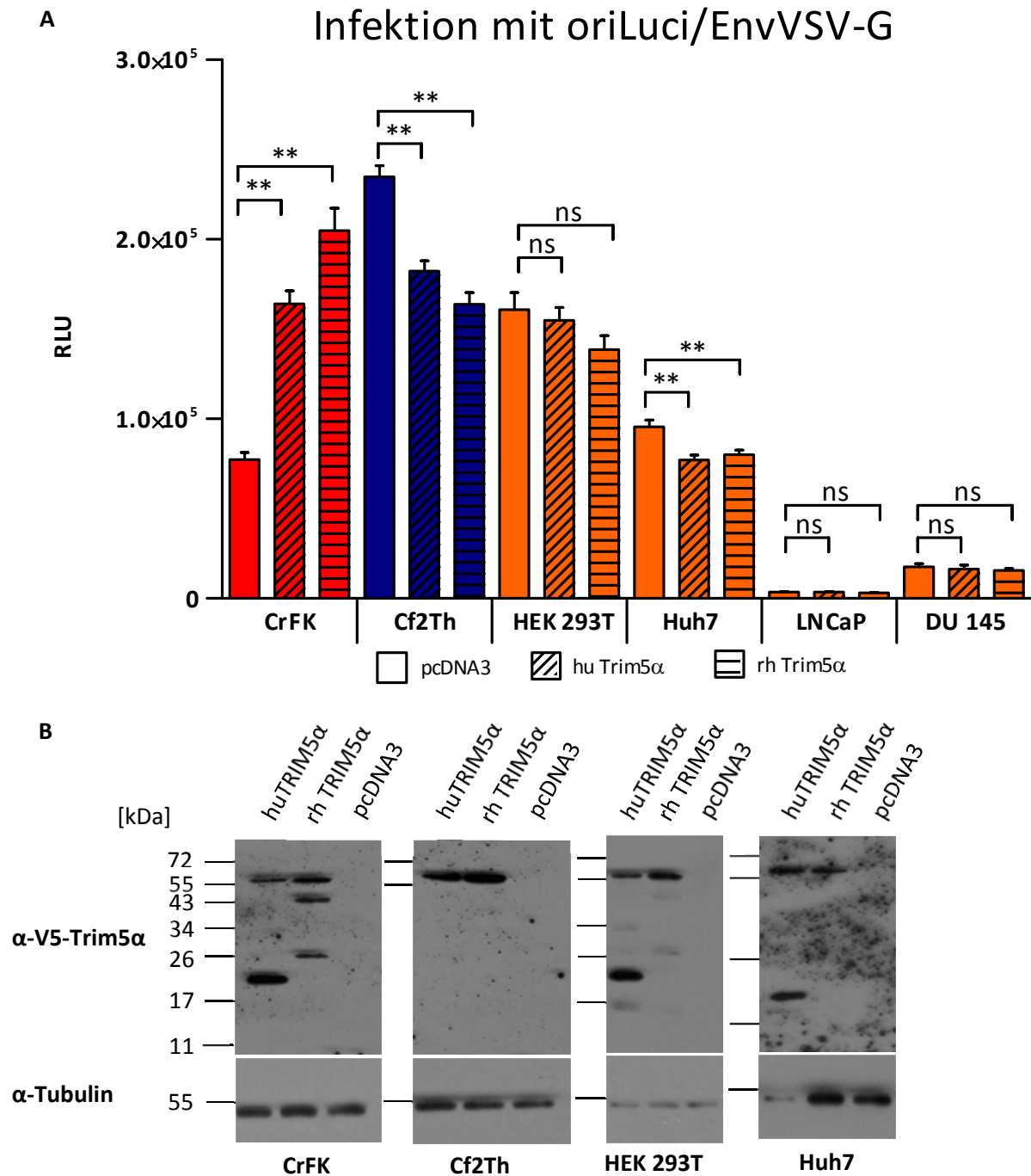


Abb. 32) Auswirkung der Luziferase-Aktivität auf oriLuzi/EnvVSV-G infizierte Zellen bei Transfektion mit hu bzw. rh TRIM5 α

Zellen wurden mit hu TRIM5 α , rh TRIM5 α oder Leervektor transfiziert, ca. 16 h nach Transfektion wurden Zellen mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert und **A**) die Luziferase-Aktivität bestimmt bzw. **B**) V5-getagtes transfiziertes TRIM5 α im Western Blot detektiert. Es wurden jeweils 6-fach Bestimmungen (n=6) durchgeführt und der Versuch zweimal wiederholt. Es wurde ein α -V5-Antikörper und als Kontrolle ein α -Tubulin-Antikörper verwendet, ns = nicht signifikant, p-Wert $\leq 0,05$ (*), p-Wert $\leq 0,001$ (**)

Im Weiteren wurden humane LNCaP-Zellen untersucht. Diese Zellen zeigten im Infektionsversuch (s. 3.2.4.1) eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren. Die Luziferase-Aktivität für infizierte LNCaP-Zellen konnte weder durch Transfektion mit hu TRIM5 α noch mit rh TRIM5 α gesteigert oder gesenkt werden (s. Abb. 32A).

Als nächstes wurden DU 145-Zellen auf den Einfluss von TRIM5 α bei Infektion von HERV-K113 untersucht. Diese Zellen zeigten im Infektionsversuch (s. 3.2.4.1) eine geringe bzw. keine Steigerung der Luziferase-Aktivität, bei Co-Infektion mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren. Nach Transfektion von DU 145-Zellen mit Leervektor konnte eine Luziferase-Aktivität von ca. $1,8 \times 10^4$ RLU (definiert als 100%) gemessen werden (s. Abb. 32A). Diese Luziferase-Aktivität ließ sich weder durch Transfektion mit hu TRIM5 α noch durch Transfektion mit rh TRIM5 α signifikant verändern. Im Western Blot konnte transfiziertes TRIM5 α mit einer erwarteten Größe von ca. 57 kDa detektiert werden (s. Abb. 32B).

Zusammenfassend konnte durch Überexpression von TRIM5 α in CrFK-Zellen ein Anstieg der Luziferase-Aktivität um das ca. 2,65-fache, bei Transfektion mit rh TRIM5 α , und um das ca. 2,12-fache, bei Transfektion mit hu TRIM5 α , erzielt werden. Des Weiteren ließ sich eine signifikante Abnahme der Luziferase-Aktivität von ca. 25% bzw. ca. 33,3 % durch HERV-K113 in CF2TH-Zellen feststellen, wenn diese Zellen mit hu oder rh TRIM5 α überexprimiert wurden. In humanen Huh7-Zellen konnte eine signifikante Abnahme der Luziferase-Aktivität von HERV-K113 durch Transfektion mit hu TRIM5 α von ca. 20% oder rh TRIM5 α von ca. 17% erzielt werden. In den humanen Zelllinien HEK 293T, LNCaP und DU 145 konnte keine signifikante Veränderung der Luziferase-Aktivität durch Transfektion mit hu oder rh TRIM5 α detektiert werden. Die nachfolgende Tabelle 26 fasst die gesamten Ergebnisse der Infektionsversuche nochmal übersichtlich zusammen.

Tab. 26) Überblick über mögliche Inhibition durch hu oder rh TRIM5 α der getesteten Zelllinien nach Überexpression von hu oder rh TRIM5 α mit den absoluten Steigerungs- bzw. Reduzierungsfaktoren

Zelllinie	Inhibition gegen HERV-K113 [oriLuzi/Env Δ C vs. oriLuzi/EnvVSV-G]	Steigerungs- bzw. Reduzierungsfaktor bei Überexpression mit hu TRIM5 α	Steigerungs- bzw. Reduzierungsfaktor bei Überexpression mit rh TRIM5 α	Inhibition gegen HERV-K113 durch TRIM5 α
humane HEK 293T Niere	positiv/positiv	keine signifikante Reduzierung	keine signifikante Reduzierung	negativ
humane Huh7 Leber	positiv/negativ	Reduzierung um das 1,25-fache	Reduzierung um das 1,2-fache	positiv
humane LNCaP Prostata	-/positiv	keine signifikante Reduzierung	keine signifikante Reduzierung	negativ
humane DU 145 Prostata	positiv/negativ	keine signifikante Reduzierung	keine signifikante Reduzierung	negativ
feline CrFK Niere	positiv/positiv	Steigerung um das 2,12-fache	Steigerung um das 2,65-fache	*
canine Cf2Th Thymus	positiv/negativ	Reduzierung um das 1,33-fache	Reduzierung um das 1,5-fache	positiv

* durch Überexpression von hu oder rh TRIM5 α kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Luziferase-Aktivität von HERV-K113

3.2.6 Einfluss von akzessorischen Proteinen auf die Luziferase-Aktivität von HERV-K113

Bei vielen Viren kommen verschiedene akzessorische Proteine zum Einsatz, um eine Inhibition der Viren zu verhindern. Dazu zählen unter anderem im HIV die akzessorischen Proteine wie Vif, Vpu, oder Vpx, welche gegen das humane

APOBEC3G [209, 210]), Tetherin [48, 211-213] oder SAMHD1 [143, 160] gerichtet sind. Aufgrund der Anzeichen, dass in den getesteten verschiedenen humanen und tierischen Zelllinien eine P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 vorliegt, wurden anschließend verschiedene akzessorische Proteine untersucht. Mit Hilfe dieser Proteine sollte analysiert werden, ob diese Proteine einen Einfluss auf den Inhibitor haben und damit HERV-K113 zu einer höheren Aktivität in den Zellen verhelfen.

Hierfür wurden humane HEK 293T-, feline CrFK und canine Cf2Th-Zellen mit den akzessorischen Proteinen Bet (Primaten Foamy Virus (PFV)), Vif (HIV) oder Vpx (HIV-2/SIV_{mac}) transfiziert (s. Tab. 27) und anschließend mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert (s. Abb. 33). Nach Zugabe der verschiedenen akzessorischen Proteine in CrFK-Zellen konnte für Bet und Vif eine geringe Steigerung der Luziferase-Aktivität, von ca. $2,1 \times 10^3$ RLU (definiert als 100%) auf ca. $3,5 \times 10^3$ RLU für Bet (ca. 166%) und auf ca. $2,9 \times 10^3$ RLU für Vif (ca. 138%), detektiert werden. Eine Transfektion mit Vpx zeigte keine Verbesserung der Luziferase-Aktivität von HERV-K113 in CrFK-Zellen.

In Cf2Th-Zellen konnte bei Transfektion mit Bet eine Steigerung der Luziferase-Aktivität um das ca. 3,5-fache für HERV-K113 detektiert werden. Eine Transfektion mit Vpx zeigte eine ca. 2,6-fache Steigerung der Luziferase-Aktivität. Mit einer Transfektion von Vif konnte kaum eine Erhöhung der Luziferase-Aktivität von HERV-K113, in Cf2Th-Zellen, erzielt werden.

Tab. 27) Übersicht über die getesteten akzessorischen Proteine, ihre Herkunft und ihren jeweiligen zellulären Antagonisten

Akzessorisches Protein	Herkunft	Zellulärer Antagonist
Bet	PFV	APOBEC3 [222]
Vif	HIV	APOBEC3G [153]
Vpx	HIV-2/SIV _{mac}	SAMHD1 [143, 160]

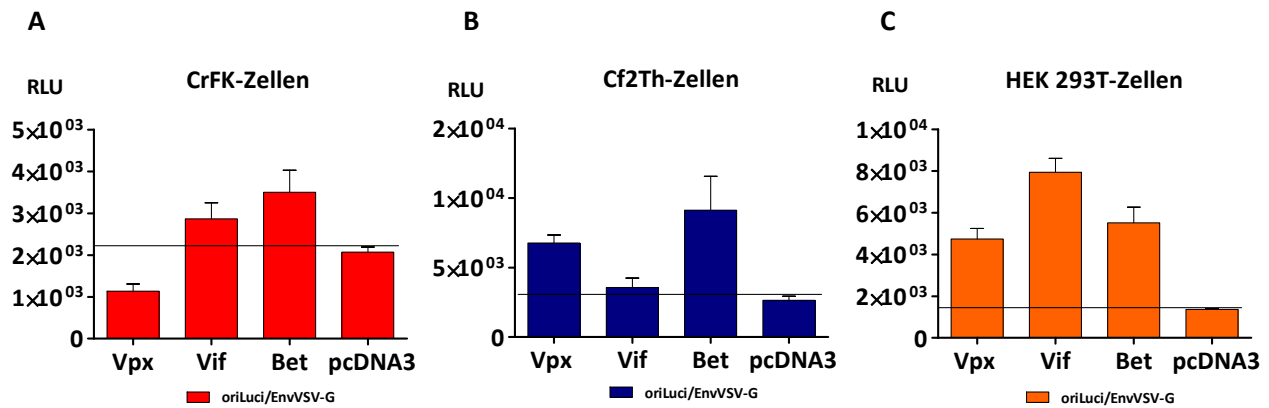


Abb. 33) Auswirkung von akzessorischen Proteinen auf die Luziferase-Aktivität von mit oriLuci-Viren infizierten Zellen

Zellen wurden transfiziert mit Vpx, Vif, Bet oder Leervektor, ca. 16 h nach Transfektion mit oriLuci/EnvVSV-G-Viren infiziert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Alle Werte wurden auf Signifikanz getestet und die Unterschiede als ns bewertet.

Mit Transfektion des akzessorischen Proteins Vpx zeigte sich in den infizierten HEK 293T-Zellen ein ca. 3,4-facher Anstieg der Luziferase-Aktivität von ca. $1,4 \times 10^3$ RLU auf ca. $4,7 \times 10^3$ RLU. Bei Transfektion mit Bet oder Vif konnte ebenfalls eine Erhöhung der Luziferase-Aktivität um das ca. 3,9-fache für Bet und um das ca. 5,6-fache für Vif detektiert werden.

Zusammenfassend zeigte sich jedoch in keiner der Zellen ein signifikanter Anstieg der Luziferase-Aktivität durch Transfektion mit den akzessorischen Proteinen Vpx, Vif oder Bet, ein Anstieg der Luziferase-Aktivität, bei Transfektion mit Bet, ist jedoch in allen Zelllinien zu detektieren. Des Weiteren konnte ebenfalls ein Anstieg der Luziferase-Aktivität bei Transfektion mit Vpx in caninen Cf2Th- und humanen HEK 293T-Zellen gemessen werden. Besonders in felines CrFK- und HEK 293T-Zellen zeigte die Transfektion mit dem Protein Vif eine Erhöhung Luziferase-Aktivität.

4 Diskussion

4.1 TEM-TERS-Korrelation

Die geringe Spezifität ist die größte Limitation der Diagnostik bei der Negativ-Kontrastierungs-Transmissionselektronenmikroskopie. Die Identifikation eines Virus ist nur bis zur Familie möglich. Eine genauere Spezifität mittels TEM ist oftmals nicht möglich, wird aber dringend benötigt. Für diesen Zweck verspricht die Anwendung optischer Spektroskopie eine vielversprechende Alternative zu Methoden, wie z.B. der PCR [9] oder Immunoassays [8]. Die optische Spektroskopie könnte, nach Visualisierung eines einzelnen Partikels im EM, die Bestimmung des relevanten Virus oder Mikroorganismus spezifisch identifizieren. Cialla *et al.* [24] und Hermann *et al.* [22] konnten zeigen, dass es mittels Spitzenverstärkter Raman-Spektroskopie (TERS) möglich ist, Nahfeldspektren von einzelnen Viruspartikeln aufzunehmen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die TERS-Spektren von Pockenviren und Adeno-assoziierten Viren unterscheiden. Daher sollte eine Methode entwickelt werden, die durch die Kombination von TEM und TERS eine zuverlässigere Charakterisierung möglicher pathogener Partikel erlaubt. Für die EM konnte ein neues Grid etabliert werden, welches durch Optimierung an die Adhäsionseigenschaften des Pioloform-befilmten Kupfergrids heranreicht und diese sogar übertrifft. Diese Etablierung erlaubt es in Zukunft die Methode der Kopplung von TEM und TERS weiter zu verfeinern, auszubauen und zu optimieren, sowohl für die EM als auch die TERS.

4.1.1 EM-Substanzen und andere EM-Materialien

Es konnte gezeigt werden, dass einige der EM-gängigen Substanzen, wie das Schwermetall PTA als Kontrastierungsmittel, weiterhin eingesetzt werden können [200]. Andere Materialien waren jedoch ungeeignet für die Kopplung von

TEM mit TERS, wie z.B. Pioloform, UA, PFA oder Kohle, weil diese entweder die erforderliche thermische Stabilität nicht aufwiesen oder in den relevanten Spektralbereichen Raman-Banden zeigten [200]. Gerade im Hinblick auf das PFA sollte jedoch ein anderes Substrat gefunden werden, mit dessen Hilfe es möglich ist, die vermeintlich pathogenen Erreger zu inaktivieren. Hierfür würde eine UV-Inaktivierung der Probe eine Möglichkeit darstellen, welche vorrangig auf die Nukleinsäure zielt und die Proteine und die Virushülle nicht verändert [214, 215]. Es gäbe auch noch verschiedene andere Substanzen, wie z.B. Peressigsäure, die eine Inaktivierung der Pathogene erlaubt und welche wegen der geringen Konzentration kein Raman-Signal im Fernfeld liefern würde. Diese Substanzen müssten, im Hinblick auf die verschiedenen Ansprüche von TEM und TERS, noch ausgetestet werden. Ebenfalls ist es wichtig zu verifizieren, ob und inwieweit sich die Bandenmuster ändern, wenn Partikel mit UV bestrahlt oder mit Säure behandelt werden. Entscheidend sind auch die Dauer und die Konzentration der physikalischen oder chemischen Noxen, bei welcher die Partikel inaktiviert werden, aber dennoch ein einzigartiges Bandenmuster in der TERS aufweisen.

4.1.2 Silizium-basierte Grids

Da der Pioloform-Film nicht die, für die Positionierung der Spitze im fokussierten Laserstrahl, erforderliche thermische Stabilität aufwies, musste eine Alternative gefunden werden. Diese Alternative sollte sowohl die Elektronentransparenz des Pioloform-Films für die EM besitzen als auch gleichzeitig hitzestabil sein und keine Raman-Banden im relevanten Spektralbereich haben. Da Silizium eine hohe thermische Stabilität, eine gute Wärmeleitung sowie eine geringe Oberflächenrauigkeit besitzt, wurden drei verschieden befilmte Si-Grids als Alternative für das Pioloform-Grid ausgetestet. Von den drei Filmen der Si-Grids, zeigte das mit Siliziumnitrid befilmte Si-Grid (SiN-Grid) die geeigneteste Elektronentransparenz (s. 3.1.2, Abb. 15). Bei den anderen beiden Si-Grids konnten

im TEM kleine Verunreinigungen detektiert werden. Aufgrund dieser Verunreinigungen konnten diese Grids, in der EM, nicht verwendet werden, da durch die zusätzlichen Objekte, eine diagnostische Analyse von Erregern auf dem Grid erschwert wird. Diese Verunreinigungen oder Defekte können bei den SiO₂-Grids durch Oxidierung von Silizium, während des Herstellungsprozess entstehen. Bei nicht porösen Si-Grids kommt es wahrscheinlich zu einer ungleichmäßigen Verteilung des Filmmaterials, so dass an einigen Stellen mehr Material aufgetragen wird und diese Bereiche elektronendichter sind. Im Hinblick auf die Kopplungsversuche wurden die Si-Grids auch mittels AFM und Raman auf ihre Oberflächenrauigkeit und ihre Raman-Aktivität untersucht. Die SiO₂- und die SiN-Grids wiesen keine Raman-Aktivität im biologisch relevanten Bereich von 400-3000cm⁻¹ auf. Bei den n.p. Si-Grids konnte in der Raman-Spektroskopie eine Bande bei ca. 520cm⁻¹ und eine Bande bei ca. 980cm⁻¹ detektiert werden, was eine Messung von biologischen Proben in diesem Bereich erschweren würde. Ansonsten zeigten alle drei Si-Grids bei der AFM-Messung geringe Oberflächenrauigkeit sowie die erforderliche mechanische Stabilität.

Im Weiteren wurden die unbehandelten Si-Grids auch auf ihre Adhäsionseigenschaften getestet (s. 3.1.3, Abb. 16). Zur Bestimmung der Adhäsivität der Si-Grids wurde eine Polystyrolbead-Lösung und eine ECTV-Lösung verwendet. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die SiO₂-Grids als auch die nicht porösen Si-Grids sehr schlechte adhäsive Eigenschaften besitzen. Im Gegensatz dazu zeigten die ebenfalls unbehandelten SiN-Grids annähernd so gute adhäsive Eigenschaften, wie die mit Alcianblau chemisch hydrophilisierten Pioloform-Grids. Daher war das SiN-Grid von den drei Si-Grids für die Kopplung von TEM mit TERS am geeignetesten. Die SiN-Grids zeigten sowohl im TEM die höchste Elektronentransparenz, als auch kaum Raman-Aktivität und erwiesen sich nach den ersten Adhäsionsversuchen als eine sehr gute Alternative zu den Pioloform-Grids. Des Weiteren bestachen die SiN-Grids durch die Fähigkeit Plasma-gereinigt zu werden. Aufgrund der exzellenten Hitzestabilität (>1000°C) der SiN-Grids, war es möglich bei hohen Laserleistungen zu

messen und sie waren chemisch träge, mit Rücksicht auf die Suspensionen, die bei der Negativ-Kontrastierung eingesetzt werden [216]. Die vielversprechenden Ergebnisse der hohen Adsorption von Partikeln auf den SiN-Grids können durch die Fähigkeit des Materials erklärt werden. Die meist übliche Form von SiN ist die α - und β -Form mit trigonaler oder hexagonaler Struktur [217]. Die SiN-Grids bestehen aus Kristallen der β -Siliziumnitride in einer glatten gefrorenen Matrix, welche zu einer hohen Bruchzähigkeit beiträgt [217]. Die Amino- (N-H) Gruppen des SiN können das Wasser an der Oberfläche adsorbieren, was dazu führen könnte, dass die Hydrophilität durch die Anlagerung der Wasseratome soweit gesteigert wird, dass eine Adsorption von Partikeln auf den SiN-Grids ermöglicht wird. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die unbehandelten SiN-Grids eine bessere Partikeladsorption aufweist, als die beiden anderen unbehandelten Si-Grids.

4.1.2.1 Optimierung durch Beglimmung der SiN-Grids

Die bereits akzeptable Partikeladsorption der SiN-Grids konnte, indem die Oberfläche der Grids mit negativer Ladung beglimmt wurden, noch gesteigert werden (s. 3.1.4.1, Abb. 17). Im Vergleich zu dem Pioloform-Grid (2 min, 25mA), war eine höhere Stromstärke (35mA) und längere Beglimmungsdauer (4 min) bei den SiN-Grids nötig, um die Partikeladsorption um das 3-fache zu steigern. Die Erhöhung der Stromstärke und die Verlängerung der Beglimmungsdauer stellte aber keinerlei Problem bei den SiN-Grids dar, da es auf der Oberfläche keinen Kohlefilm, wie z.B. bei den Pioloform-befilmten Grids gab. Bei dem Kohlefilm kommt es wahrscheinlich, bei zu langer Beglimmungsdauer und/oder hoher Stromstärke, zu Evaporation. Der Verlust eines Teils der Kohleschicht würde auch erklären warum es bei den mit Kohle-befilmten Pioloform-Grids zu einer Reduktion der Partikeladsorption kommt, wenn man die Stromstärke oder die Dauer der Beglimmung erhöht. Ohne die Kohleschicht verliert das Pioloform-befilmte Grid seine Hydrophilität und damit die Fähigkeit Partikel auf der Oberfläche zu

adsorbieren. Weiterhin sind die SiN-Grids, gegenüber den Pioloform-Grids, besonders hitzestabil und daher unempfindlich gegenüber hohen Laserleistungen [216]. Trotz der optimalen Adsorptionseigenschaften der Pioloform-Grids bei einer Beglimmungsdauer von 2 min und einer Stromstärke von 25mA, reicht es nicht an die SiN-Grids nach Optimierung heran, da es aufgrund seiner Hitzeinstabilität bei der Beglimmung eingeschränkt ist.

Da die SiN-Grids bei einer Beglimmungsdauer von 4 min mit einer Stromstärke von 25mA sowie bei 2 min mit 35mA die höchste Partikeladsorption zeigten, diese jedoch sehr hohe Schwankungen aufwies, wurden weitere Beglimmungsexperimente (s. 3.1.4.2, Abb. 18) durchgeführt. Hierbei konnte bei der Verringerung des Abstands zwischen der Probe und der Kathode eine Steigerung der Partikeladsorption detektiert werden. Ebenfalls zeigte die Reduzierung des Abstands eine homogene Partikelverteilung, welche sich durch die Zunahme der elektrischen Feldstärke im Raum zwischen Anode und Kathode erklärt. Hierbei treffen mehr Ladungsträger auf die Probe, so dass die ganze Probe eine homogenere negative Ladung erhält und die Partikeladsorption durch Verringerung des Abstands gesteigert werden kann. Anders verhält es sich, wenn die Grids positiv beglimmt werden. Hierbei wird die Kathode mit der Anode getauscht (s. 2.2.3.1, Abb. 13C). Die Probe befindet sich nun in der Petrischale unmittelbar auf der Kathode. Die Elektronen die von der Kathode Richtung Anode wandern, stoßen auf die Petrischale, womit die Polarisierung der Oberfläche der Grids geringer ist und sich weniger Partikel auf den Grids anlagern können. Weiterhin herrscht nur ein geringer Anionenaustausch von der Anode zur Kathode, so dass diese geringe Anzahl wahrscheinlich nicht für eine positive Polarisierung der Grids ausreicht.

4.1.2.2 Optimierung der Waschschrirte der SiN-Grids

Nach Abschluss des Beglimmungs-Experiments, zur Steigerung der Adsorptionsfähigkeit für Partikel auf den SiN-Grids, wurden verschiedene Waschschrirte getestet, um eine optimale Lösung zwischen Sauberkeit der SiN-Grids und Anzahl an Partikeln auf den Grids zu erreichen (s. 3.1.4.3, Abb. 19). Dabei stellte sich heraus, dass die Polarität der SiN-Grids sehr stark sein musste, da auch nach mehreren Waschschrirten kaum eine Veränderung der Partikeladsorption auf den Grids feststellbar war. Es zeigte sich lediglich eine höhere Verunreinigungsrate, wenn die Grids nur einmal mit *A.bidest.* gewaschen wurden. Daher muss bei den Grids zwischen Sauberkeit und Waschrdauer abgewogen werden. Die Partikeladsorption der SiN-Grids ist durch die Beglimmung, anders als bei den Pioloform-Grids [5], sehr stabil und stark, da auch nach vier bis fünf Waschschrirten kaum Partikel verloren gehen. Daher können bei den SiN-Grids vier Waschschrirte verwendet werden, ohne einen signifikanten Verlust von Partikeln befürchten zu müssen.

4.1.2.3 Optimierung der Inkubationsdauer der SiN-Grids

Die Inkubationsdauer der Partikelsuspension auf den SiN-Grids spielt eine entscheidende Rolle in der Diagnostik. Hierbei kommt es darauf an, dass möglichst alle Partikel in der Probe innerhalb kürzester Zeit auf den Grids adhärieren. Laue *et al.* [5] zeigten in ihrer Publikation, dass die Partikel mit steigender Inkubationsdauer auf den Pioloform-Grids adhärieren. Bei der Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer der Partikeladsorption auf die SiN-Grids zeigte sich ebenfalls eine Verdopplung der Partikeladsorption bei Steigerung der Inkubationsdauer von 5 min auf 10 min und eine abermalige Verdopplung bei Steigerung der Inkubationsdauer von 10 min auf 20 min (s. 3.1.4.4, Abb. 20). Anders, als bei den Pioloform-Grids [5], zeigen die SiN-Grids keine Verdopplung oder eine Steigerung der Partikeladsorption

bei Erhöhung der Inkubationszeit von 1 min auf 5 min. Dies zeigt die hohe Adsorptionsstärke der SiN-Grids nach Beglimmung bei einer Inkubationsdauer von nur 1 min. Weiterhin ist nach 30 minütiger Inkubationsdauer keine Steigerung der Partikel auf den SiN-Grids festzustellen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Sättigung der Grids, bereits nach einer relativ kurzen Inkuabitionsdauer, sein oder aber für eine Steigerung der Partikelanzahl müsste eine noch längere Inkubationsdauer gewählt werden, welches aber unter dem Aspekt der schnellen diagnostischen Aufklärung nicht akzeptabel ist. Zusammenfassend ist eine Inkubationszeit von 10-20 min vollkommen ausreichend, um noch eine schnelle diagnostische Detektion zu ermöglichen und trotzdem möglichst viele Partikel, in der Probe, auf den SiN-Grids zu binden.

Nach allen Optimierungen des SiN-Grids, konnte die ideale Präparation für das Negativ-Kontrastverfahren für die TEM detektiert werden. Dazu werden die SiN-Grids mit einer Stromstärke von 35mA für 4 min, mit verringertem Abstand zur Kathode, negativ beglimmt. Anschließend werden die Grids für 10-20 min mit der Probensuspension inkubiert und bis zu viermal mit *A.bidest.* gewaschen. Die Grids werden mit 0,5% PTA kontrastiert und können dann mittels EM analysiert werden.

4.1.3 TERS-Spektrum

Nach erfolgreicher Optimierung der Propenpräparation auf den SiN-Grids, sollte abschließend ein Nachweis, für die Verwendbarkeit im TERS, erbracht werden. Hierfür wurden die SiN-Grids mit einer Pockensuspension inkubiert. Mit Hilfe der TEM sollten Partikel detektiert und anschließend mittels AFM re-lokalisiert werden, um ein TERS-Spektrum von diesen Partikeln aufzunehmen (s. 3.1.5, Abb. 21). Es konnten bereits einige TERS-Spektren von Viruspartikeln aufgenommen werden [22, 24]. Ein TERS-Spektrum von Partikeln aufzunehmen, welche vorher mittels TEM detektiert und lokalisiert wurden, konnte bisher jedoch noch nicht gezeigt werden.

Die beiden Messungen die neben den Partikeln erfolgten (s. Abb. 21c, oranges und grünes Spektrum), stellen wahrscheinlich das TERS-Spektrum von PTA dar. Hierbei könnte es sich auch um Salz handeln. Da die Amidbande und die CH₂-Bande im Spektrum fehlen, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um etwas nicht-biologisches handelt. In den Spektren, die auf den Partikeln aufgenommen wurden (s. Abb. 21c-d, blaues und rotes Spektrum), sind diese beiden Banden deutlich zu erkennen. Wahrscheinlich stellen die beiden Messungen auf den Partikeln die Mischspektren von PTA und den Partikeln dar. Wenn auch kein reines Pocken-TERS-Spektrum aufgenommen werden konnte, so konnte dieses Experiment dennoch zeigen, dass eine Lokalisation von Partikeln im TEM, mit anschließender Re-Lokalisation im AFM und Erstellen eines TERS-Spektrums durchaus möglich ist. Weiterhin sollte das rekonstruierte HERV-K113 im TEM detektiert und im AFM re-lokalisiert werden, um ein TERS-Spektrum eines Retrovirus zu erstellen. Aufgrund der geringen Partikelstabilität im TEM konnten jedoch keine Spektren der Retroviren aufgenommen werden.

Die große Problematik an der Kopplung von TEM mit TERS ist die Kontrastierung und die Re-Lokalisation der Partikel mittels AFM. Für das Problem der Re-Lokalisierung könnte es helfen, wenn neben den Grid-Fenstern kleine Zahlen oder Buchstaben eingeätzt werden, wie es sie bei einigen Kupfer-Grids gibt, so dass eine Orientierung im TEM und später im AFM möglich ist. Im Hinblick auf die Kontrastierung, müsste eine Möglichkeit gefunden werden, die störende PTA-Schicht, die sich oftmals über das gesamte Partikel legt, entweder durch andere Kontrastierungsmittel zu ersetzen oder die PTA-Konzentration noch weiter zu reduzieren.

Im Hinblick auf das große Potential welches hinter der Kombination dieser beiden Techniken steckt, sollte in Zukunft weiter an diesem Thema gearbeitet werden und diese Methode nicht nur Anwendung im Bereich der schnelleren und spezifischeren Identifikation von bioterroristischen Agenzien finden, sondern auch weiter zur

Untersuchung verschiedener Viren, wie z.B. den HIV oder HERV-K113 Retroviren genutzt werden. So könnten eventuell virale HERV-K-Partikel, welche in verschiedenen humanen Tumoren gefunden wurden, mittels TERS-Spektrum spezifisch identifiziert werden und helfen Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Ebenfalls könnten spezifische TERS-Spektren von Viren helfen, die biochemischen Eigenschaften der Proteine auf der Oberfläche der Viren spezifisch zu identifizieren und somit eventuell eine Möglichkeit liefern, ähnliche biochemische Zusammensetzungen der Viren auf mögliche Gemeinsamkeiten der Viren zu untersuchen, in Bezug auf Rezeptoren, Entry und Inhibitoren.

4.2 Charakterisierung und Infektionsstudien des HERV-K113

Die Untersuchungen am HERV-K113 zeigten keine messbare Replikation trotz Revertierung der 25 nicht synonymen postinsertionalen Mutationen (Dissertation, Nadine Beimforde). Des Weiteren konnte eine um 2-log-Stufen geringere Infektiösität von mit Env Δ C pseudotypisiertem HERV-K113 nachgewiesen werden, als bei einem SHIV-Konstrukt mit demselben Oberflächenprotein (Dissertation, Philipp Kramer, s. 1.2.5.1, Abb. 11). Aus den vorangegangenen Arbeiten konnten daher zwei Annahmen gezogen werden. Die erste Annahme war, dass die 17 synonymen Mutationen auf DNA- und RNA-Ebene einwirken und damit regulatorische Prozesse beeinflussen könnten. Die andere Annahme beinhaltet, dass es zu einer Inhibition von HERV-K113, zwischen dem Eintritt in die Wirtszelle und der Expression der Proteine (Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition), kommt.

4.2.1 Die Rolle der synonymen Mutationen in HERV-K113

Ein originaler Molekularklon von HERV-K113 mit seinen 17 synonymen und 25 nicht synonymen Mutationen konnte mittels Sequenzen-Vergleich von verschiedenen HERV-K-Elementen ermittelt werden. Die Revertierung der HERV-K113-Sequenz, welche durch Turner *et al.* [79] in einer BAC-Bibliothek gefunden wurde, führte zu einer originalen HERV-K113-Sequenz, wie sie wahrscheinlich zum Zeitpunkt der Integration vorlag. Die Experimente zur Untersuchung der Proteinexpression, RT-Aktivität, Virusstruktur und Viruspartikelbildung (s. 3.2.2, Abb. 23-25) ergaben keine Unterschiede zwischen dem ori HERV-K113-Molekularklon mit den 25 nicht synonymen Mutationen und dem ori_{st} HERV-K113-Molekularklon mit allen revertierten postinsertionalen Mutationen. Lediglich die CMV-Variante zeigte eine dreimal höhere Expression und RT-Aktivität. Anschließend wurden mit dem

CMVRU5 ori_{st} HERV-K113, Replikationsexperimente durchgeführt (s. 3.2.3, Abb. 26). Bei diesen Experimenten konnte trotz allem keine messbare RT-Aktivität für CMVRU5 ori_{st} HERV-K113 nachgewiesen werden. Damit zeigte sich, dass die 17 synonymen Mutationen keine Verbesserung der RT-Aktivität bewirkten, keine Steigerung der Virusexpression zeigten und morphologisch auch keinen Unterschied zum ori HERV-K113 aufwiesen. Dementsprechend mussten andere Gründe für die nicht messbare Replikation und die extrem geringe Infektiösität des pseudotypisierten HERV-K113 verantwortlich sein. Resultierend aus diesen Ergebnissen wurden Infektionsstudien durchgeführt, um eine mögliche Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition (P-E-P-E-Inhibition) von HERV-K113 zu beweisen oder zu widerlegen.

4.2.2 Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition von HERV-K113

Hierfür wurden verschiedene humane und tierische Zelllinien, welche sich in den Tropismusstudien als besonders permissiv gegenüber dem Env von HERV-K113 gezeigt hatten, untersucht. Mit Hilfe zweier Reporterkonstrukte von HERV-K113 sollte so gezeigt werden, ob es nach Infektion mit HERV-K113 zu einer P-E-P-E-Inhibition kommt. Für eine Absättigung einer möglichen Inhibition wurden HERV-K113 verwendet, welche ein *EGFP*-Gen, anstelle des *env*-Gens, trugen. Das zweite Reporterkonstrukt, welches ein *Luziferase*-Gen, anstelle des *env*-Gens, trug, diente zur Messung der Inhibition von HERV-K113. Kam es zu einer Inhibition von HERV-K113, zeigte sich dies durch den Anstieg der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion der Zellen mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren.

Es wurde, mit Ausnahme der LNCaP-Zelllinie, für alle getesteten Zelllinien ein Anstieg der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren detektiert (s. 3.2.4.1 Abb. 28 und 3.2.4.2, Abb. 29). Zusätzlich bewirkte eine Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G- und

oriEGFP/EnvVSV-G-Viren in CrFK-, HEK 293T und LNCaP-Zellen ebenfalls einen Anstieg der Luziferase-Aktivität. Anscheinend werden die Viren, zwischen dem Eintritt in die Zelle und der Proteinexpression, durch einen oder mehrere verschiedene Inhibitor/en abgefangen. Durch eine Co-Infektion mit den oriEGFP/EnvVSV-Viren konnte die Inhibition partiell abgesättigt werden, so dass eine höhere Luziferase-Aktivität in den Zellen detektiert wurde. Die Steigerung bei CrFK- und HEK 293T-Zellen war ca. 12-24x höher, als in den anderen Zelllinien bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren. In diesen beiden Zelllinien zeigte sich somit ein sehr deutlicher Anstieg der Luziferase-Aktivität, was auf eine P-E-P-E-Inhibition schließen lässt. In den anderen Zelllinien zeigte sich bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren nur eine 1,9-3,3-fache Erhöhung und damit kaum ein Anstieg der Luziferase-Aktivität, im Vergleich zu der Infektion mit oriLuzi/Env Δ C-Viren alleine. Bei Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren konnte in humanen HEK 293T-Zellen, LNCaP-Zellen und feline CrFK-Zellen eine Steigerung der Luziferase-Aktivität durch Co-Infektion mit oriLuzi- und oriEGFP/EnvVSV-Viren erzielt werden. Dieser Anstieg konnte jedoch nur um das ca. 1,4-2,3-fache gesteigert werden. Bei den Zelllinien Cf2Th, Huh7 und DU 145 konnte keine Erhöhung der Luziferase-Aktivität detektiert werden. Ausgehend davon, dass ein möglicher Inhibitor nicht in allen Zellen gleichmäßig exprimiert wird, ist die Konzentration an Inhibitor in CrFK- und HEK 293T-Zellen sehr hoch, im Gegensatz zu der Konzentration in den Zelllinien Cf2Th, Huh7 und DU 145. Bei einer geringen Konzentration an Inhibitor reichen anscheinend oriLuzi-Viren alleine bzw. die Co-Infektion mit der 10-fachen Menge an oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, um den Inhibitor abzusättigen. Ist die Konzentration des Inhibitors jedoch sehr hoch, erzielt die Absättigung durch oriEGFP-Viren eine größere Steigerung der Luziferase-Aktivität, als bei einer geringeren Menge an Inhibitor. Eine mögliche Erklärung für die große Steigerung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, im Verhältnis zu einer eher geringen

Steigerung bei Co-Infektion mit oriLuzi/EnvVSV-G- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren in den CrFK- und HEK 293T-Zellen, könnte an den unterschiedlich mit Env pseudotypisierten Viren liegen. Die oriEGFP-Viren, welche zur Absättigung verwendet wurden, trugen alle ein EnvVSV-G. Die oriLuzi-Viren wurden entweder mit Env Δ C oder EnvVSV-G pseudotypisiert. Bei den Infektionsversuchen wurden die Zellen gleichzeitig mit oriLuzi- und oriEGFP-Viren infiziert. Die Luziferase-Aktivität der Zellen, welche mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren alleine infiziert wurden, war in CrFK-Zellen 59,6x, in Cf2Th-Zellen 71,8x, in HEK 293T Zellen 52,6x, in Huh7-Zellen 49,5x, in LNCaP-Zellen 8x und in DU 145-Zellen 9,2x höher, als bei einer Infektion mit oriLuzi/Env Δ C-Viren alleine. Da die mit EnvVSV-G pseudotypisierten Viren dementsprechend eine höhere Infektiosität der Viren besitzen (s. 1.2.5.1, Abb. 11), dringen wahrscheinlich oriEGFP/EnvVSV-G-Viren besser in die Zellen ein und können so einen möglichen Inhibitor absättigen, bevor oriLuzi/Env Δ C-Viren in die Zelle gelangen. Bei gleichen EnvVSV-G Glykoprotein der Reporterviren, oriLuzi und oriEGFP, zeigte sich daher auch nur ein geringer Anstieg der Luziferase-Aktivität. Beide Viren können die Zellen gleich gut infizieren und dringen wahrscheinlich gleichzeitig in die Zellen, so dass der Inhibitor, die Viren zu gleichen Teilen abfängt. Ein weiterer Grund für die große Steigerung bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren könnte ein gemeinsamer Rezeptor sein, um welchen die beiden Glykoproteine konkurrieren. Dahingehend müsste abgeklärt werden, ob der von VSV-G genutzte Rezeptor, wobei es sich um den *low density lipoprotein receptor* (LDLR) handelt [218], ebenfalls als Rezeptor für das Env von HERV-K113 dient. Zusammenfassend ist eine P-E-P-E-Inhibition in verschiedenen humanen und tierischen Zelllinien zu sehen. In einigen Zelllinien wird anscheinend mehr Inhibitor exprimiert als in anderen Zelllinien. Daher ist die Inhibition wahrscheinlich zelltypabhängig.

Die möglichen Restriktionsfaktoren, welche für eine P-E-P-E-Inhibition in Frage kommen, sind unter anderem APOBEC3G, TRIM5 α , SAMHD1 und TREX1. Eine

P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 wird mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch APOBEC3G verursacht, da alle Pseudotypen in HEK 293T-Zellen hergestellt wurden und diese Zellen nicht über APOBEC3G (A3G) verfügen [134]. Über eine Inhibition von HERV-K113 durch TRIM5 α ist bisher noch nichts bekannt. Lee und Bieniasz konnten zwar zeigen, dass ein synthetisch rekonstituiertes HERV-K_{con} nicht durch hu TRIM5 α bzw. rh TRIM5 α inhibiert wird [123] und TRIM5 α auch keine Inhibition bei einigen γ -Retroviren und dem lentiviralen HIV verursacht [207]. Das hu und rh TRIM5 α können jedoch das zu den γ -Retroviren gehörende N-MLV sowie das lentivirale EIAV inhibieren [183, 184, 208]. Weiterhin ist für rh TRIM5 α ebenfalls beschrieben, dass es HIV-1-Infektionen einschränken kann [219, 220]. Demnach ist es durchaus möglich das HERV-K113 durch TRIM5 α inhibiert wird. Eine zusätzliche Inhibition durch SAMHD1 oder TREX1 ist ebenfalls möglich, da in HEK 293T- und Huh7-Zellen SAMHD1 und in den beiden Prostata-Zelllinien TREX1 exprimiert wird (Tab. 28).

Tab. 28) Expression von Restriktionsfaktoren in den getesteten Zellen

Zellen	APOBEC3F (A3F)	APOBEC3G (A3G)	TRIM5 α	SAMHD1	TREX1
HEK 293T	+	-	+	+	-
Niere	[223]	[134]	(s. Ergebnisteil)	[145]	(**)
Huh7	+	-	+	+	-
Leber	[224]	[224]	(s. Ergebnisteil)	(*)	(**)
LNCaP	+	-	+	-	+
Prostata	[223]	[223]	(s. Ergebnisteil)	(*)	(**)
DU 145	-	-	+	-	+
Prostata	[223]	[223]	(s. Ergebnisteil)	(*)	(**)
CrFK	+ (felines APOBEC3C (feA3C), feA3H, feA3CH)		+	o	o
Niere	[221, 222]		(s. Ergebnisteil)		
Cf2Th	o	o	+	o	o
Thymus			(s. Ergebnisteil)		

- negative; + positiv; o keine Angaben

*SAMHD1 Protein Expression data from MOPED and PaxDb (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SAMHD1>)

**TREX1 Protein Expression data from MOPED and PaxDb (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TREX1&search=TREX1>)

Eine P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 durch A3G ist eher unwahrscheinlich, zumal auch in den anderen humanen Zelllinien kein A3G exprimiert wird, so dass die Zellen auf zelleigenes TRIM5 α (s. 3.2.5, Abb. 30) untersucht wurden. Das humane volllängen TRIM5 α konnte, wie erwartet, mit einer Größe von ca. 57kDa detektiert werden. Weiterhin waren Produkte mit einer Größe von ca. 43, 40 und 17kDa auf dem Western Blot zu detektieren. Da der kommerziell erhältliche hu TRIM5 α -Antikörper an einer Region kurz vor der SPRY-Domäne bindet, wird es sich vermutlich bei dem ca. 17kDa großen Produkt um die SPRY-Domäne handeln, welches sich am C-Terminus des hu TRIM5 α befindet. Die beiden anderen ca. 43 und 40kDa großen Fragmente, werden wahrscheinlich Spleißvarianten des TRIM5 α sein [166]. In den Western Blots lassen sich, in allen getesteten Zellen, TRIM5 α sowie Spleißvarianten von TRIM5 α nachweisen. Sowohl die Spleißvarianten von TRIM5 α , als auch TRIM5 α selber werden in den Zellen anscheinend unterschiedlich stark exprimiert. So ist auffällig, dass in DU 145-Zellen eine große Menge an volllängen TRIM5 α , aber auch zwei Spleißvarianten gebildet werden. Wohingegen das Fragment der SPRY-Domäne, im Western Blot kaum nachweisbar ist. Diese Spleißvarianten können die Ursache sein, warum in den DU 145 nur eine geringe Steigerung der Luziferase-Aktivität bei den Co-Infektionsversuchen gemessen wurde. Battivelli *et al.* [166] konnten zeigen, dass die mRNA, welche für TRIM5 α kodiert, nur 50% aller TRIM5 Transkripte in den humanen Zelllinien, CD4+ T-Zellen und Makrophagen ausmacht. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die restlichen Transkripte für alternative Spleißvarianten von TRIM5 α kodieren und diese Spleißvarianten einen dominant-negativen Einfluss auf die Aktivität von TRIM5 α haben. Insbesondere die Varianten TRIM5 γ , TRIM5 δ , TRIM5 ι und TRIM5 κ haben diesen Effekt. In HEK 293T-Zellen werden die ca. 40 und 17kDa großen Fragmente in etwa gleich stark exprimiert. Erst nach längerer Exposition des Western Blots können das ca. 43kDa große Fragment und das volllängen TRIM5 α detektiert werden. Möglicherweise ist das ca. 43kDa Fragment entscheidend bei der Inhibition des

vollängen TRIM5 α in humanen Zelllinien, so dass in den Zellen genügend Inhibitor exprimiert wird, welcher HERV-K113 beeinflusst. In Huh7-Zellen wurden, ähnlich wie in HEK 293T-Zellen, die ca. 40 und 17kDa Fragmente gleich stark exprimiert. Das vollängen TRIM5 α wurde in Huh7-Zellen jedoch stärker produziert, als in HEK 293T-Zellen und nur das ca. 43kDa große Fragment ist schwächer exprimiert. In diesen Zellen zeigte sich jedoch, anders als in HEK 293T-Zellen, bei den Co-Infektionsversuchen nur eine leichte Steigerung der Luziferase-Aktivität und damit die Wahrscheinlichkeit für eine geringe Expression eines Inhibitors. Möglicherweise spielt hier noch ein weiterer Inhibitor eine Rolle. In humanen LNCaP-Zellen konnte, auch nach langer Exposition des Western Blots, kein weiteres Fragment detektiert werden, außer das vollängen TRIM5 α . Dies korreliert mit den Daten aus den Co-Infektionsversuchen, wo eine große Steigerung der Luziferase-Aktivität gemessen werden konnte, was für einen ausreichend exprimierten Inhibitor in diesen Zellen spricht. Bei den beiden tierischen Zelllinien korreliert die Expression ebenfalls mit den Daten aus den Co-Infektionsexperimenten. In CrFK-Zellen wurde viel vollängen TRIM5 α und wenig Spleißvarianten gebildet. Dies unterstützt die Hypothese, dass in diesen Zellen ausreichend Inhibitor exprimiert wird wodurch die große Steigerung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion in CrFK-Zellen zustande kommt. In Cf2Th-Zellen konnte im Western Blot nur wenig vollängen TRIM5 α , im Verhältnis zu den Spleißvarianten, detektiert werden. Dies belegt die Hypothese, dass in diesen Zellen wenig Inhibitor exprimiert wird. Das anscheinend in geringen Mengen exprimierte vollängen TRIM5 α , kann durch die Spleißvarianten noch zusätzlich inhibiert werden. Da alle Zellen TRIM5 α produzierten, wurden sie anschließend mit rh oder hu TRIM5 α transfiziert und mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert. Bei Infektion von HEK 293T-Zellen mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren konnte kaum eine Verringerung der Luziferase-Aktivität durch Überexpression von hu bzw. rh TRIM5 α erzielt werden. Weiterhin wurden mehrere verschiedene V5-getagte Fragmente von hu TRIM5 α in HEK 293T-Zellen gebildet, so dass zusätzlich zu dem

erwarteten ca. 57 kDa großen volllängen TRIM5 α noch drei weitere TRIM5 α -Fragmente im Western Blot detektiert werden konnten. Bei Zugabe des rh TRIM5 α konnten ebenfalls noch zwei weitere TRIM5 α -Fragmente, zusätzlich zu dem volllängen TRIM5 α , detektiert werden. In HEK 293T-Zellen wurden viele TRIM5 α -Fragmente gebildet (s. Abb. 30), welche das volllängen TRIM5 α inhibieren könnten [166]. Die Vermutung liegt nahe, dass es in HEK 293T-Zellen einen weiteren Inhibitor geben könnte, welcher HERV-K113 inhibiert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass in den Zellen genügend TRIM5 α gebildet wird und eine Überexpression mit hu bzw. rh TRIM5 α keinen weiteren Einfluss auf die Inhibitionsstärke hat. Bei humanen LNCaP-Zellen bewirkte eine Überexpression von TRIM5 α , keine signifikante Abnahme der Infektiosität von HERV-K113. Die Co-Infektionsversuche zeigten, dass in LNCaP-Zellen vermutlich eine sehr hohe Konzentration an Inhibitor exprimiert wird, da die Steigerung der Luziferase-Aktivität in den Co-Infektionsversuchen sehr groß war. Möglicherweise wird in diesen Zellen ebenfalls wie in HEK 293T-Zellen genügend TRIM5 α exprimiert, so dass eine Überexpression keinen Einfluss auf den Inhibitionsprozess hat. Eine Inhibition von HERV-K113 durch TRIM5 α in LNCaP-Zellen sollte somit nicht ausgeschlossen werden. Eine Überexpression von hu bzw. rh TRIM5 α in humanen DU 145-Zellen zeigte keine Wirkung auf HERV-K113. Wie bei den Co-Infektionsstudien gezeigt werden konnte, weisen diese Zellen anscheinend nur geringe Konzentrationen des Inhibitors auf. Diese Zellen zeigten jedoch ebenfalls, dass sie sehr große Menge an Spleißvarianten von TRIM5 α exprimierten, welche TRIM5 α inhibieren könnten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass TRIM5 α eventuell am Inhibitionsprozess von HERV-K113 beteiligt ist, die Möglichkeit eines weiteren Inhibitors kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Anders als bei HEK 293T-, LNCaP- und DU 145-Zellen wirkte transfiziertes hu oder rh TRIM 5 α in Cf2Th- und Huh7-Zellen signifikant inhibierend auf HERV-K113. Bei einer Überexpression von hu oder rh TRIM5 α in humanen Huh7-Zellen und in caninen Cf2Th-Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme der Luziferase-Aktivität.

Beide Zelllinien zeigten in den Inhibitionsversuchen nur eine geringe Steigerung der Luziferase-Aktivität bei Co-Infektion mit oriLuzi/Env Δ C- und oriEGFP/EnvVSV-G-Viren, was auf eine geringe Konzentration an Inhibitor schließen lässt. Wurde TRIM5 α überexprimiert, werden in den Zellen mehr TRIM5 α -Proteine gebildet, welches die oriLuzi-Viren inhibieren können. Im Western Blot zeigte sich in diesen Zellen für das transfizierte TRIM5 α ebenfalls keine oder nur wenig Spleißvarianten. Dementsprechend wird das volllängen TRIM5 α wahrscheinlich auch nicht durch Spleißvarianten inhibiert. Ein erstaunliches Ergebnis zeigten feline CrFK-Zellen. Hier konnte eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität bei Überexpression von hu bzw. rh TRIM5 α detektiert werden (s. 3.2.5 Abb. 32). In der Literatur wird von einer Inhibition des ursprünglichen TRIM5 α -Proteins durch mutierte oder verkürzte TRIM5 α -Varianten gesprochen [166, 225]. Mit Transfektion von rh oder hu TRIM5 α könnte die Funktionalität von feline TRIM5 α eingeschränkt bzw. inhibiert werden, so dass es zu einer signifikanten Steigerung von HERV-K113-Viren in den Zellen kommt. Im Western Blot (Abb. 32) konnten sehr viele Spleißvarianten bei CrFk-Zellen detektieren werden. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass es in CrFK-Zellen, durch Überexpression mit hu bzw. rh TRIM5 α , zu einer Steigerung der Luziferase-Aktivität kommt, da anscheinend das hu und rh TRIM5 α einen dominant-negativen Einfluss auf das zelluläre feline TRIM5 α besitzen [166, 225] und inhibierend auf dieses wirken. In der Literatur konnte außerdem gezeigt werden, dass aus verschiedenen Wirten stammendes TRIM5 α unterschiedlich auf Viren reagiert. Das rh TRIM5 α kann z.B. FIV, EIAV sowie HIV-1 [183] inhibieren, während das TRIM5 α der afrikanischen grünen Meerkatzen (AGM) sowohl HIV-1, SIV_{mac}, N-MLV als auch EIAV inhibieren können [226]. Ebenso erstaunlich ist, dass auch das TRIM5 α aus Kühen die HIV-1, HIV-2, SIV_{mac} und N-MLV inhibieren kann [227, 228]. So zeigt das feline TRIM5 α anscheinend eine Inhibition gegen HERV-K113 und wird durch Zugabe von hu bzw. rh TRIM5 α inhibiert, so dass es zu einer Steigerung der Luziferase-Aktivität kommt.

Zusammenfassend konnte in allen Zelllinien eine P-E-P-E-Inhibition detektiert werden. In einigen Zellen war diese Inhibition schwächer ausgeprägt (Cf2Th-, DU 145- und Huh7-Zellen), als in anderen (CrFK-, HEK 293T- und LNCaP-Zellen). Dabei konnte kein Hinweis gefunden werden, dass der Inhibitor nur in einer bestimmten Zelllinie vorkommt. Nach Überexpression mit hu oder rh TRIM5 α zeigte sich in den Zellen, welche anscheinend wenig Inhibitor besaßen (Cf2Th- und Huh7-Zellen), eine Reduzierung der Luziferase-Aktivität, was auf eine Beteiligung von TRIM5 α am Inhibitionsprozess schließen lässt. Für die Zellen welche anscheinend ausreichend Inhibitor exprimierten (HEK 293T- und LNCaP-Zellen), konnte keine signifikante Reduzierung der Luziferase-Aktivität gemessen werden, was entweder bedeutet, dass ausreichend Inhibitor in den Zellen produziert wird und eine Überexpression von TRIM5 α keinen Unterschied bei der Inhibition macht, oder dass ein weiterer Inhibitor in diesen Zellen für die Inhibition von HERV-K113 mitverantwortlich ist. Bei felines CrFK-Zellen bewirkte die Überexpression von hu bzw. rh TRIM5 α sogar eine signifikante Steigerung der Luziferase-Aktivität. Somit kann TRIM5 α durchaus dafür verantwortlich sein, dass es in den humanen und tierischen Zellen zu einer P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 kommt. Ein weiterer Inhibitor kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung von oriEGFP-Viren, im Verhältnis von 1:1000 und 1:10000, sowie ein Stilllegung von TRIM5 α durch siRNAs oder shRNAs könnte eine Inhibition von HERV-K113 durch TRIM5 α bestätigen. Des Weiteren könnte auch ein anderes zelluläres Protein bzw. die Kombination eines anderen Proteins mit TRIM5 α für die Inhibition von HERV-K113 verantwortlich sein. Möglicherweise sind ein Zusammenspiel aus Enzymen, welches für die verschiedenen Fragmente von TRIM5 α verantwortlich ist, sowie eines oder mehrere zelluläre Proteine von entscheidender Bedeutung bei der Inhibition von HERV-K113. Perez-Caballero *et al.* [207] zeigten, dass TRIM5 α nicht an der Restriktion von HIV beteiligt war. Ebenso Lee und Bieniasz konnten keine Inhibition eines synthetisch rekonstituiertes HERV-K_{con} durch hu TRIM5 α bzw. rh

TRIM5 α detektieren [123]. Weiterhin konnte auch bei einigen γ -Retroviren keine Inhibition durch TRIM5 α festgestellt werden [207]. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass TRIM5 α anscheinend einen Einfluss auf HERV-K113 besitzt, welches mit oder ohne Beteiligung anderer Proteine eine P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 bewirkt.

Im Weiteren wurden verschiedene akzessorische Proteine in CrFK, Cf2Th- und HEK 293T-Zellen transfiziert und anschließend wurden die Zellen mit oriLuzi/EnvVSV-G-Viren infiziert, um eine mögliche P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 durch deren Antagonisten zu überprüfen. Für diesen Versuch wurden Vpx-Proteine (HIV, SIV_{mac}), welche mit SAMHD1 interagieren [143, 160], Vif-Proteine (HIV), welche die Wirkung von APOBEC3G inhibieren [153] und Bet-Proteine (PFV), welche ebenfalls gegen APOBEC3 gerichtet sind [222] verwendet. Mit keinem dieser akzessorischen Proteine konnte eine signifikante Steigerung der Infektiosität von HERV-K113 erzielt werden. Das Vpx-Protein zeigte nur in humanen HEK 293T- und caninen Cf2Th-Zellen einen leichten Anstieg der Infektiosität. In CrFK-Zellen konnte kein Effekt durch Vpx erzielt werden. Die beiden Proteine gegen APOBEC3 zeigten, in allen drei getesteten Zelllinien, einen leichten Anstieg der Luziferase-Aktivität, jedoch ist der Einfluss nicht signifikant. Ob eine P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 durch SAMHD1, APOBEC3 oder eines anderen zellulären Proteins vorliegt, sollte weiter untersucht werden. Ebenfalls wären Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Zelllinien erforderlich, um noch weitere Daten zu generieren, welche die Möglichkeit liefern könnten den Inhibitor von HERV-K113 zu identifizieren.

Zusammenfassend gelang die Herstellung eines originalen HERV-K113-Moleklarklons, namens ori_{st} HERV-K113, in welchem alle synonymen und nicht synonymen postinsertionalen Mutationen revertiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die synonymen postinsertionalen Mutationen anscheinend keinen Einfluss auf die Morphologie, RT-Aktivität oder Proteinexpression haben. Ebenso zeigte die Revertierung der synonymen Mutationen

auch keine Verbesserung der Replikation, im Vergleich zum oriHERV-K113. Durch die Vorversuche (Dissertation, Philipp Kramer) konnte gezeigt werden, dass mit Env Δ C pseudotypisierte SHIVs eine um 2-log-Stufen höhere Infektiösität besitzen, als HERVs, welche mit demselben Env Δ C pseudotypisiert wurden (s. 1.2.5.1, Abb. 11). Aufgrund der nicht messbaren Replikation des ori_{st} HERV-K113 und den vorangegangenen Versuchen, wurde eine mögliche P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 postuliert. Daher wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt, welche zeigten, dass sowohl in humanen als auch in tierischen Zellen eine P-E-P-E-Inhibition vorlag. Die weitergehenden Versuche, sollten einen möglichen Inhibitor detektieren. Dabei konnten die Experimente mit transfiziertem hu bzw. rh TRIM5 α einen Hinweis darauf liefern, dass TRIM5 α wahrscheinlich nicht der einzige Grund für eine P-E-P-E-Inhibition von HERV-K113 ist, jedoch eine Beteiligung an der Inhibition nicht ausgeschlossen werden kann.

Diese Vorarbeiten liefern wichtige Informationen über die Morphologie, Infektiösität und mögliche Inhibitoren von HERV-K113. Sie können möglicherweise zu Aufklärung für die HERV-K113-RNA- und Protein-Expression in verschiedenen Krebspatienten beitragen. Um den möglichen Inhibitor bzw. die möglichen Inhibitoren von HERV-K113 zu bestimmen, müssten nochmals Infektionsstudien mit einer größeren Menge an humanen Zelllinien durchgeführt werden. Dies würde eventuell einen Hinweis liefern, warum die P-E-P-E-Inhibition anscheinend zelltypunabhängig ist. Denn obwohl in einer humanen Nieren (HEK 293T-Zellen) und einer Prostata-Zelllinie (LNCaP-Zellen) eine starke Inhibition gegen HERV-K113 detektiert werden konnte, zeigte sich in einer anderen Prostata-Zelllinie (DU 145-Zellen) kaum eine Inhibition gegen HERV-K113. Ebenso konnte für die humane aus der Leber stammende Huh7-Zelllinie kaum eine Inhibition detektiert werden, jedoch eine sehr starke Inhibition bei einer aus dem Gebärmutterhals stammenden HeLa-Zelllinie (Daten nicht gezeigt). Daher würde eine Überprüfung von weiteren humanen Zelllinien eventuell mehr Aufschluss über einen oder mehreren möglichen

Inhibitoren geben. Im Weiteren konnte TRIM5 α als ein Inhibitor gegen HERV-K113 in humanen Huh7- und caninen Cf2Th-Zellen detektiert werden. Bei den anderen humanen Zelllinien, die in den Inhibitionsversuchen positiv waren, konnte kein Effekt durch die Überexpression von TRIM5 α erzielt werden. Um den genauen Grund herauszufinden, müsste in allen getesteten Zelllinien ein „knock down“ von TRIM5 α mittels siRNAs oder shRNAs erfolgen. Eine anschließende Infektion mit oriLuzi-Viren führt entweder zu gleichbleibender Luziferase-Aktivität, was bedeutet, dass TRIM5 α als Inhibitor in diesen Zellen ausgeschlossen werden kann oder es kommt zu einem signifikanten Anstieg der Luziferase-Aktivität, was TRIM5 α als Inhibitor gegen HERV-K113 bestätigen würde. Gleichzeitig können weitere Studien durchgeführt werden, um mögliche andere Inhibitoren auszuschließen oder zu bestätigen. Dabei sollten unter anderem SAMHD1 oder TREX1 als mögliche Inhibitoren in Betracht gezogen werden. Die Suche nach den Inhibitoren gegen HERV-K113 sollte unbedingt weitergeführt werden, da mit Hilfe dieses Wissens eventuell auch die Gründe geliefert werden, warum HERV-K113-RNA- und Protein-Expressionen besonders in Geweben von Krebspatienten detektiert werden. Des Weiteren würde die Entdeckung der Inhibitoren von HERV-K113 es ebenfalls erlauben, den Einfluss dieser Inhibitoren auch auf andere Retroviren zu testen und diese möglicherweise für Therapieansätze zu verwenden.

5 Zusammenfassung

Im Hinblick auf die Gefahren von bioterroristischen Angriffen ist es wichtig schnell und auch spezifisch Pathogene im Probenmaterial potentieller Fälle zu identifizieren. Die EM mit ihrer hohen Ortsauflösung und dem breiten diagnostischen Spektrum ist dafür eine sehr gute Methode. Um auf Einzelpartikelniveau zwischen nah verwandten und im EM identischen Erregern zu unterscheiden, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Methode evaluiert, welche eine korrelative Kopplung der TEM mit der TERS erlaubt. In diesem Zusammenhang wurden Schwermetallsalze zur Kontrastierung und weitere Materialien auf ihre Eignung für die korrelative TEM-TERS Technologie getestet. Dabei erwies sich PTA als das am besten geeignete Kontrastmittel. Weiterhin wurden drei verschiedene auf Silizium-basierende Grids (Si-Grids) auf ihre Verwendung im TEM und TERS untersucht. Hierbei erfüllte ein mit Siliziumnitrid beschichtetes Grid (SiN-Grid) die Voraussetzungen, wie Elektronentransparenz, hohe Partikeladsorption und Hitzestabilität, am besten. In Optimierungsversuchen wurde die Partikeladhäsion der Grids gesteigert und erste TERS-Spektren von einzelnen Pocken aufgenommen, die vorher im EM visualisiert wurden. Aufgrund der geringen Partikelstabilität konnten keine Spektren von Retroviren aufgenommen werden. Es gelang jedoch die komplette Rekonstitution eines HERV-K(HML-2) Elements sowie dessen Expression und Darstellung der Virionen in EM-Schnittpräparaten. Trotz vollständiger Rekonstitution ist das Virus nicht in der Lage in humanen und tierischen Zellen zu replizieren. Als eine mögliche Ursache konnte ein Block im Replikationszyklus nach Viruseintritt und vor der Proteinexpression gemessen werden. Dieser Block kann durch die Zugabe von Competition-Viren abgesättigt werden. Als einer der inhibierenden Faktoren konnte Trim5 α identifiziert werden. Die Identifizierung und Analyse dieser Inhibitoren ist für das Verständnis der Biologie endogener sowie exogener Retroviren von großer Bedeutung und könnte ebenfalls helfen die Beobachtung der HERV-K-Expression in verschiedenen humanen Tumoren besser zu verstehen.

6 Summary

Due to the threat of bio-terroristic attacks it is important to be able to rapidly and specifically identify pathogens in environmental specimens. The high resolution of electron microscopy (EM) makes it ideal for this task. Within the framework of this thesis, a correlative combination of TEM and TERS was evaluated for its ability to distinguish between single particles of different species that appear to be identical in standard EM. For this, heavy metal salts for contrast and other materials were tested for their use in the correlative TEM-TERS technology. PTA was found to be most suitable material for contrast staining. Furthermore three different silicon-based grids were validated for their compatibility to TEM and TERS. The silicon nitride covered grids (SiN-Grids) best fulfilled the requirements of electron transparency, high particle adsorption and heat stability. In addition, particle adhesion to the SiN-Grids was further optimised, allowing the first recording of TERS-spectra of pox particles, previously visualised in EM, to be made. However, the low stability of retroviral particles prevented the recording of their spectra. Furthermore, a complete reconstitution of a HERV-K(HML-2) element was achieved and its expression and particle production demonstrated in EM thin sections. Despite complete reconstitution, the virus was unable to replicate in human or animal cells. One possible reason for this could be the demonstrated block in the replicative cycle that occurs after virus entry but before protein expression. This block could be competitively saturated by the addition of excess virus and TRIM5 α was identified as one of the inhibitory factors. The characterisation and analysis of this inhibition is important for our understanding of the biology of endogenous and exogenous retroviruses and could lead to a better understanding of the expression of HERV-K that is observed in several human tumours.

7 Anhang

7.1 Sequenzprimer

Name	Sequenz
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
H	GTTGGGCACCAGATGTAG
HL	ATCTGGTGCCCAACGTG
gag_1506	ACCGGCTCTGCTACATATTCGC
Seq113a	CCTCTCCAGCAGGTCAG
H Seq e	TGCCGTAGGATTAAGTCTC
SeqH113d	CTTAGGGCCAGATAATCAAG
SeqH113c	TAGCGGCCACTGATTTAC
113RTsec1	CAGCCACCAGGTTTCAG
113RTsec3	GAACAAGTTAGACAAG
3CV	CTGTGTCTAATGCATTATGG
Sp Env	CAGATGAAGTTGCCATCCAC
3AV	GCAGTCACATGGATGGATAATC
3PS	TCCAAGTGCACAAGTGAGTC
3AA	TGCTGTAGCAGGAGTTGCATTGC
AM	GCCATGATGACGATGGTGG
Env	AGAGCACGGGGTTGGGGTAAGGTCATAG
Seq3'LTR	GTCTGTGCTGAGGAGGATTAG

7.2 HERV-K113

```

K113 1          tgtggggaaaagcaagagagatcagattgttactgtgtctgtgtagaagaagtagacat
ori_st_HERV-K113 1  .....
K113 61        aggagactccatTTTTgttatgtactaagaaaaattctctgccttgagattctgtttaatc
ori_st_HERV-K113 61  .....
K113 121       tatgaccttaccocccaaaccccgctgctctctgaaacatgtgctgtgtcaactcagagttga
ori_st_HERV-K113 121 .....
K113 181       atggattaagggcggtgcaggatgtgcttTgttaaacagatgcttgaaggcagcatgtctc
ori_st_HERV-K113 181 .....
K113 241       cttaagagtcacaccactccctaattctcaagtaccagggaacacaaaaactgcggaagg
ori_st_HERV-K113 241 .....
K113 301       ccgcagggacctctgcttaggaagccaggtattgtccaaggttctcccatgtgatag
ori_st_HERV-K113 301 .....
K113 361       tctgaaatatggcctctgtgggaagggaaagacctgacctgccccagccgaaccctgta
ori_st_HERV-K113 361 .....
K113 421       aagggctctgtgctgaggaggatagataagaggaaggaatgctcttgcagttgagaca
ori_st_HERV-K113 421 .....
K113 481       agaggaaggcatctgtctcctccctgtccctgggcaatggaatgtctcggatataaaacc
ori_st_HERV-K113 481 .....
K113 541       gattgtatgctccatctactgagatagggaaaaaccgctcagggctggaggtgggacct
ori_st_HERV-K113 541 .....
K113 601       gcgggcagcaataactgcttTgtaagcactgagatgtttatgtgtatgcatatctaaaag
ori_st_HERV-K113 601 .....
K113 661       cacagacttaatcctttacattgtctatgatgccaaagaccttTgttccagctgtttgtct
ori_st_HERV-K113 661 .....
K113 721       gctgacctctcccaacaattgtctTgtgacctgacacatccccctctttgagaaaac
ori_st_HERV-K113 721 .....
K113 781       ccacagatgatcaataaataactaagggaaactcagaggctggcgggatcctccatagtctg
ori_st_HERV-K113 781 .....
K113 841       aacgctgggtccocgggtccocctattctttctctataactTgtctctgtgtctttttc
ori_st_HERV-K113 841 .....
K113 901       ttttcaaactctctgctcccacttacgagaaacaccacaggtgtgtaggggcaacca
ori_st_HERV-K113 901 .....
K113 961       ccctacatctggtgcccaacgtggaggcttttctctaggggtgaaggtacgctcgagcgt
ori_st_HERV-K113 961 .....

```

K113 1021 ggcatctgaggacaagtcgacgagagatcccaggtacgtctacagtcagccttacggtaa
 ori_st_HERV-K113 1021
 K113 1081 gcttggtgctcggaagaagctagggtgataatggggcaaaactaaaagtaaaattaaaag
 ori_st_HERV-K113 1081
 K113 1141 taaatatgcctcttatctcagctttattaaaattcttttaaaaagagggggagttaaagt
 ori_st_HERV-K113 1141
 K113 1201 atctacaaaaaatctaatacaagctatttcaaataatagaacaattttgcccattggtttcc
 ori_st_HERV-K113 1201
 K113 1261 agaacaaggaacttttagatctaaaaga^ctggaaaagaattggttaaggaactaaaacaagc
 ori_st_HERV-K113 1261^t.....
 K113 1321 aggttaggaaggtaatatcattccacttacagttatggaatgattgggcccattattaaagc
 ori_st_HERV-K113 1321
 K113 1381 agctttagaaccatttcaaacagaagaagatagtggttcagtttctgatgccctggaag
 ori_st_HERV-K113 1381
 K113 1441 ctgtataatagattgtaatgaaaagcaaggaaaaatcccagaaaagaac^cgaaagt
 ori_st_HERV-K113 1441^g.....
 K113 1501 acattgcgaatatgtagcagagcc^agtaatggctcagtcacgc^aaaaatg^ctgactataa
 ori_st_HERV-K113 1501^g.....^t.....
 K113 1561 tcaattacaggaggtgatatactctgaaacgttaaaattagaaggaaaaggtccagaatt
 ori_st_HERV-K113 1561
 K113 1621 aatggggccatcagagctaaaccacgagggcacaagtcctcttccagcaggtcaggtgcc
 ori_st_HERV-K113 1621^g.....
 K113 1681 cgtaacattacaacctcaaaagcaggttaagaaaaataagacccaaccgcccagtagccta
 ori_st_HERV-K113 1681
 K113 1741 ccaatactggcgcgctgtaacttcagttatc^aggccaccccagaaaagtcagttatggata
 ori_st_HERV-K113 1741^g.....
 K113 1801 tccagggaatgccccagcaccacagggcagggcgccataccctcagccgcccactaggag
 ori_st_HERV-K113 1801
 K113 1861 acttaactcagccaccacctagtagacagggtagtgaattacatgaattattgataa
 ori_st_HERV-K113 1861
 K113 1921 atcaagaaaggaaggagatactgaggcatggcaattcccagtaacgttagaac^tgatgcc
 ori_st_HERV-K113 1921^c.....
 K113 1981 acctggagaaggagcccagagggagagcctcccacagttgagccagatacaagtcctt
 ori_st_HERV-K113 1981
 K113 2041 ttcgataaaaaatgctaaaagatatgaaagagggagtaaacagttatggacccaactcccc
 ori_st_HERV-K113 2041
 K113 2101 ttatatgaggacattattagattccattgctcatggacatagactcattccttatgattg
 ori_st_HERV-K113 2101
 K113 2161 ggagattctggcaaaatcgtctctctcaccctctcaatttttacaatttaagacttggtg
 ori_st_HERV-K113 2161
 K113 2221 gattgatgggtacaagaacaggtccgaagaaatagggctgccaatcctccagttacat
 ori_st_HERV-K113 2221
 K113 2281 agatgcagatcaactattaggaataggtcaaaatggagtactattagtcacaagcatt
 ori_st_HERV-K113 2281
 K113 2341 aatgcaaaatgaggccattgagcaagttagagctatctgccttagagcctgggaaaaaat
 ori_st_HERV-K113 2341
 K113 2401 ccaagaccaggaagtaacctgcccctcatttaatacagtaagacaaggttcaaaagagcc
 ori_st_HERV-K113 2401
 K113 2461 ctatcctgattttgtggcaaggctccaagatgttgctcaaaagtcaattgccgatgaaaa
 ori_st_HERV-K113 2461
 K113 2521 agcccgttaaggtcatagtgagtt^aatggcatatgaaaacgccaatcctgagtgatcaatc
 ori_st_HERV-K113 2521^g.....
 K113 2581 agccattaagccattaaaaggaaggttctgcaggatcagatgtaatctcagaatatgt
 ori_st_HERV-K113 2581
 K113 2641 aaaagcctgtgatggaat^gggaggagctatgcataaagctatgcttatggctcaagcaat
 ori_st_HERV-K113 2641^c.....
 K113 2701 aacaggagtgttttagggagacaagttagaacatttggaggaaaatgttataattgtgg
 ori_st_HERV-K113 2701
 K113 2761 tcaaatggctcacttaaaaaagaattgccagtccttaacaaacagaatataactattca
 ori_st_HERV-K113 2761
 K113 2821 agcaactacaacaggttagagaccctgacttatgtccaagatgtaaaaaaggaaaaaca
 ori_st_HERV-K113 2821
 K113 2881 ttgggctagtcaatgtcgttctaaatttgataaaaaatgggcaaccattgtcgggaaacga
 ori_st_HERV-K113 2881
 K113 2941 gcaaaagggccagcctcaggccccacaacaaactggggcattcccattcagccatttgt
 ori_st_HERV-K113 2941
 K113 3001 tctcaggggttttcagggacaacaacccccactgtcccagtggttcaggggaataagcca
 ori_st_HERV-K113 3001
 K113 3061 gttaccacaataacaacaattgtcccccgccacaagcggcagtcgacgagtagatttatgt
 ori_st_HERV-K113 3061
 K113 3121 actatacaagcagtcctctctgctccaggggagccccacaaaaaatccctacaggtgta
 ori_st_HERV-K113 3121^g.....
 K113 3181 tatggccccctgctgaggggactgtaggactaatcttgggaagatcaagtctaaatcta
 ori_st_HERV-K113 3181
 K113 3241 aaaggagttcaaatcactactagtggttgattcagactataaaggcgaattcaattg
 ori_st_HERV-K113 3241
 K113 3301 gttattagctcttcaattccttggagtgccagtcaggagacaggttgctcaattatta
 ori_st_HERV-K113 3301

K113 3361 ctctgcatatattaaggggtgaaatagtgaaataaaaagaaacaggagggcttggaaagc
 ori_st_HERV-K113 3361t.....
 K113 3421 actgatccgacaggaaggctgcatattgggcaagtcaggctcagagaacagacctgtg
 ori_st_HERV-K113 3421a.....
 K113 3481 tgtaaggccattattcaaggaacagcttgaagggtggtagacactggagcagatgtc
 ori_st_HERV-K113 3481
 K113 3541 tctatcattgctttaaatacagtgccaaaaaattggcctaaacaaaaggctgttacagga
 ori_st_HERV-K113 3541
 K113 3601 ctgtgctggcataagcagcagcctcagaagtgtatcaaagtacggagattttacattgctta
 ori_st_HERV-K113 3601g.....
 K113 3661 gggccagataatcaagaaagtaactgttcagccaatgattacttcaattcctcttaactg
 ori_st_HERV-K113 3661
 K113 3721 tggggtcgagatttattacaacaatgggggtgaggaaatcaccatgcccgcctcattatat
 ori_st_HERV-K113 3721c.....
 K113 3781 agccccacaggtcaaaaaatcatgaccaagatgggatataaccaggaaaggactaggg
 ori_st_HERV-K113 3781
 K113 3841 aaaaatgaagatggcattaaagttccagttgaggctaaaataatcaaaaaagagaagga
 ori_st_HERV-K113 3841
 K113 3901 atagggtatcctttttaggggcccactgttagagcctcctaaaccataaccattaactt
 ori_st_HERV-K113 3901
 K113 3961 ggaaaaacagaaaaaccagtggtggtaaatcagtgccgctacaaaaacaaaaactggagg
 ori_st_HERV-K113 3961
 K113 4021 ctttacatttattagcaaatgaacagttagaaaagggtcattgaaacctctctcactc
 ori_st_HERV-K113 4021t.....g.....
 K113 4081 cttggaattctcctgtgtttgtaattcagaagaaatcaggcaaatggcgtatgtaactg
 ori_st_HERV-K113 4081
 K113 4141 acttaagggtgtaaacgcccgaattcaaccatggggcctctccaacctgggtgcct
 ori_st_HERV-K113 4141
 K113 4201 ctccagccatgatcccaaaagattggcctttaattataattgatctaaggattgctttt
 ori_st_HERV-K113 4201
 K113 4261 ttaccatccctctggcagagcaggattgtgaaaaattgccttactataaccagccataa
 ori_st_HERV-K113 4261
 K113 4321 ataataagaaccagccaccaggtttcagtggaagtgtacctcaggaatgcttaata
 ori_st_HERV-K113 4321
 K113 4381 gtccaactattgtcagactttttaggtcgagctcttcaaccagttagagaacagtttt
 ori_st_HERV-K113 4381a.....
 K113 4441 cagactgttatatcattcattatattgatgatattttatgtgctgcagaaacgaaagata
 ori_st_HERV-K113 4441t.....
 K113 4501 aattaattgactgttatacatttctgcaagcagaggtgccaatgctggactggcaatag
 ori_st_HERV-K113 4501
 K113 4561 catctgataagatccaaacctctactccttttcattatttagggatgcagatagaaaata
 ori_st_HERV-K113 4561
 K113 4621 gaaaaattaagccacaaaaaataagaaataagaaaagacacattaaaaacactaaatgatt
 ori_st_HERV-K113 4621
 K113 4681 ttcaaaaattactaggagatattaattggattcggccaactctaggcattcctacttatg
 ori_st_HERV-K113 4681
 K113 4741 tcatgtcaaatttgttctctatcttaagaggagactcagacttaaatagtaaaagaatgt
 ori_st_HERV-K113 4741c.....
 K113 4801 taaccacagagacaacaaaagaatttaaatagtggaagaaaaaattcagtcagcaca
 ori_st_HERV-K113 4801g.....g.....
 K113 4861 taaatagaatagatcccttagccccactccgacttttgattttgccaactgcacattctc
 ori_st_HERV-K113 4861a.....
 K113 4921 caataggcatcattattcaaaatactgatctgtggagtggcattccttctcactcagta
 ori_st_HERV-K113 4921c.....
 K113 4981 cagttaagacttttacttacttggatcaaatagctacattaatcggtcagacaagat
 ori_st_HERV-K113 4981
 K113 5041 tacgaataataaaattatgtgggaatgaccagacaaaatagttgtccctttaaccaagg
 ori_st_HERV-K113 5041a.....
 K113 5101 aacaagttagacaagcctttatcaattctggtgcatggcagattggctcttgctaatttg
 ori_st_HERV-K113 5101
 K113 5161 tgggaattattgataaccattacccaaaaacaagatcttccagttcttaaaattgacta
 ori_st_HERV-K113 5161t.....
 K113 5221 cttggattctacctaaaattaccagacgtgaacctttagaaaatgctctaacagatttta
 ori_st_HERV-K113 5221
 K113 5281 ctgatggttccagcaatggaaaagcagcttacacaggggtgaaagaacaggaatcaaaa
 ori_st_HERV-K113 5281c.....
 K113 5341 ctccatatcaatcggctcaaagagcagagttggttgagctcattacagtggtacaagatt
 ori_st_HERV-K113 5341
 K113 5401 ttgaccagcctatcaatattatcagattctgcatatgtagtacaggctacaagggatg
 ori_st_HERV-K113 5401a.....
 K113 5461 ttgagacagctctaattaaatatagcatggatgatcagttaaaccagctattcaatttat
 ori_st_HERV-K113 5461
 K113 5521 tacaacaaactgtaagaaaaagaatttccattttatattactcatattcgagcacaca
 ori_st_HERV-K113 5521
 K113 5581 ctaatttaccagggcctttgactaaagcaaatgaacaagctgacttactggatcatctg
 ori_st_HERV-K113 5581
 K113 5641 cactcataaaaagcacaagaacttcatgctttgactcatgtaaatgcagcaggattaaaa
 ori_st_HERV-K113 5641

K113 5701 acaaatattgatgtcacatggaacaggcaaaagatattgtacaacattgcaccagtgtc
 ori_st_HERV-K113 5701
 K113 5761 aagtcttacacctgccactcaagaggcaggagttaatcccagaggtctgtgcctaatag
 ori_st_HERV-K113 5761
 K113 5821 cattatggcfaatggatgtcacacatgtaccttcatttggaagattatcatatgttcatg
 ori_st_HERV-K113 5821g.....
 K113 5881 taacagttgatacttattcacatctcatatgggcaacttgccaacaggagaaagtactt
 ori_st_HERV-K113 5881
 K113 5941 cccatgttaaaaaaacattttatgtcttgttttctgtatggaatgggagttccagaaaaaatca
 ori_st_HERV-K113 5941
 K113 6001 aaactgacaatggaccaggatattgtagtaaaagctttccaaaaattcttaagtcagtggga
 ori_st_HERV-K113 6001
 K113 6061 aaatctcacatacaacaggaattccttataattcccaaggacaggccatagttgaaagaa
 ori_st_HERV-K113 6061
 K113 6121 ctaatagaacactcaaaactcaattagttaaacaaaaagaagggggagacagtaaggagt
 ori_st_HERV-K113 6121
 K113 6181 gtaccactcctcagatgcaacttaacttagcacctatactttaaaatttttaaacattt
 ori_st_HERV-K113 6181t.....
 K113 6241 atagaaatcagactacttctgcagaacaacatcttactggtaaaaagaacagcccac
 ori_st_HERV-K113 6241
 K113 6301 atgaaggaaaactaatttgggtggaagataaaaaataagacatgggaaatagggaagg
 ori_st_HERV-K113 6301
 K113 6361 tgataacgtgggggagaggttttctgtgtttccaccaggagaaaatcagcttctgttt
 ori_st_HERV-K113 6361
 K113 6421 ggatgccactagacatttgaagttctacaatgaaccatcggagatgcaaagaaaagca
 ori_st_HERV-K113 6421a.....
 K113 6481 cctccgcggagacggagacaccgcaatcgagcacctgtgactcacaagatgaacaaaatg
 ori_st_HERV-K113 6481
 K113 6541 gtgacgtcagaagaacagatgaagttgcatccaccaagaaggcagagccgccgacttgg
 ori_st_HERV-K113 6541
 K113 6601 gcacaactaaagaagctgacgcagttagctacaaaatatctagagaacacaaaaggtgaca
 ori_st_HERV-K113 6601
 K113 6661 caaacccagagagatgctgcttgacgcttgatgattgatcaatgggtgtaagtctc
 ori_st_HERV-K113 6661
 K113 6721 cctatgctgcaggagcagctgcagctaacctatacctactgggctatgtgctttcccg
 ori_st_HERV-K113 6721
 K113 6781 ccttaattcgggcagtcacatggatggataatcctatagaaatatatgttaatgatagt
 ori_st_HERV-K113 6781g.....
 K113 6841 gtatgggtacctggccccacagatgatgctgctgcccacactgaggaagaagggatg
 ori_st_HERV-K113 6841c.....
 K113 6901 atgataaatatttccattgggtatcgttatcctcctatttgcctaggagagcaccagga
 ori_st_HERV-K113 6901
 K113 6961 tgtttaatgctgcagtcacaaaattggttggtagaagtaactactgtcagtcacatcagt
 ori_st_HERV-K113 6961
 K113 7021 agattcacttatcacatggtaagcgggatgtcactcaggccacgggtaaaattatttaca
 ori_st_HERV-K113 7021
 K113 7081 gacttttcttatcaaagatcattaaaatttagacctaaagggaaacctgccccaggaa
 ori_st_HERV-K113 7081
 K113 7141 attcccaaagaatcaaaaaatacagaagtttagtttgggaagaatgtgtggccaatagt
 ori_st_HERV-K113 7141
 K113 7201 gcggtgatattacaaaacaatgaattcggactcttatagattgggcacctcgaggtcaa
 ori_st_HERV-K113 7201a.....
 K113 7261 ttctaccacaattgctcaggacaaactcagtcgtgtccaagtgcaaatgagtcagct
 ori_st_HERV-K113 7261
 K113 7321 gttgatagcgacttaacagaaagtttagacaaacataagcataaaaaattgcagtccttc
 ori_st_HERV-K113 7321
 K113 7381 taccttgggaatggggagaaaaaggaatctctaccgcaagacaaaaataaagtctc
 ori_st_HERV-K113 7381c.....
 K113 7441 gtttctggtcctgaacatccagaattatggaggcttactgtggcctcacaccacattaga
 ori_st_HERV-K113 7441
 K113 7501 atttggtctggaatcaaaactttagaacaagagatcgtaagcattttatactatcgac
 ori_st_HERV-K113 7501
 K113 7561 ctaaatccagcttaacagttcctttacaaagttgcgtaaaagcccccttatatgctagtt
 ori_st_HERV-K113 7561
 K113 7621 gtaggaaatagttattaaaccagactcccagactataacctgtgaaaattgtagattg
 ori_st_HERV-K113 7621
 K113 7681 ctacttgcattgattcaacttttaattggcaacaccgtattctgctggtagagcaaga
 ori_st_HERV-K113 7681
 K113 7741 gagggcgtgtggatcctgtgtccatggaccgaccgtgggaggcctcaccatccgtccat
 ori_st_HERV-K113 7741
 K113 7801 attttgactgaagtataaaagggttttaaatagatccaaaagattcattttacttta
 ori_st_HERV-K113 7801
 K113 7861 attgcagtgattatgggattaattgcagtcacagctacggctgctgtagcaggagttgca
 ori_st_HERV-K113 7861
 K113 7921 ttgcactcttctgttcagtcagtaaaacttggtaaatgattggcaaaaataattctacaaga
 ori_st_HERV-K113 7921a.....
 K113 7981 ttgtggaattcacaatctagttatgatcaaaaattggcaaatcaaatatgatcttaga
 ori_st_HERV-K113 7981

K113 8041 caaactgtcatttggatgggagacag^gctcatgagcttagaacatcgtttccagttacaa
 ori_st_HERV-K113 8041^a.....
 K113 8101 tgtgactggaatacgtcagatttttgtattacaccccaaatttataatgagctcgagcat
 ori_st_HERV-K113 8101
 K113 8161 cactgggacatggttagat^gccatctacaggaagagaagataaatctcacttttagacatt
 ori_st_HERV-K113 8161^c.....
 K113 8221 tccaaattaaaagaacaaat^ttgaagcatcaaaagcccatttaaatttggtgccagga
 ori_st_HERV-K113 8221^c.....
 K113 8281 actgaggcaattgcaggagttgctgatggcctcgcaaatcttaac^actgtcacttgggtt
 ori_st_HERV-K113 8281^c.....
 K113 8341 aagaccattggaagtactacaattataaatctcatattaatccttgtgctgttttgt
 ori_st_HERV-K113 8341
 K113 8401 ctggtgttagtct^acaggtgtacccaacagctccga^cgagacagcgaccatcgagaacgg
 ori_st_HERV-K113 8401^g.....^a.....
 K113 8461 gccatgatgacgatggtggttttgtcgaaaagaaaaggggaaatgtgggaaaagcaag
 ori_st_HERV-K113 8461
 K113 8521 agagatcagattgttactgtgtctgtgtagaagaagtagacataggagactccattt
 ori_st_HERV-K113 8521
 K113 8581 ttatgta^ttaagaaaaattctctgccttgagattctgttaatctatgaccttacccca
 ori_st_HERV-K113 8581^c.....
 K113 8641 accccgtgctctctgaacatgtgctgtgtcaactcagagttgaatggattaagggcggt
 ori_st_HERV-K113 8641
 K113 8701 gcaggatgtgctttgttaaacagatgcttgaaggcagcatgctccttaagagtcatcacc
 ori_st_HERV-K113 8701
 K113 8761 actccctaactc^aagtagccagggacacaaaactgc^agaaggccgcagggacctctgc
 ori_st_HERV-K113 8761^g.....
 K113 8821 ctaggaagccaggatattgtccaaggtttctcccatgtgatagtctgaaatatggctc
 ori_st_HERV-K113 8821
 K113 8881 gtgggaaggaagacactgaccgtccccagccgacacccgtaaggggtctgtgctgag
 ori_st_HERV-K113 8881
 K113 8941 gaggattagtataagaggaaggaatgcctcttgcagttgagacaagaggaaggcatctgt
 ori_st_HERV-K113 8941
 K113 9001 ctctc^cctgtccttgggcaatggaatgtctcggataaaaaccgattgtatgctccatc
 ori_st_HERV-K113 9001^g.....
 K113 9061 tactgagatagggaaaaccgcctcagggtggaggtgggacctgcgggcagcaatactg
 ori_st_HERV-K113 9061
 K113 9121 cttttaaagca^ttgagatgtttatgtgtatgcataatctaaaagcacagcacttaatcct
 ori_st_HERV-K113 9121^c.....
 K113 9181 ttacattgtctatgatgccaagaccttgttcacgtgtttgtctgctgacctctcccca
 ori_st_HERV-K113 9181
 K113 9241 caattgtcttgtgacctgacacatccccctctttgagaacacccacagatgatcaata
 ori_st_HERV-K113 9241
 K113 9301 aatactaaggaactcagaggctggcgggatcctccatgatctgaacgctggttccccgg
 ori_st_HERV-K113 9301
 K113 9361 ttccccttattttctctatactt^tgtctctgtgtctttttcttttccaaatctctcg
 ori_st_HERV-K113 9361
 K113 9421 tcccaccttacgagaaacaccacaggtgtgtagggcaaccaccctaca
 ori_st_HERV-K113 9421

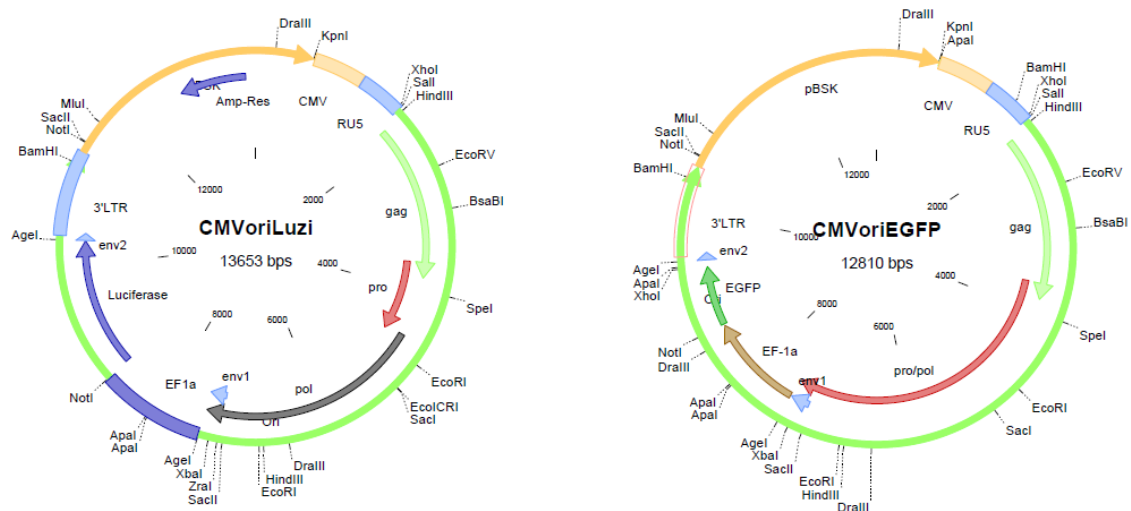
7.2.1 Revertierte nicht synonyme postinsertionale Mutationen und LTR-Mutationen

Region	Mutationsstelle	Region	Mutationsstelle
gag	c1551t	pol	c6214t
gag	a1622g	pol	g6425a
gag	a1773g	env	a6823g
gag	t1974c	env	t6868c
gag	g2659c	env	c7234a
pro	c3404t	env	g7417c
pro	a3613g	env	t7968a
pro	t3752c	env	t8179c
pol	c4433a	env	a8326c
pol	t4741c	env	a8414g
pol	a4812g	env	c8437a
pol	g4891a	3'LTR	t8588c
pol	t4924c	3'LTR	a8799g
pol	t5320c	3'LTR	t9133c

7.2.2 Revertierte synonyme postinsertionale Mutationen und LTR-Mutationen

Region	Mutationsstelle	Region	Mutationsstelle
gag	c1288t	pol	c4454t
gag	c1492g	pol	a4856g
gag	a1525g	pol	g5063a
gag	c1741t	pol	c5177t
gag	a2545g	pol	g5408a
pro	t3177g	pol	a5843g
pro	g3429a	env	g8067a
pol	c4061t	env	t8244c
pol	a4067g	3'LTR	c9006g

7.3 Reporterkonstrukte



CMVoriLuzi-Sequenz

```

1 ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgta aatTTTTgtt aaatcagctc
61 atTTTTtaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaaag aatagaccga
121 gatagggttg agtgttgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc cactacgtg aaccatcacc
241 ctaatcaagt tttttggggg cgaggtgccc taaagcacta aatcgggaac ctaaaggag
301 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaaag aagggagaa
361 agcgaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac
421 cacaccgccc gcgcttaatg cggcgctaca gggcgctccc cattcgccat tcaggctgcg
481 caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg
541 gggatgtgct gcaaggggat taagttgggt aacgccaggg ttttccagc cagcagcttg
601 taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg
661 gccctacgcg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat
721 tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg
781 gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa
841 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta tttacggtaa actgcccact
901 tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc cattgacgtc aatgacggta
961 aatggccccg ctggcattat gccagtaga tgacctatg ggactttcct acttggcagt
1021 acatctacgt attagtcate gctattacca tgggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg
1081 ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg
1141 ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc
1201 cattgacgca aatgggagggt aggcgtgtac ggtgggagggt ctataaaacc cgattgtatg
1261 ctccatctac tgagataggg aaaaaccgccc tcagggctgg aggtgggacc tgcgggcagc
1321 aatactgctt tghtaaagcac tgagatggtt atgtgtatgc atatctaaaa gcacagcact
1381 taatccttta cattgtctat gatgccaaaga cctttgttca cgtgttgtc tgcgtaccct
1441 ctccccacaa ttgtcttgtg accctgacac atccccctct ttgagaaaca cccacagatg
1501 atcaataaat actaagggaa ctcagaggct ggcgggatcc tccatattgct gaacgctggg
1561 tccccggttc ccttatttcc tttctctata ctttgtctct gtgtcttttt cttttccaaa
1621 tctctcgtcc caccttacga gaaacaccca caggtgtgta ggggcaacc acccctacat
1681 ctgggtgccc acgtggaggg ttttctctag ggtgaaggta cgctcgagcg tggctattga
1741 ggacaagtgc acgagagatc ccgagtacgt ctacagtcag ctttacgata agcttgtgcg
1801 ctcggaagaa gctaggggtga taatggggca aactaaaagt aaaattaaaa gtaaataatgc
1861 ctcttatctc agctttatta aaattctttt aaaaagaggg ggagttaaag tatctacaaa
1921 aaatctaata aagctatttc aaataataga acaatTTTgc ccatggtttc cagaacaagg
1981 aacttttagat ctaaagact ggaaaagaat tggttaaggaa ctaaaacaag caggtaggaa

```

2041 gggtaaatatc attccactta cagtatggaa tgattggggcc attattaaag cagctttaga
 2101 accatttcaa acagaagaag atagtgttcc agtttctgat gcccttggaa gctgtataat
 2161 agattgtaat gaaaagacaa ggaaaaaatc ccagaaagaa accgaaagtt tacattgcca
 2221 atatgtagca gagccagtaa tggctcagtc aacgcaaaat gttgactata atcaattaca
 2281 ggaggtgata tatcctgaaa cgttaaaatt agaaggaaaa ggtccagaat tagtggggcc
 2341 atcagagtct aaaccacgag gcacaagtcc tcttccagca ggtcaggtgc ccgtaacatt
 2401 acaacctcaa aagcaggtta aagaaaataa gacccaaccg ccagtagcct accaatactg
 2461 gccgccggct gaacttcagt atcggccacc cccagaaagt cagtatggat atccaggaat
 2521 gccccagca ccacagggca gggcgccata cctcagccg cccactagga gacttaatcc
 2581 tacggcacca cctagttagc agggtagtga attacatgaa attattgata aatcaagaaa
 2641 ggaaggagat actgaggcat ggcaattccc agtaacgta gaaccgatgc cacctggaga
 2701 aggagcccaa gagggagagc ctcccacagt tgaggccaga tacaagtctt tttcgataaa
 2761 aatgctaaaa gatatgaaag agggagtaaa acagtatgga cccaactccc cttatatgag
 2821 gacattatta gattccattg ctcatggaca tagactcatt ccttatgatt gggagattct
 2881 ggcaaaatcg tctctctcac cctctcaatt tttacaattt aagacttggg ggattgatgg
 2941 ggtacaagaa caggtccgaa gaaatagggc tgccaatcct ccagttaaca tagatgcaga
 3001 tcaactatta ggaataggtc aaaattggag tactattagt caacaagcat taatgcaaaa
 3061 tgaggccatt gagcaagtta gagctatctg ccttagagcc tgggaaaaaa tccaagacc
 3121 aggaagtacc tgcccctcat ttaatacagt aagacaaggt tcaaaagagc cctatcctga
 3181 ttttgtggca aggtccaag atgttgctca aaagtcaatt gccgatgaaa aagcccgtaa
 3241 ggtcatagtg gagttaatgg catatgaaaa cgccaatcct gagtgcatt cagccattaa
 3301 gccattaaaa ggaaaggttc ctgcaggatc agatgtaatc tcagaatatg taaaagcctg
 3361 tgatggaatc ggaggagcta tgcataaagc tatgcttatg gctcaagcaa taacaggagt
 3421 tgttttagga ggacaagtta gaacatttgg aggaaaatgt tataattgtg gtcaaattgg
 3481 tcaacttaaaa aagaattgcc cagtcttaaa caaacagaat ataactattc aagcaactac
 3541 aacaggtaga gagccacctg acttatgtcc aagatgtaaa aaaggaaaac attgggctag
 3601 tcaatgtcgt tctaatttgg ataaaaattg gcaaccattg tcgggaaacg agcaaaaggg
 3661 ccaagctcag gcccacaac aaactggggc attcccattt cagccatttg ttctcaggg
 3721 ttttcagggg caacaacccc cactgtccca agtgtttcag ggaataagcc agttaccaca
 3781 atacaacaat tgtccccgc cacaagcggc agtgcagcag tagatttatg tactatacaa
 3841 gcagtctctc tgcctccagg ggagccccc caaaaaatcc ctacaggtgt atatggcccc
 3901 ctgcctgagg ggactgtagg actaatcttg ggaagatcaa gtctaaatct aaaaggagtt
 3961 caaattcata ctagtgtggg tgattcagac tataaaggcg aaattcaatt ggttattagc
 4021 tcttcaattc cttggagtg cagtcagga gacaggattg ctcaattatt actcctgcca
 4081 tatattaagg gtggaaatag tgaataaaaa agaataggag ggcttggag cactgatccg
 4141 acaggaaagg ctgcatattg ggcaagtcag gtctcagaga acagacctgt gtgtaaggcc
 4201 attattcaag gaaaacagtt tgaaggggtg gtagacactg gagcagatgt ctctatcatt
 4261 gctttaaatc agtggccaaa aaattggcct aaacaaaagg ctgttacagg acttgtcggc
 4321 ataggcacag cctcagaagt gtatcaaagt acggagattt tacattgctt agggccagat
 4381 aatcaagaaa gtactgttca gccaatgatt acttcaattc ctcttaattc gtggggtcga
 4441 gatttattac aacaatgggg tgcggaaatc accatgcccg ctccattata tagccccacg
 4501 agtcaaaaaa tcatgacca gatgggatat ataccaggaa agggactagg gaaaaatgaa
 4561 gatggcatta aagttccagt tgaggctaaa ataaatcaa aaagagaagg aatagggtat
 4621 ccttttagg ggcggccact gtagagcctc ctaaaccat accattaact tggaaaacag
 4681 aaaaaccagt gtgggtaaat cagtggccgc taccaaaaca aaaactggag cctttacatt
 4741 ttttagcaaa tgaacagtt gaaaaggtc acattgaacc ttcggtctca gcttggatt
 4801 ctctgtgttt tgtaattcag aagaaatcag gcaaatggcg tatgttaact gacttaaggg
 4861 ctgtaaaccg cgtaattcaa cccatggggc ctctccaacc tgggttgccc tctccagcca
 4921 tgatcccaaa agattggcct ttaattataa ttgatctaaa ggattgcttt tttaccatcc
 4981 ctctggcaga gcaggattgt gaaaaatttg cctttactat accagccata aataataaag
 5041 aaccagccac caggtttcag tggaaagtgt taacctaggg aatgcttaat agtccaacta
 5101 tttgtcagac tttttaggt cgagctcttc aaccagttag agaaaagttt tcagactggt
 5161 atatcattca ttatattgat gatattttat gtgctgcaga aacgaaagat aaattaattg
 5221 actgttatac atttctgcaa gcagaggttg ccaatgctgg actggcaata gcatctgata
 5281 agatccaaac ctctactcct tttcattatt tagggatgca gatagaaaat agaaaaatta
 5341 agccacaaaa aatagaaata agaaaagaca cattaanaac actaaatgat tttcaaaaat
 5401 tactaggaga tattaattgg attcggccaa ctctaggcat tctacttat gccatgtcaa
 5461 atttgttctc tatcttaaga ggagactcag acttaaatag taaaagaatg ttaaccccag
 5521 aggcaacaaa agaaattaaa ttagtggaag aaaaaattca gtcagcaca ataaatagaa
 5581 tagatccctt agccccactc caacttttga tttttgccac tgcacattct ccaacaggca
 5641 tcattattca aaatactgat cttgtggagt ggtcattcct tctcacagt acagttaaga
 5701 cttttacatt gtacttggat caaatagcta cattaatcgg tcagacaaga ttacgaataa

5761 taaaattatg tgggaatgac ccagacaaaa tagttgtccc ttttaaccaag gaacaagtta
5821 gacaagcctt tatcaattct ggtgcatggc agattggtct tgctaatttt gtgggaatta
5881 ttgataacca ttacccaaaa acaagatct tccagttctt aaaattgact acttggattc
5941 tacctaaaat taccagacgt gaacctttag aaaatgctct aacagtattt actgatggtt
6001 ccagcaatgg aaaagcagct tacacagggc cgaaagaacg agtaatcaaa actccatatac
6061 aatcggtctca aagagcagag ttggttgcaag tcattacagt gttacaagat tttgaccagc
6121 ctatcaatat tatatcagat tctgcatatg tagtacaggc tacaagggat gttgagacag
6181 ctctaattaa atatagcatg gatgatcagt taaaccagct attcaattta ttacaacaaa
6241 ctgtaagaaa aagaaatttc ccattttata ttactcatat tcgagcacac actaatttac
6301 cagggccttt gactaaagca aatgaacaag ctgacttact ggtatcatct gcaactataa
6361 aagcacaaga acttcatgct ttgactcatg taaatgcagc aggattaaaa acaaaatttg
6421 atgtcacatg gaaacaggca aaagatattg tacaacattg caccagtggt caagtcttac
6481 acctgcccac tcaagaggca ggagttaatc ccagaggtct gtgtcctaata gcattatggc
6541 aaatggatgt cacacatgta ccttcatttg gaagattatc atatgttcat gtaacagttg
6601 atacttattc acatttcata tgggcaactt gccaaacagg agaaagtact tcccatgtta
6661 aaaaacattt attgtcttgt tttgctgtaa tgggagttcc agaaaaaatc aaaactgaca
6721 atggaccagg atattgtagt aaagctttcc aaaaattctt aagtcagtggt aaaatttcac
6781 atacaacagg aattccttat aattcccaag gacagggccat agttgaaaga actaatagaa
6841 cactcaaaac tcaattagtt aaacaaaaag aagggggaga cagtaaggag tgtaccactc
6901 ctcagatgca acttaatcta gcactctata ctttaaattt tttaaacatt tatagaaatc
6961 agactactac ttctgcagaa caacatctta ctggtaaaaa gaacagccca catgaaggaa
7021 aactaatttg gtggaaagat aataaaaaata agacatggga aataggggag gtgataacgt
7081 gggggagagg ttttgccttg gtttcaccag gagaaaatca gcttcctggt tggataccca
7141 ctagacattt gaagttctac aatgaaccca tcggagatgc aaagaaaagc acctccgagg
7201 agacggagac accgcaatcg agcaccgttg actcacaaga tgaacaaaat ggtgacgtca
7261 gaagaacaga tgaagttgcc atccaccaag aaggcagagc cgccgacttg ggcacaacta
7321 aagaagctga cgcagttagc tacaanaatg ctagagaaca caaaggtgac acaaacccca
7381 gagagtatgc tgctgcagc cttgatgatt gttatcaatg gggaaagtct cctatgcct
7441 gcaggagcag ctgcagctaa ctatacctac gggctcgtgag gctccggtgc ccgtcagtggt
7501 gcagagcgca catcgcccac agtccccgag aagttggggg gaggggctcg caattgatcc
7561 ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg atgtcgtgta ctggctccgc
7621 ctttttcccg aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt
7681 tttcgcaacg ggtttgccc cagaacacag gtaagtgcg tgtgtggttc ccgaggcctt
7741 ggctctttta cgggttatgg ccttgcgtg ccttgaatta cttccacctg gctccagtac
7801 gtgattcttg atcccagact ggagccaggg gcgggccttg cgcttttagga gcccttcgc
7861 ctgctgcttg agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgctgcca atctggtggc
7921 accttcgccc ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat ttttgatgac
7981 ctgctgagac gctttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggcccag gatctgcaca
8041 ctggtatctt ggttttttggg cccgcccggc gcgacggggc ccgtgctcc cagcgcacat
8101 gttcggcgag gcggggccc ctagcgcggc caccgagaat cggacggggg tagtctcaag
8161 ctggccggcc tgcctcgttg cctggcctcg cgccgcccgt tatcgccccg ccctgggccc
8221 caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt gagcgggaaag atggccgctt cccggccctg
8281 ctccaggggg ctcaaaatgg aggacgcggc gctcgggaga gcgggcccgt gactcacca
8341 cacaaaggaa aagggccttt ccgtcctcag ccgtcgtctt atgtgactcc acggagtacc
8401 gggcgccgct caggcacctc gattagttct gggacttttg gtagctctcg tctttaggtt
8461 ggggggaggg gttttatgag atggagtttc ccacactga gtgggtggag cttaagttta
8521 gggcagcttg gcacttgatg taattctcgt tggaaatttg cctttttgag tttggatctt
8581 ggttcattct caagcctcag acagtggttc aaagtttttt tcttccattt cagggtgctg
8641 gaacacgtgg tcgcccggc atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc cggcgccat
8701 tctatccgct ggaagatgga accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatagc
8761 ccctggttcc tggaaacaatt gcttttacag atgcacatat cgaggtggac atcacttacg
8821 ctgagtactt cgaatgttcc gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata
8881 caaatcacag aatcgtcgta tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg
8941 gcgcttatt tatcggagtt gcagttgcgc ccgcaacga catttataat gaacgtgaat
9001 tgctcaacag tatgggcatt tcgagccta ccgtgggtgt cgtttccaaa aaggggttgc
9061 aaaaaatttt gaacgtgcaa aaaaagctcc caatcatcca aaaaattatt atcatggatt
9121 ctaaaacgga ttaccagggg tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc
9181 ccggttttaa tgaatacagat tttgtgccc agtccctcga tagggacaag acaattgcac
9241 tgatcatgaa ctctctgga tctactggtc tgccctaaagg tgcgctctg cctcatagaa
9301 ctgctgctg gagattctcg catgcccagag atcctatctt tggcaatcaa atcattccgg
9361 atactgcatg ttttaagtgtt gttccattcc atcacggttt tggaaatggt actacactcg
9421 gatatttgat atgtggattt cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc

9481 tgaggagcct tcaggattac aagattcaaa gtgocgtgct ggtgccaacc ctattctcct
 9541 tcttcgcaa aagcactctg attgacaaat acgatttatac taatttacac gaaattgctt
 9601 ctgggtggcgc tcccctctct aaggaagtcg ggggaagcggg tgccaagagg tccatctgc
 9661 caggtatcag gcaaggatat gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg
 9721 aggggatga taaaccgggc gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaaggtg
 9781 tggatctgga taccgggaaa acgctggcg ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag
 9841 gtcctatgat tatgtccggg tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca
 9901 aggatggatg gctacattct ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca
 9961 tcgttgaccg cctgaagtct ctgattaagt acaaaggcta tcaggtggct cccgctgaat
 10021 tggaatccat cttgctccaa cacccecaaca tcttcgacgc aggtgtcgca ggtcttcccg
 10081 acgatgacgc cggtgaactt cccgcccgcg ttggtgtttt ggagcacgga aagacgatga
 10141 cggaaaaaga gatcgtggat tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcaaaa aagttgctgcg
 10201 gaggagttgt gtttgtggac gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa
 10261 aatcagaga gatcctcata aaggccaaga agggcggaaa gatcgcctg taaaccggctc
 10321 atgatgacga tgggtgtttt gtcgaaaaga aaagggggaa atgtggggaa aagcaagaga
 10381 gatcagattg tttactgtgtc tgtgtagaaa gaagtagaca taggagactc cattttgtta
 10441 tgtactaaga aaaattcttc tgccttgaga ttctgttaat ctatgacctt accccaacc
 10501 ccgtgctctc tgaacatgt gctgtgtcaa ctacagattg aatggattaa gggcggtgca
 10561 ggatgtgctt tgttaaacag atgcttgaag gcagcatgct ccttaagagt catcaccact
 10621 ccctaactc aagtaccag ggacacaaaa actgcggaag gccgcagggg cctctgccta
 10681 ggaaagccag gtattgtcca aggtttctcc ccatgtgata gtctgaaata tggcctcgtg
 10741 ggaagggaaa gacctgaccg tccccagcc cgacaccctg aaagggctc tgcctgaggag
 10801 gattagtata agaggaagga atgctctctg cagttgagac aagaggaagg catctgtctc
 10861 ctccctgtcc ctgggcaatg gaatgtctcg gtataaaacc cgattgtatg ctccatctac
 10921 tgagataggg aaaaaccgcc tcagggctgg aggtgggacc tgcgggcagc aatactgctt
 10981 tgtaaagcac tgagatgttt atgtgtatgc atatctaaaa gcacagcact taactcttta
 11041 cattgtctat gatgccaaga cctttgttca cgtgtttgtc tgcctgacct cctcccaaa
 11101 ttgtcttctg acctgacac atccccctct ttgagaaaca cccacagatg atcaataaat
 11161 actaagggaa ctcagaggct ggcgggatcc tccatagct gaacgctggg tccccggctc
 11221 cccttatttc tttctctata ctttgtctct gtgtcttttt cttttccaaa tctctcgtcc
 11281 caccttacga gaaacaccca caggtgtgta ggggcaacc acccctacac tctataattt
 11341 tcttacacct aaggtttatc ttttagactaa catatattga actctatgta aatcaaaact
 11401 aaacgtctgc atgtgtttgt gggcagacag gcggccgcca ccgcggtgc tccagctttt
 11461 gttcccttta gtgagggtta attgocgct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg
 11521 tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta
 11581 aagcctgggg tgcctaata gaagactaac tcacattaat tgcgttgccg tcaactgccc
 11641 ctttccagtc gggaaacctg tgcgtccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga
 11701 gacgcgtttt gcgtattggg cgtcttccg cttcctcgtc cactgactcg ctgcgctcgg
 11761 tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag
 11821 aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc
 11881 gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca
 11941 aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt
 12001 tccccctgg aagctccctc gtgocgtctc ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc
 12061 tgcctcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgttttctca tagctcacgc tgtaggtatc
 12121 tcagttcggg gtatgctcgt cgtccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc
 12181 ccgaccgctg cgccttatcc ggttaactatc gcttgagtc caaccggta agacagcact
 12241 tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcagggat gttagcgggtg
 12301 ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg
 12361 tctgcgtctc gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca
 12421 aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttggttgcaa gcagcagatt acgcgagaa
 12481 aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg
 12541 aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc
 12601 ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg
 12661 acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat
 12721 ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat accggagggc ttaccatctg
 12781 gccccagtgc tgcaatgata ccgagagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa
 12841 taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgctcca
 12901 tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgcccagt aatagtttgc
 12961 gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctgctgctt ggtatggctt
 13021 cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa
 13081 aagcggtag ctcttccggg cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat
 13141 cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct

13201 tttctgtgac tgggtgagtag tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga
 13261 gttgctcttg cccggcgtag ataccgggata ataccgagcc acatagcaga actttaaaag
 13321 tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctggtga
 13381 gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgacg ttcagcatct tttactttca
 13441 ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg
 13501 cgacacggaa atggtgaata ctcatactct tcccttttca atattattga agcatttatc
 13561 aggggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag
 13621 gggttccgcy cacatttccc cgaaaagtgc cac

CMVoriEGFP-Sequenz

1 ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgggta aatttttggt aatcagctc
 61 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aatcaaaag aatagaccga
 121 gataggggtg agtggtgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
 181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc
 241 ctaatcaagt tttttggggg cgaggtgccc taaagcacta aatcggaaacc ctaaagggag
 301 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggagaa
 361 agcgaagga gcggcgctc gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac
 421 cacaccgcc gcgcttaatg cgcgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcy
 481 caactgttg gaagggcgat cgggtgccc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg
 541 gggatgtgct gcaagggat taagttgggt aacgccaggg tttcccagt cacgacgttg
 601 taaaacgagc gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg
 661 gccctacgcy ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggctat
 721 tagttcatag cccatataat gagttccgcy ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg
 781 gctgaccgcy caacgacccc cggccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa
 841 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtgacta tttacggtaa actgcccact
 901 tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgcy aatgacggta
 961 aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt
 1021 acatctacgt attagtcacg gctattacca tgggtgatgcy gttttggcag tacatcaatg
 1081 ggcgtggata gcgggttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg
 1141 ggagtttggt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc
 1201 cattgacgca aatgggcygt aggcgtgtac ggtgggaggt ctataaaacc cgattgtatg
 1261 ctccatctac tgagataggg aaaaaccgcc tcagggctgg aggtgggacc tgcgggcagc
 1321 aatactgctt tgtaaagcac tgagatgttt atgtgtatgc atatctaaaa gcacagcact
 1381 taatccttta cattgtctat gatgccaaaga cctttgttca cgtggttgct tgctgaccct
 1441 ctccccacaa ttgtcttgcy accctgacac atccccctct ttgagaaaca cccacagatg
 1501 atcaataaat actaagggaa ctacagaggt ggcgggatcc tccatagct gaacgctggg
 1561 tccccgggtc cccttatttc tttctctata ctttgtctct gtgtcttttt cttttccaaa
 1621 tctctcgtcc caccttacga gaaacaccca cagggtgtgta ggggcaacc acccctacat
 1681 ctgggtgccc acgtggaggg ttttctctag ggtgaaggta cgtcagagcy tggctattga
 1741 ggacaagtcy acgagagatc ccgagtagct ctacagtcag ccttacggta agctgtgcy
 1801 ctcggaagaa gctagggtag taatggggca aactaaaagt aaaattaaa gtaaatgtgc
 1861 ctcttatctc agctttatta aattctttt aaaaagaggg ggagttaaag tatctacaaa
 1921 aatctaatc agctatttc aaataataga acaattttgc ccatggtttc cagaacaagg
 1981 aactttagat ctaaaagact ggaaaagaat tggtaaggaa ctaaaacaag caggtaggaa
 2041 gggtaatatc attccactta cagtaggaa tgattgggccc attattaaag cagctttaga
 2101 accatttcaa acagaagaag atagtgtttc agtttctgat gccctggaa gctgtataat
 2161 agattgtaat gaaaagacaa ggaaaaaatc ccagaaagaa accgaaagt tacattgcy
 2221 atatgtagca gagccagtaa tggctcagtc aacgcaaat gttgactata atcaattaca
 2281 ggaggtgata tatcctgaaa cgttaaaatt agaaggaaaa ggtccagaat tagtggggcc
 2341 atcagagtct aaaccacgag gcacaagtc tcttcagca ggtcaggtgc ccgtaacatt
 2401 acaacctcaa aagcaggtta aagaaaataa gacccaaccy ccagtagcct accaactcgy
 2461 gccgcccggct gaacttcagt atcggccacc cccagaaagt cagtaggat atccaggaat
 2521 gccccagca ccacagggca gggcgccata cctcagccy cccactagga gacttaatcc
 2581 tacggcacca cctagtagac agggtagtga attacatgaa attattgata aatcaagaaa
 2641 ggaaggagat actgaggtat ggcaattccc agtaacgtta gaaccgatgc cacctggaga
 2701 aggagcccaa gagggagagc ctcccacagt tgaggccaga tacaagtctt tttcgataaa
 2761 aatgctaaaa gatatgaaag agggagtaaa acagtaggaa cccaactccc cttatatgag
 2821 gacattatta gattccattg ctcatggaca tagactcatt ccttatgatt gggagattct
 2881 ggcaaaatcy tctctctcac cctctcaatt ttacaattt aagacttggg gattgaggy
 2941 ggtacaagaa caggtccgaa gaaatagggc tgccaatcct ccagttaaaca tagatgcaga

3001 tcaactatta ggaataggtc aaaattggag tactattagt caacaagcat taatgcaaaa
 3061 tgaggccatt gagcaagtta gagctatctg ccttagagcc tgggaaaaaa tccaagacct
 3121 aggaagtacc tgcccctcat ttaatacagt aagacaaggt tcaaaagagc cctatcctga
 3181 ttttgtggca aggctccaag atgttgctca aaagtcaatt gccgatgaaa aagccccgtaa
 3241 ggtcatagtg gagttaatgg catatgaaaa cgccaatcct gagtgtcaat cagccattaa
 3301 gccattaaaa ggaaagggtc ctgaggatc agatgtaatc tcagaatatg taaaagcctg
 3361 tgatggaatc ggaggagcta tgcataaagc tatgcttatg gctcaagcaa taacaggagt
 3421 tgttttagga ggacaagtta gaacatttgg aggaaaatgt tataattgtg gtcaaattgg
 3481 tcacttaaaa aagaattgcc cagtcttaaa caaacagaat ataactattc aagcaactac
 3541 aacaggtaga gaccacctg acttatgtcc aagatgtaaa aaaggaaaac attgggctag
 3601 tcaatgtcgt tctaaatttg ataaaaatgg gcaaccattg tcgggaaacg agcaaagggg
 3661 ccagcctcag gccccacaac aaactggggc attccaatt cagccatttg ttcctcaggg
 3721 ttttcagggg caacaacccc cactgtccca agtgtttcag ggaataagcc agttaccaca
 3781 atacaacaat tgtccccgc cacaagcggc agtgcagcag tagatttatg tactatacaa
 3841 gcagtctctc tgcttcagg ggagccccca caaaaaatcc ctacaggtgt atatggcccc
 3901 ctgcctgagg ggactgtagg actaatcttg ggaagatcaa gtctaaatct aaaaggagtt
 3961 caaattcata ctagtgtggt tgattcagac tataaaggcg aaattcaatt ggttattagc
 4021 tcttcaattc cttggagtg cagtccagga gacaggattg ctcaattatt actcctgcca
 4081 tatattaagg gtggaaatag tgaaataaaa agaataggag ggcttggag cactgatccg
 4141 acaggaaagg ctgcatattg ggcaagtcag gtctcagaga acagacctgt gtgtaaggcc
 4201 attattcaag gaaaacagtt tgaaggggtg gtagacactg gagcagatgt ctctatcatt
 4261 gctttaaatc agtggccaaa aaattggcct aaacaaaagg ctgttacagg acttgtcggc
 4321 ataggcacag cctcagaagt gtatcaaagt acgggagatt tacattgctt agggccagat
 4381 aatcaagaaa gtactgttca gccaatgatt acttcaattc ctcttaatct gtggggtcga
 4441 gatttattac aacaatgggg tgcggaatc accatgcccg ctccattata tagccccacg
 4501 agtcaaaaaa tcatgaccaa gatgggatat ataccaggaa agggactagg gaaaaatgaa
 4561 gatggcatta aagttccagt tgaggctaaa ataaatcaaa aaagagaagg aatggggtat
 4621 ccttttagg ggcggccact gttaggcctc ctaaaccat accattaact tggaaaacag
 4681 aaaaaccagt gtgggtaaat cagtggcgc taccaaaaca aaaactggag gctttacatt
 4741 tattagcaaa tgaacagtta gaaaagggc acattgaacc ttcgttctca ccttgggaatt
 4801 ctctgtgtt tgtaattcag aagaaatcag gcaaatggcg tatgttaact gacttaaggg
 4861 ctgtaaacgc cgtaattcaa cccatggggc ctctccaacc tgggttgccc tctccagcca
 4921 tgatcccaaa agattggcct ttaattataa ttgatctaaa ggattgcttt tttaccatcc
 4981 ctctggcaga gcaggattgt gaaaaatttg cctttactat accagccata aataataaag
 5041 aaccagccac caggtttcag tggaaagtgt tacctcaggg aatgcttaat agtccaacta
 5101 tttgtcagac tttttaggt cgagctcttc aaccagttag agaaaagttt tcagactggt
 5161 atatcattca ttatattgat gatattttat gtgctgcaga aacgaaagat aaattaattg
 5221 actgttatac atttctgcaa gcagaggttg ccaatgctgg actggcaata gcatctgata
 5281 agatccaaac ctctactcct tttcattatt tagggatgca gatagaaaat agaaaaatta
 5341 agccacaaaa aatagaaata agaaaagaca cattaanaac actaaatgat tttcaaaaat
 5401 tactaggaga tattaattgg attcggccaa ctctaggcat tctacttat gccatgtcaa
 5461 atttgttctc tatcttaaga ggagactcag acttaaatag taaaagaatg ttaaccacag
 5521 aggcaacaaa agaaattaaa ttagtggag aaaaaattca gtcagcacia ataaatagaa
 5581 tagatccctt agccccactc caacttttga tttttgccac tgcacattct ccaacaggca
 5641 tcattattca aaactatgat cttgtggagt ggtcattcct tctcacagt acagttaaga
 5701 cttttacatt ttacttggat caaatagcta cattaatcgg tcagacaaga tcagcaataa
 5761 taaaattatg tgggaatgac ccagacaaaa tagttgtccc ttaaccaag gaacaagtta
 5821 gacaagcctt tatcaattct ggtgcatggc agattggtct tgctaatttt gtgggaatta
 5881 ttgataacca ttaccacaaa acaagatct tccagttctt aaaattgact acttggattc
 5941 tacctaaaat taccagacgt gaacctttag aaaatgctct aacagtattt actgatgggt
 6001 ccagcaatgg aaaagcagct tacacagggc cgaaagaacg agtaatcaaa actccatctc
 6061 aatcggctca aagagcagag ttgggtgcag tcattacagt gttacaagat tttgaccagc
 6121 ctatcaatat tatatcagat tctgcatatg tagtacaggc tacaagggat gttgagacag
 6181 ctctaattaa atatagcatg gatgatcagt taaaccagct attcaattta ttacaacaaa
 6241 ctgtaagaaa aagaaatttc ccattttata ttactcatat tcgagcacac actaatttac
 6301 cagggccttt gactaaagca aatgaacaag ctgacttact ggtatcatct gactcataa
 6361 aagcacaaga acttcatgct ttgactcatg taaatgcagc aggattaaaa aacaaatttg
 6421 atgtcacatg gaaacaggca aaagatattg tacaacattg caccagtggt caagtcttac
 6481 acctgcccac tcaagaggca ggagttaatc ccagaggtct gtgtcctaat gcattatggc
 6541 aaatggatgt cacacatgta ctttcatttg gaagattatc atatgttcat gtaacagttg
 6601 atacttattc acatttcata tgggcaactt gccaaacag agaaagtact tccatgtta
 6661 aaaaacattt attgtcttgt tttgctgtaa tgggagttcc agaaaaaatc aaaactgaca

6721 atggaccagg atattgtagt aaagctttcc aaaaatttctt aagtcagtgg aaaatttcac
6781 atacaacagg aattccttat aattcccacg gacaggccat agttgaaaga actaatagaa
6841 cactcaaac tcaattagtt aaacaaaaag aagggggaga cagtaaggag tgtaccactc
6901 ctacagatgca acttaatacta gcactctata ctttaaattt tttaaacatt tatagaaatc
6961 agactactac ttctgcagaa caacatctta ctggtaaaaa gaacagccca catgaaggaa
7021 aactaatttg gtggaaagat aataaaaaata agacatggga aatagggag gtgataacgt
7081 gggggagagg ttttgcttgt gtttcaccag gagaaaatca gcttcctggt tggataacca
7141 ctagacattt gaagttctac aatgaacca tccggagatgc aaagaaaagc acctccgcgg
7201 agacggagac accgcaatcg agcaccgttg actcacaaga tgaacaaaat ggtgacgtca
7261 gaagaacaga tgaagttgcc atccaccaag aaggcagagc cgcgcacttg ggcacaacta
7321 aagaagctga cgcagttagc taaaaaatat ctagagaaca caaaggtgac acaaacccca
7381 gagagtatgc tgcttgagc cttgatgatt gtatcaatgg tggtaagtct ccctatgcct
7441 gcaggagcag ctgcagctaa ctatacctac cggctcgagct agcttcgtga ggctccggtg
7501 cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg
7561 gcaattgatc cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt
7621 actggctccg cctttttccc gaggggtggg gagaacgta tataagtgca gtagtcgccg
7681 tgaacgttct ttttcgcaac ggggttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc gtgtgtggtt
7741 cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg ccttgaatt acttccacct
7801 ggctccagta cgtgattctt gatcccagc tggagccagg ggcggcctt gcgctttagg
7861 agccccttcg cctcgtgctt gagttgagc ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg
7921 aatctggtgg caccttcgcg cctgtctcgc tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa
7981 tttttgatga cctgctgcca cgcttttttt ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca
8041 ggatctgcac actggtatctt cgggtttttgg gcccgcgccg ggcgacgggg cccgtgcgtc
8101 ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct gcgagcgcgg ccaccgagaa tccgacgggg
8161 gtagtctcaa gctggccggc ctgctctggt gcctggcctc gcgcccctgt gtatcgcccc
8221 gccctggggc gcaaggctgg cccggtcggc accagttgcg tgagcggaaa gatggccgct
8281 tcccggccct gctccagggg gctcaaaaat ggcagcgcgg cgctcgggag agcgggctgg
8341 ttagtccacc acacaaaagg aaagggcctt tccgtcctca gccgtcgtt catgtgactc
8401 cagggagtac cgggcgcccgt ccaggcacct cgattagttc tggagctttt ggagtacgtc
8461 gtcttttagt tggggggagg ggttttatgc gatggagttt cccacactg agtgggtgga
8521 gactgaagtt aggccagctt ggcacttgat gtaattctcg ttggaatttg ccctttttga
8581 gtttgatct tggttcattc tcaagcctca gacagtgggt caaagttttt ttcttccatt
8641 tcaggtgtcg tgaacacgtg gtgcgcccgc catggtgagc aagggcgagg agctgttcac
8701 cgggggtggtg cccatcctgg tgcagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt
8761 gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac
8821 caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca
8881 gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc
8941 cgaaggctac gtccaggagc gcacctctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccgg
9001 cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga
9061 cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa
9121 cgtctatata atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca
9181 caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg
9241 cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc acccagtcgg cctgagcaa
9301 agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgcccggat
9361 cactctcggc atggacgagc tgtacaagta actcgagaga tctggccggc tggggccgtt
9421 tccaaggtaa gcctatccct aacctctccc tccgtctcga ttctacgct accggctatg
9481 atgacgatgg tggttttgtc gaaaagaaaa gggggaaatg tggggaaaag caagagagat
9541 cagattgtta ctgtgtctgt gtagaaagaa gtagacatag gagactccat tttgttatgt
9601 actaagaaaa attcttctgc cttgagatct tgttaatacta tgaccttacc cccaaccccg
9661 tgctctctga aacatgtgct gtgtcaactc agagttgaat ggattaaggg cgggtgcagga
9721 tgtgctttgt taaacagatg cttgaaggca gcatgctcct taagagtcac caccactccc
9781 taatctcaag taccagggga cacaaaaact gcggaaggcc gcagggacct ctgcctagga
9841 aagccaggta ttgtccaagg tttctcccca tgtgatagtc tgaatatagg cctcgtggga
9901 agggaaagac ctgaccgtcc cccagcccga ccccgtaaa gggctctgtc tgaggaggat
9961 tagtataaga ggaaggaatg cctcttgagc ttgagacaag aggaaggcat ctgtctctc
10021 cctgtccctg ggcaatggaa tgtctcggta taaaaccoga ttgtatgctc catctactga
10081 gatagggaaa aaccgcctca gggctggagg tgggacctgc gggcagcaat actgctttgt
10141 aaagcactga gatgtttatg tgtatgcata tctaaaagca cagcacttaa tcctttacat
10201 tgtctatgat gccaaagacct ttgttcacgt gtttgtctgc tgaccctctc cccacaattg
10261 tcttgtgacc ctgacacatc cccctctttg agaaacaccc acagatgatc aataaatact
10321 aagggaaactc agaggctggc gggatcctcc atatgctgaa cgctggttcc ccggttcccc
10381 ttatttcttt ctctatactt tgtctctgtg tctttttctt ttccaaatct ctgctcccac

10441 cttacgagaa acacccacag gtgtgtaggg gcaacccacc cctacactct ataatthttct
10501 tacacctaag gtttatcttt agactaacat atattgaact ctatgtaaact caaaactaaa
10561 cgtctgcatg tgtttgtggg cagacagggc gccgccaccg cgggtgctcc agcttttgtt
10621 cccttttagtg agggttaatt gcgcgcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt
10681 gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaa
10741 cctggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt
10801 tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagac
10861 gcgttttgcy tattgggcgc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggtcg
10921 ttcggctgcy gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat
10981 caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggc aggaaccgta
11041 aaaaggccgc gttgctggcy tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa
11101 atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc
11161 cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt
11221 cgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca
11281 gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc
11341 accgctgcy cttatccggt aactatcgtc ttgagtcca cccggaaga cacgacttat
11401 cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta
11461 cagagttctt gaagtggty cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct
11521 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac
11581 aaaccaccgc tggtagcggg ggttttttgg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaa
11641 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tggaaacgaaa
11701 actcacgtta agggatthttg gtcatagagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt
11761 taaatthaaa atgaagthtt aatcaatct aaagtatata tgagthaaact tggctgaca
11821 gttaccaatg cthaatcagt gaggcacct tctcagcgt ctgtctatth cgttcatcca
11881 tagttgcctg actccccgct gtgtagataa ctacgatacy ggagggctta ccatctggcc
11941 ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagatth tcaagcaata
12001 accagccagc cggaaaggcc gagcgcagaa gtggctctgc aactthtacc gcctccatcc
12061 agtctatthaa ttggtgcccg gaagctagag taagtagttc gccagthaat agtttgcca
12121 acgthgthtgc cattgctaca ggcacgtyg tytcacgctc gtcgthtgg atggctcat
12181 tcagctccgg tthccaacga tcaaggcag tytcatgatc ccccatgthg tgcaaaaaag
12241 cggthtagctc thtcggctct cgcacgthg tcagaagthaa gthggccgca gthgthtacc
12301 tcatgthtth ggcagcactg cataatthct thactgtcat gccatccgta agatgcttht
12361 ctgtgactgg tgagthactca accaagthcat tctgagaata gthgthtgcg cgaccgagth
12421 gctctthgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact thaaaagthc
12481 tcatcattgg aaaacgthct tcggggcgaa aactctcaag gatctthacc ctgthgagat
12541 ccagthcagat gthaacccact cgtgcacca actgatcttc agcatcttht actthacca
12601 gcgthtctgg gthgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccc aaaaaaggga athaaggcga
12661 cacggaaatg thgaatactc atactctthc tthttcaata thattgagc atthtaccg
12721 gthattgtct catgagcggg tacataththg aatgthtth gaaaaataaa caaatagggg
12781 thccgcgcac atthccccg aaagthgcc

8 Abbildungsverzeichnis

Abb.Nr.	Abbildungname	Seite
1	Schematischer Aufbau einer TERS mit Messung auf einem Silizium-basierten Grid	4
2	Taxonomischer Stammbaum der Retroviren	8
3	Elektronenmikroskopische und schematische Abbildung eines reifen β -Retrovirus	9
4	Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Retroviren	11
5	Schematische Abbildung der RNA-basierten und Protein-basierten Immunität	20
6	Schematische Abbildung der Wirkung von akzessorischen Proteinen auf das virale Genom, sowie die Wirkung der viralen akzessorischen Proteine auf die Restriktionsenzyme	21
7	Schematische Abbildung der strukturellen Domänen von TRIM5 α	24
8	TRIM5 Isoformen, welche durch humane Zelllinien exprimiert werden	24
9	Teil aus der <i>Env</i> -Sequenz als Beispiel für den verwendeten Algorithmus	26
10	schematische Darstellung des Genoms von wt HERV-K113 und vom generierten ori HERV-K113 Konstrukt mit allen nicht synonymen Mutationen	27
11	Infektiösität von pseudotypisierten HERVs und SHIVs	28
12	Trägernetzchen mit verschiedenen großen Meshes	42
13	Schematische Abbildung des Beglimmungsprozess	45
14	Schematische Abbildung der Objektabbildung mit Negativkontrastierung	47
15	TEM-Aufnahmen der verschiedenen befilmten Si-Grids und des Pioloform-Grids	72
16	Bead- und ECTV-Auszählung auf Pioloform-Grids und Si-Grids	74

17	ECTV-Auszählung auf Pioloform-Grids und SiN-Grids nach Beglimmung	76
18	ECTV-Auszählung auf den SiN-Grids nach Beglimmung	78
19	ECTV-Auszählung auf den SiN-Grids mit unterschiedlichen Waschschritten	79
20	ECTV-Auszählung auf den SiN-Grids nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei der Präparation	81
21	ECTV-Partikel mittels TEM detektiert, re-lokalisiert im AFM und mittels TERS spezifiziert	83
22	Schematische Darstellung des Genoms der ori_st und CMVRU5 ori_st Konstrukten mit allen 17 synonymen revertierten Mutationen sowie einer LTR-Mutation	86
23	Detektion von Capsid-Expression in HERV-K113	87
24	RT-Aktivitäts-Bestimmung von HERV-K113 Moleklarklonen	88
25	TEM Aufnahme von ori, ori_st und CMVRU5 ori_st	89
26	Bestimmung der RT-Aktivität eines HERV-K113-Moleklarklons nach Infektion	90
27	Schematische Abbildung des Infektionsversuches mit den verschiedenen pseudotypisierten HERV-K113 Konstrukten	93
28	Repräsentative Luziferase-Aktivitäts-Messung von infizierten humanen Zellen	95
29	Repräsentative Luziferase-Aktivitäts-Messung von infizierten tierischen Zellen	97
30	Nachweis von zelleigenem TRIM5 α in unbehandelten Zellen	101
31	Transfektions- und Infektionsschema mit TRIM5 α oder Leervektor und oriLuzi/EnvVSV-G-Viren	102
32	Auswirkung der Luziferase-Aktivität auf oriLuzi/EnvVSV-G infizierte Zellen bei Transfektion mit hu bzw. rh TRIM5 α	104
33	Auswirkung von akzessorischen Proteinen auf die Luziferase-Aktivität von mit oriLuzi-Viren infizierten Zellen	10

9 Tabellenverzeichnis

Tab.Nr.	Tabellentitel	Seite
1	Geräteauflistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle	32
2	Materialienauflistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle	34
3	Chemikalien-, Enzym- und Größenstandardauflistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle	35
4	Antibiotikaaufliistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle	37
5	Puffer-, Lösungen- und Nährmedienauflistung mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung	37
6	Kitaufliistung mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle	38
7	Zelllinienauflistung mit Angabe zur Herkunft und ihrer jeweiligen Bezugsquelle	39
8	Konstruktaufliistung mit ihrem jeweiligen Vektor und Bezugsquelle	39
9	Antikörperaufliistung mit ihrer jeweiligen Spezies und Bezugsquelle	40
10	Softwareaufliistung mit der jeweiligen Bezugsquelle	41
11	Bedingungen und Komponenten für eine Amplifikations-PCR	51
12	Bedingungen und Komponenten für eine Multimutagenese-PCR	52
13	Bedingungen und Komponenten für eine Singlemutagenese-PCR	52
14	Bedingungen und Komponenten für eine Kolonie-PCR	53
15	Bedingungen und Komponenten für eine Sequenzierungs-PCR	54
16	Bedingungen und Komponenten für einen Restriktionsverdau mittels Endonukleasen	55
17	Bedingungen und Komponenten für einen Restriktionsverdau mittels Endonukleasen	56
18	Eukaryotische Zellen und ihr entsprechendes Medium	61
19	Konzentration der Zellen bei Infektion oder Transfektion in verschiedenen Kultivierungsgefäßen	63

20	Volumina eines Transfektionsansatzes in den jeweiligen Kultivierungsformaten	64
21	Plasmid-DNA Mix zur Herstellung pseudotypisierter HERV-Reporterviren	65
22	Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel	68
23	Revertierte synonyme postinsertionale Mutationen und LTR-Mutation	68
24	Namen der pseudotypisierte Viren und Einsatz von diesen Viren	92
25	Überblick über den Status deiner möglichen Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibition der getesteten Zelllinien nach Infektionsstudien mit den absoluten Steigerungsfaktoren	99
26	Überblick über mögliche Inhibition durch hu oder rh TRIM5 α der getesteten Zelllinien nach Überexpression von hu oder rh TRIM5 α mit den absoluten Steigerungs- bzw. Reduzierungsfaktoren	106
27	Übersicht über die getesteten akzessorischen Proteine, ihre Herkunft und ihren jeweiligen zellulären Antagonisten	107
28	Expression von Restriktionsfaktoren in den getesteten Zellen	122

10 Formelverzeichnis

Formelnr.	Formeltitel	Seite
1	Berechnung der Menge an DNA-Inserts	56
2	Berechnung der Konzentration von Zellen mit der Neubauer Zählkammer	62

11 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
®	Eingetragenes Warenzeichen
∞	unendlich
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin
A	Annealing
<i>A. bidest.</i>	Aqua bidestilata
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscopy</i>)
AK	Antikörper
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APOBEC3	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3</i>
APS	Ammoniumsulfat
AS	Aminosäure
B	B-Box-Domäne
BiGRUDI	Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung, ultraschnelle Detektion und Identifikation von bioterroristischen Agenten
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BST-2	<i>bone marrow stromal cell antigen 2</i>
CA	Capsidprotein
CaCl ₂	Calciumchlorid
CC	<i>coiled-coil</i> -Domäne

CCD	Calcit-Kompensationstiefe (<i>Calcite Compensation Depth</i>)
CIP	<i>calf interstine phosphatase</i>
CMC	Carboxy-Methylcellulose
D	Denaturierung
ddNTPs	2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Elongation
<i>E.coli</i>	<i>Escherischa coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminiscence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay</i>
EM	Elektronenmikroskop/ie
Env	Envelope Protein
ERV	Endogene Retroviren
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigungskonstante (=9,81m/s ²)
GA	Glutaraledehyd
Gag	<i>group specific antigen</i>
GPI	Glycosyphosphatidylinositol
h	Stunde
HBS	HEPES Buffer Saline
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HERV-K	Humanes Endogenes Retrovirus K
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
hSGT	<i>human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein</i>
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase
<i>in vitro</i>	im Glas
<i>in vivo</i>	im Lebendigen
JSRV	Jaagsiekte Schaft-Retrovirus
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
Luzi	<i>Firefly-Luciferase</i>
M	Masseinheit für die molare Masse
MA	Matrixprotein
min	Minute
ml	Milliliter
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
MOI	Multiplizität der Infektionen
N.A.	numerische Apertur
n.p.	nicht publiziert
n.p. Si-Grid	auf nicht porösen Silizium basierendes Grid
NaOH	Natriumhydroxyd
NC	Nukleocapsid
NEB	New England Biolabs
NK	Negativkontrolle
nt	Nukleotid/e
OD	Optische Dichte

oriEGFP/EnvΔKS-Viren	mit EnvΔKS pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren
oriEGFP/EnvVSV-G-Viren	mit EnvVSV-G pseudotypisierte CMVoriEGFP-Viren
oriLuzi/EnvΔC-Viren	mit EnvΔC pseudotypisierte CMVoriLuzi-Viren
oriLuzi/EnvΔKS-Viren	mit EnvΔKS pseudotypisierte CMVoriLuzi-Viren
oriLuzi/EnvVSV-G-Viren	mit EnvVSV-G pseudotypisierte CMVoriLuzi-Viren
PB	Primer-Bindungsstelle
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
P-E-P-E-Inhibitor	Post-Entry-Prä-Expressions-Inhibitor
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i>
PK	Positivkontrolle
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger</i>
Pol	Polymerase
PP	Polypurinstellen
PR	Protease
Pro	Protease
PTA	Phosphowolframsäure
R	Ring-Finger-Domäne
Rec	<i>regulator of expression encoded by corf</i>
RELIK	<i>rabbid endogenous lentivirus type K</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rpm	Rotation pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RTemp	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i>

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung
SHIV	Simian-Human-Immundefizienz-Virus
Si-Grid	auf Silizium basierendes Grid
SiN-Grid	auf Siliziumnitrid basierendes Grid
SiO ₂ -Grid	auf Siliziumdioxid basierendes Grid
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
ss	einzelsträngig
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAR	<i>trans-activation response</i>
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronemikroskop/ie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Temp	Temperatur
TERS	Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (<i>tip-enhanced Raman spectroscopy</i>)
™	<i>Trademark</i>
TMV	Tabak-Mosaik-Virus
TREX1	<i>Three prime repair exonuclease 1</i>
TRIM5	<i>Tripartite motif-containing protein 5</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
UA	Uranylacetat-Dihydrat
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation
Wt	Wildtyp
ZBS	Zentrum für biologische Sicherheit

12 Literatur

1. Curry, A., H. Appleton, and B. Dowsett, *Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future*. *Micron*, 2006. 37(2): p. 91-106.
2. Brenner, S. and R.W. Horne, *A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses*. *Biochim Biophys Acta*, 1959. 34: p. 103-10.
3. Harris, R.a.H., R., *Negative Staining*, in *Oxford: IRL Press*1991. p. 203-232.
4. Miller, S.E., *Detection and identification of viruses by electron microscopy*. *J of Electron Microsc Tech*, 1986. 4: p. 265-301.
5. Laue, M. and N. Bannert, *Detection limit of negative staining electron microscopy for the diagnosis of bioterrorism-related micro-organisms*. *J Appl Microbiol*, 2010. 109(4): p. 1159-68.
6. Gentile, M. and H.R. Gelderblom, *Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy*. *New Microbiol*, 2005. 28(1): p. 1-12.
7. Hazelton, P.R. and H.R. Gelderblom, *Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations*. *Emerg Infect Dis*, 2003. 9(3): p. 294-303.
8. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 1971. 8(9): p. 871-4.
9. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
10. Maiman, T.H., *Stimulated Optical Radiation in Ruby*. *Nature*, 1960. 187(4736): p. 493-494.
11. Gardiner, D.J., *Practical Raman spectroscopy*. 1989: Springer-Verlag.
12. Moore, B.D., Stevenson, L., Watt, A., Flitsch, S., Turner, N.J., Cassidy, C. and Graham, D., *Rapid and ultra-sensitive determination of enzyme activities using surface-enhanced resonance Raman scattering*. *Nature Biotechnology*, 2004. 22: p. 1133-1138.
13. Kustner, B., et al., *SERS labels for red laser excitation: silica-encapsulated SAMs on tunable gold/silver nanoshells*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. 48(11): p. 1950-3.
14. Jackson, J.B. and N.J. Halas, *Surface-enhanced Raman scattering on tunable plasmonic nanoparticle substrates*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(52): p. 17930-5.
15. Blackie, E.J., E.C. Le Ru, and P.G. Etchegoin, *Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules*. *J Am Chem Soc*, 2009. 131(40): p. 14466-72.
16. Blackie, E.J.L.R., Eric C.; Meyer, Matthias; Etchegoin, Pablo G., *Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study*. *J. Phys. Chem.*, 2007. 111 (37): 13794–13803.

17. Shanmukh, S., et al., *Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate*. Nano Lett, 2006. 6(11): p. 2630-6.
18. Le Ru, E.C.M., Matthias; Etchegoin, Pablo G. , *Proof of Single-Molecule Sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by Means of a Two-Analyte Technique*. J. Phys. Chem., 2006. 110 (4): 1944–1948.
19. Nie, S. and S.R. Emory, *Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*. Science, 1997. 275(5303): p. 1102-6.
20. Binnig, G.Q., C. F., *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 1986. 56 (9): 930–933.
21. Steidtner, J. and B. Pettinger, *Tip-enhanced Raman spectroscopy and microscopy on single dye molecules with 15 nm resolution*. Phys Rev Lett, 2008. 100(23): p. 236101.
22. Hermann, P., et al., *Evaluation of tip-enhanced Raman spectroscopy for characterizing different virus strains*. Analyst, 2011. 136(6): p. 1148-52.
23. Bohme, R., et al., *Biochemical imaging below the diffraction limit--probing cellular membrane related structures by tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS)*. J Biophotonics, 2010. 3(7): p. 455-61.
24. Cialla, D., Deckert-Gaudig, T., Budich, C., Laue, M., Möller, R., Naumann, D., Deckert, V. and Popp, J., *Raman to the limit: tip-enhanced Raman spectroscopic investigations of a single tobacco mosaic virus*. J Raman Spectroscopy, 2008. 39(0, 40): p. 240-243.
25. Bailo, E. and V. Deckert, *Tip-enhanced Raman spectroscopy of single RNA strands: towards a novel direct-sequencing method*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. 47(9): p. 1658-61.
26. Neugebauer, U., et al., *On the way to nanometer-sized information of the bacterial surface by tip-enhanced Raman spectroscopy*. Chemphyschem, 2006. 7(7): p. 1428-30.
27. Block, S.M., *The growing threat of biological weapons*. American Scientist, 2001. 89:1(28).
28. Laue, M., B. Niederwohrmeier, and N. Bannert, *Rapid diagnostic thin section electron microscopy of bacterial endospores*. J Microbiol Methods, 2007. 70(1): p. 45-54.
29. Lane, H.C., J.L. Montagne, and A.S. Fauci, *Bioterrorism: a clear and present danger*. Nat Med, 2001. 7(12): p. 1271-3.
30. Sapsford, K.E., Bradburne, C., Delehanty, J.B. and Medintz, I.I., *Sensors for detecting biological agents*. Materialstoday, 2008. 11(3): p. 38-49.
31. Kukreja R, S.B., *Botulinum Neurotoxins: Structure and Mechanism of Action*. Caister Academic Press, 2009. Microbial Toxins: Current Research and Future Trends.
32. Montecucco, C. and J. Molgo, *Botulinum neurotoxins: revival of an old killer*. Curr Opin Pharmacol, 2005. 5(3): p. 274-9.
33. Arnon, S.S., et al., *Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management*. JAMA, 2001. 285(8): p. 1059-70.
34. Ellermann V., B.O., *Experimentelle Leukämie bei Hühnern*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig., 1908. 46: 595–609.

35. Rous, P., *A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells*. J Exp Med, 1911. 13(4): p. 397-411.
36. Bittner, J.J., *Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice*. Science, 1936. 84(2172): p. 162.
37. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(12): p. 7415-9.
38. Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma, *A retrovirus from human leukemia cell lines: its isolation, characterization, and implication in human adult T-cell leukemia (ATL)*. Princess Takamatsu Symp, 1982. 12: p. 285-94.
39. Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma, *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, 1982. 79(6): p. 2031-5.
40. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. 220(4599): p. 868-71.
41. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, 1970. 226(5252): p. 1211-3.
42. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. Nature, 1970. 226(5252): p. 1209-11.
43. MH, V.R., *On the relative merits of italics, Latin and binomial nomenclature in virus taxonomy*. Arch. Virol. , 2000. 145: 433-441.
44. Katzourakis, A., et al., *Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(15): p. 6261-5.
45. Gelderblom, H.R., et al., *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins*. Virology, 1987. 156(1): p. 171-6.
46. Lu, M., S.C. Blacklow, and P.S. Kim, *A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein*. Nat Struct Biol, 1995. 2(12): p. 1075-82.
47. Morrow, C.D., et al., *New approaches for mucosal vaccines for AIDS: encapsidation and serial passages of poliovirus replicons that express HIV-1 proteins on infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. 10 Suppl 2: p. S61-6.
48. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu*. Nature, 2008. 451(7177): p. 425-30.
49. Gramberg, T., N. Sunseri, and N.R. Landau, *Accessories to the crime: recent advances in HIV accessory protein biology*. Curr HIV/AIDS Rep, 2009. 6(1): p. 36-42.
50. Greene, W.C., *The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection*. N Engl J Med, 1991. 324(5): p. 308-17.
51. Cann, A.J. and J. Karn, *Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle*. AIDS, 1989. 3 Suppl 1: p. S19-34.

52. McCune, W.J., E.L. Matteson, and A. MacGuire, *Evaluation of knee pain*. Prim Care, 1988. 15(4): p. 795-808.
53. Klasse, P.J., R. Bron, and M. Marsh, *Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. 34(1): p. 65-91.
54. Moore, J.P. and M. Stevenson, *New targets for inhibitors of HIV-1 replication*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. 1(1): p. 40-9.
55. Preston, D.R. and S.R. Farrah, *Activation thermodynamics of virus adsorption to solids*. Appl Environ Microbiol, 1988. 54(11): p. 2650-4.
56. Williams, K.J. and L.A. Loeb, *Retroviral reverse transcriptases: error frequencies and mutagenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. 176: p. 165-80.
57. Temin, H.M., *Retrovirus variation and evolution*. Genome, 1989. 31(1): p. 17-22.
58. Derse, D., et al., *Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses*. J Virol, 2007. 81(12): p. 6731-41.
59. Stevenson, M., et al., *Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products*. J Virol, 1990. 64(5): p. 2421-5.
60. Lower, R., et al., *Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K*. J Virol, 1995. 69(1): p. 141-9.
61. Lower, R., J. Lower, and R. Kurth, *The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(11): p. 5177-84.
62. Hughes, J.F. and J.M. Coffin, *Human endogenous retrovirus K solo-LTR formation and insertional polymorphisms: implications for human and viral evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(6): p. 1668-72.
63. Stoye, J.P., *Endogenous retroviruses: still active after all these years?* Curr Biol, 2001. 11(22): p. R914-6.
64. Van Nie, R., A.A. Verstraeten, and J. De Moes, *Genetic transmission of mammary tumour virus by GR mice*. Int J Cancer, 1977. 19(3): p. 383-90.
65. Boeke, J.D. and J.P. Stoye, *Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
66. Gifford, R. and M. Tristem, *The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses*. Virus Genes, 2003. 26(3): p. 291-315.
67. Bannert, N. and R. Kurth, *The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. 7: p. 149-73.
68. Jern, P., G.O. Sperber, and J. Blomberg, *Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy*. Retrovirology, 2005. 2: p. 50.

69. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. *Retrovirology*, 2006. 3: p. 67.
70. Katzourakis, A., V. Pereira, and M. Tristem, *Effects of recombination rate on human endogenous retrovirus fixation and persistence*. *J Virol*, 2007. 81(19): p. 10712-7.
71. Kalter, S.S., et al., *Brief communication: C-type particles in normal human placentas*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. 50(4): p. 1081-4.
72. Bierwolf, D., et al., *[C-type-like particles in normal human placentas (author's transl)]*. *Arch Geschwulstforsch*, 1975. 45(7): p. 628-33.
73. Holmes, E.C., *Ancient lentiviruses leave their mark*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(15): p. 6095-6.
74. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 2001. 409(6822): p. 860-921.
75. Gifford, R.J., *Evolution at the host-retrovirus interface*. *Bioessays*, 2006. 28(12): p. 1153-6.
76. Arnaud, F., et al., *Coevolution of endogenous betaretroviruses of sheep and their host*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. 65(21): p. 3422-32.
77. Gifford, R., et al., *Evolution and distribution of class II-related endogenous retroviruses*. *J Virol*, 2005. 79(10): p. 6478-86.
78. Belshaw, R., et al., *Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(14): p. 4894-9.
79. Turner, G., et al., *Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans*. *Curr Biol*, 2001. 11(19): p. 1531-5.
80. Tristem, M., *Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database*. *J Virol*, 2000. 74(8): p. 3715-30.
81. Johnson, W.E. and J.M. Coffin, *Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(18): p. 10254-60.
82. Bollag, R.J., et al., *Formation of heteroduplex DNA during mammalian intrachromosomal gene conversion*. *Mol Cell Biol*, 1992. 12(4): p. 1546-52.
83. Landry, J.R., D.L. Mager, and B.T. Wilhelm, *Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes*. *Trends Genet*, 2003. 19(11): p. 640-8.
84. Landry, J.R. and D.L. Mager, *Functional analysis of the endogenous retroviral promoter of the human endothelin B receptor gene*. *J Virol*, 2003. 77(13): p. 7459-66.
85. Wootton, S.K., et al., *Lung cancer induced in mice by the envelope protein of jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) closely resembles lung cancer in sheep infected with JSRV*. *Retrovirology*, 2006. 3: p. 94.
86. Zavala, G., et al., *Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus*. *Virology*, 2003. 312(1): p. 95-105.

87. Mahieux, R. and A. Gessain, *HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma*. Rev Clin Exp Hematol, 2003. 7(4): p. 336-61.
88. Albrecht, B. and M.D. Lairmore, *Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. 66(3): p. 396-406, table of contents.
89. Boller, K., et al., *Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV*. Virology, 1993. 196(1): p. 349-53.
90. Faff, O., et al., *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, 1992. 73 (Pt 5): p. 1087-97.
91. Oksche, A., et al., *Evidence for downregulation of the endothelin-B-receptor by the use of fluorescent endothelin-1 and a fusion protein consisting of the endothelin-B-receptor and the green fluorescent protein*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. 36(5 Suppl 1): p. S44-7.
92. Barth, R.F., et al., *Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival and cure following blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of sodium borocaptate and boronophenylalanine*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. 47(1): p. 209-18.
93. Lower, R., *The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies*. Trends Microbiol, 1999. 7(9): p. 350-6.
94. Contreras-Galindo, R., et al., *Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer*. J Virol, 2008. 82(19): p. 9329-36.
95. al-Sumidaie, A.M., et al., *Retroviruses in human breast cancer: detection of reverse transcriptase in human monocytes*. J R Coll Surg Edinb, 1988. 33(3): p. 151-3.
96. Denner, J., *Transspecies transmissions of retroviruses: new cases*. Virology, 2007. 369(2): p. 229-33.
97. Boese, A., et al., *Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein*. Oncogene, 2000. 19(38): p. 4328-36.
98. Hanke, K., et al., *The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT)*. Int J Cancer, 2013. 132(3): p. 556-67.
99. Krzyształowska-Wawrzyniak, M., et al., *The distribution of human endogenous retrovirus K-113 in health and autoimmune diseases in Poland*. Rheumatology (Oxford), 2011. 50(7): p. 1310-4.
100. Christensen, T., *Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses*. Rev Med Virol, 2005. 15(3): p. 179-211.
101. Perron, H., et al., *Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(14): p. 7583-8.

102. Burmeister, T., et al., *Insertional polymorphisms of endogenous HERV-K113 and HERV-K115 retroviruses in breast cancer patients and age-matched controls*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2004. 20(11): p. 1223-9.
103. Samuelson, L.C., R.S. Phillips, and L.J. Swanberg, *Amylase gene structures in primates: retroposon insertions and promoter evolution*. Mol Biol Evol, 1996. 13(6): p. 767-79.
104. Bannert, N. and R. Kurth, *Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101 Suppl 2: p. 14572-9.
105. Mangeney, M., et al., *Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(51): p. 20534-9.
106. Blond, J.L., et al., *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, 2000. 74(7): p. 3321-9.
107. Bieche, I., et al., *Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element*. Biol Reprod, 2003. 68(4): p. 1422-9.
108. Mi, S., et al., *Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis*. Nature, 2000. 403(6771): p. 785-9.
109. Kurth, R., Löwer, R., Löwer, J., Harzmann, R., Pfeifer, R., Schmidt, C.G., Fogh, J., Frank, H., *Oncornavirus synthesis in human teratocarcinoma cultures and an increased antiviral immune reactivity in corresponding patients*, in *Viruses in Naturally Occurring Cancers Conferences on Cell Proliferation*1980: Cold Spring Harbor
110. Lower, J., et al., *Retrovirus particle production in three of four human teratocarcinoma cell lines*. Haematol Blood Transfus, 1981. 26: p. 541-4.
111. Ono, M., M. Kawakami, and H. Ushikubo, *Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D*. J Virol, 1987. 61(6): p. 2059-62.
112. Ono, M., et al., *Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome*. J Virol, 1986. 60(2): p. 589-98.
113. Callahan, R., et al., *Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. 79(18): p. 5503-7.
114. Medstrand, P. and D.L. Mager, *Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family*. J Virol, 1998. 72(12): p. 9782-7.
115. de Parseval, N. and T. Heidmann, *Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes*. Cytogenet Genome Res, 2005. 110(1-4): p. 318-32.
116. Macfarlane, C. and P. Simmonds, *Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations*. J Mol Evol, 2004. 59(5): p. 642-56.
117. Reus, K., et al., *HERV-K(OLD): ancestor sequences of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2)*. J Virol, 2001. 75(19): p. 8917-26.

118. Belshaw, R., et al., *High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection*. Mol Biol Evol, 2005. 22(4): p. 814-7.
119. Beimforde, N., et al., *Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113*. Virology, 2008. 371(1): p. 216-25.
120. Moyes, D.L., et al., *The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease*. Genomics, 2005. 86(3): p. 337-41.
121. Heslin, D.J., et al., *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, 2009. 83(2): p. 1105-14.
122. Hanke, K., et al., *Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain*. J Virol, 2009. 83(24): p. 12790-800.
123. Lee, Y.N. and P.D. Bieniasz, *Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus*. PLoS Pathog, 2007. 3(1): p. e10.
124. Dewannieux, M., et al., *Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements*. Genome Res, 2006. 16(12): p. 1548-56.
125. Magin, C., R. Lower, and J. Lower, *cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K*. J Virol, 1999. 73(11): p. 9496-507.
126. Lower, R., et al., *Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses*. J Gen Virol, 1984. 65 (Pt 5): p. 887-98.
127. Roulston, A., R.C. Marcellus, and P.E. Branton, *Viruses and apoptosis*. Annu Rev Microbiol, 1999. 53: p. 577-628.
128. Alwine, J.C., *Modulation of host cell stress responses by human cytomegalovirus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. 325: p. 263-79.
129. Ding, S.W. and O. Voinnet, *Antiviral immunity directed by small RNAs*. Cell, 2007. 130(3): p. 413-26.
130. Yan, N. and Z.J. Chen, *Intrinsic antiviral immunity*. Nat Immunol, 2012. 13(3): p. 214-22.
131. Patton, J.T., R. Vasquez-Del Carpio, and E. Spencer, *Replication and transcription of the rotavirus genome*. Curr Pharm Des, 2004. 10(30): p. 3769-77.
132. Jayaram, H., M.K. Estes, and B.V. Prasad, *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. Virus Res, 2004. 101(1): p. 67-81.
133. Mallery, D.L., et al., *Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(46): p. 19985-90.
134. Sheehy, A.M., et al., *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein*. Nature, 2002. 418(6898): p. 646-50.
135. Sheehy, A.M., N.C. Gaddis, and M.H. Malim, *The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif*. Nat Med, 2003. 9(11): p. 1404-7.

136. Lovsin, N. and B.M. Peterlin, *APOBEC3 proteins inhibit LINE-1 retrotransposition in the absence of ORF1p binding*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1178: p. 268-75.
137. Chiu, Y.L., et al., *High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(42): p. 15588-93.
138. Esnault, C., et al., *APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses*. Nature, 2005. 433(7024): p. 430-3.
139. Ishikawa, J., et al., *Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth*. Genomics, 1995. 26(3): p. 527-34.
140. Neil, S.J., et al., *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, 2007. 2(3): p. 193-203.
141. Goldstone, D.C., et al., *HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase*. Nature, 2011. 480(7377): p. 379-82.
142. Lahouassa, H., et al., *SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates*. Nat Immunol, 2012. 13(3): p. 223-8.
143. Laguette, N., et al., *Evolutionary and functional analyses of the interaction between the myeloid restriction factor SAMHD1 and the lentiviral Vpx protein*. Cell Host Microbe, 2012. 11(2): p. 205-17.
144. Laguette, N., et al., *SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx*. Nature, 2011. 474(7353): p. 654-7.
145. Hrecka, K., et al., *Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein*. Nature, 2011. 474(7353): p. 658-61.
146. Berger, A., et al., *SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutieres syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection*. PLoS Pathog, 2011. 7(12): p. e1002425.
147. Cascalho, M. and J.L. Platt, *Novel functions of B cells*. Crit Rev Immunol, 2007. 27(2): p. 141-51.
148. Le Page, C., et al., *Interferon activation and innate immunity*. Rev Immunogenet, 2000. 2(3): p. 374-86.
149. Hilleman, M.R., *Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101 Suppl 2: p. 14560-6.
150. Garg, H., J. Mohl, and A. Joshi, *HIV-1 induced bystander apoptosis*. Viruses, 2012. 4(11): p. 3020-43.
151. Klase, Z., et al., *HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression*. Retrovirology, 2009. 6: p. 18.
152. Ouellet, D.L., et al., *Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(7): p. 2353-65.

153. Stopak, K., et al., *HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability*. Mol Cell, 2003. 12(3): p. 591-601.
154. Fujita, M., et al., *SAMHD1-Dependent and -Independent Functions of HIV-2/SIV Vpx Protein*. Front Microbiol, 2012. 3: p. 297.
155. Muthumani, K., et al., *The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1*. Nat Cell Biol, 2006. 8(2): p. 170-9.
156. Bukrinsky, M. and A. Adzhubei, *Viral protein R of HIV-1*. Rev Med Virol, 1999. 9(1): p. 39-49.
157. Stumptner-Cuvelette, P., et al., *HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(21): p. 12144-9.
158. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein*. Nat Med, 1996. 2(3): p. 338-42.
159. Garcia, J.V. and A.D. Miller, *Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef*. Nature, 1991. 350(6318): p. 508-11.
160. Leavy, O., *Antiviral immunity: SAMHD1--stopping HIV in its tracks*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(7): p. 440.
161. Ozato, K., et al., *TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(11): p. 849-60.
162. Reymond, A., et al., *The tripartite motif family identifies cell compartments*. EMBO J, 2001. 20(9): p. 2140-51.
163. Reddy, B.A., L.D. Etkin, and P.S. Freemont, *A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins*. Trends Biochem Sci, 1992. 17(9): p. 344-5.
164. Sardiello, M., et al., *Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties*. BMC Evol Biol, 2008. 8: p. 225.
165. Ponting, C., J. Schultz, and P. Bork, *SPRY domains in ryanodine receptors (Ca(2+)-release channels)*. Trends Biochem Sci, 1997. 22(6): p. 193-4.
166. Battivelli, E., et al., *Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms*. J Virol, 2011. 85(15): p. 7828-35.
167. Thierry-Mieg, D. and J. Thierry-Mieg, *AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation*. Genome Biol, 2006. 7 Suppl 1: p. S12 1-14.
168. Kirchhoff, F., *Optimale" Anpassung pandemischer HIV-1-Stämme an den Menschen*. BIOSpektrum. 2, 2010: p. S. 144-148.
169. Tokarev, A., et al., *Antiviral activity of the interferon-induced cellular protein BST-2/tetherin*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009. 25(12): p. 1197-210.
170. Zhang, K.L., et al., *Model structure of human APOBEC3G*. PLoS One, 2007. 2(4): p. e378.

171. Cullen, B.R., *Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors*. J Virol, 2006. 80(3): p. 1067-76.
172. Nakayama, E.E. and T. Shioda, *Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha*. Rev Med Virol, 2010. 20(2): p. 77-92.
173. Li, X. and J. Sodroski, *The TRIM5alpha B-box 2 domain promotes cooperative binding to the retroviral capsid by mediating higher-order self-association*. J Virol, 2008. 82(23): p. 11495-502.
174. Stremmlau, M., et al., *Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(14): p. 5514-9.
175. Sebastian, S. and J. Luban, *TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid*. Retrovirology, 2005. 2: p. 40.
176. Wu, X., et al., *Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(19): p. 7465-70.
177. Berthou, L., et al., *Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(41): p. 14849-53.
178. Kaiser, S.M., H.S. Malik, and M. Emerman, *Restriction of an extinct retrovirus by the human TRIM5alpha antiviral protein*. Science, 2007. 316(5832): p. 1756-8.
179. Ohkura, S., et al., *All three variable regions of the TRIM5alpha B30.2 domain can contribute to the specificity of retrovirus restriction*. J Virol, 2006. 80(17): p. 8554-65.
180. Yap, M.W., S. Nisole, and J.P. Stoye, *A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction*. Curr Biol, 2005. 15(1): p. 73-8.
181. Lee, K. and V.N. KewalRamani, *In defense of the cell: TRIM5alpha interception of mammalian retroviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(29): p. 10496-7.
182. Yap, M.W., et al., *Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(29): p. 10786-91.
183. Hatziioannou, T., et al., *Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(29): p. 10774-9.
184. Keckesova, Z., L.M. Ylinen, and G.J. Towers, *The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(29): p. 10780-5.
185. George, M., et al., *Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element*. Retrovirology, 2011. 8: p. 30.
186. Bannert, N., *Is a novel human retrovirus associated with prostate cancer and chronic fatigue syndrome?* Future Microbiol, 2010. 5(5): p. 689-91.
187. Helseth, E., et al., *Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants*. J Virol, 1990. 64(5): p. 2416-20.

188. Hofmann, W., et al., *Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection*. J Virol, 1999. 73(12): p. 10020-8.
189. Lang, R.D., M.V. Nermut, and L.D. Williams, *Ultrastructure of sheep erythrocyte plasma membranes and cytoskeletons bound to solid supports*. J Cell Sci, 1981. 49: p. 383-99.
190. Biel, S.S. and H.R. Gelderblom, *Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method*. J Clin Virol, 1999. 13(1-2): p. 105-19.
191. Preusser, H.J., *Biologische Objekte im Transmissions-Elektronenmikroskop (Teil 3): Die Negativkontrastierung*. 1882, Darmstadt: KONTAKTE (Merck).
192. Linz, U. and H. Degenhardt, *[Polymerase chain reaction: an overview]*. Naturwissenschaften, 1990. 77(11): p. 515-30.
193. Linz, U., U. Delling, and H. Rubsamen-Waigmann, *Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction*. J Clin Chem Clin Biochem, 1990. 28(1): p. 5-13.
194. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
195. Hall, T.A., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids. Symp. Ser., 1999. 41:95-98.
196. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 2nd edition 1989, Cold Spring harbour laboratory, New York.
197. Chen, C.A. and H. Okayama, *Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA*. Biotechniques, 1988. 6(7): p. 632-8.
198. Xu, G., et al., *Fusogenic effects of murine retroviruses and cationic enhancers of transduction*. Cancer Gene Ther, 2000. 7(1): p. 53-8.
199. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
200. Lausch, V., Hermann, P., Laue, M. and Bannert, N., *Silicon-based grids are compatible with correlative negative 1 staining electron microscopy and tip-enhanced Raman 2 spectroscopy for use in the rapid detection of micro-organisms*. in Präparation.
201. Czech, A., et al., *Silent mutations in sight: co-variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations*. Mol Biosyst, 2010. 6(10): p. 1767-72.
202. Kimchi-Sarfaty, C., et al., *A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity*. Science, 2007. 315(5811): p. 525-8.
203. Komar, A.A., *Silent SNPs: impact on gene function and phenotype*. Pharmacogenomics, 2007. 8(8): p. 1075-80.
204. Komar, A.A., *Genetics. SNPs, silent but not invisible*. Science, 2007. 315(5811): p. 466-7.
205. Beckman, M., *The Sound of a Silent Mutation*. Science Now, 2006.

206. Angov, E., *Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins*. Biotechnol J, 2011. 6(6): p. 650-9.
207. Perez-Caballero, D., S.J. Soll, and P.D. Bieniasz, *Evidence for restriction of ancient primate gammaretroviruses by APOBEC3 but not TRIM5alpha proteins*. PLoS Pathog, 2008. 4(10): p. e1000181.
208. Saenz, D.T., et al., *Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5alpha proteins*. J Virol, 2005. 79(24): p. 15175-88.
209. DeHart, J.L., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vif induces cell cycle delay via recruitment of the same E3 ubiquitin ligase complex that targets APOBEC3 proteins for degradation*. J Virol, 2008. 82(18): p. 9265-72.
210. Goila-Gaur, R. and K. Strebel, *HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity*. Retrovirology, 2008. 5: p. 51.
211. McNatt, M.W., et al., *Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants*. PLoS Pathog, 2009. 5(2): p. e1000300.
212. Van Damme, N., et al., *The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein*. Cell Host Microbe, 2008. 3(4): p. 245-52.
213. Strebel, K., *HIV accessory genes Vif and Vpu*. Adv Pharmacol, 2007. 55: p. 199-232.
214. Miekka, S.I., et al., *Inactivation of viral and prion pathogens by gamma-irradiation under conditions that maintain the integrity of human albumin*. Vox Sang, 2003. 84(1): p. 36-44.
215. Pruss, A., et al., *Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses*. Biologicals, 2002. 30(2): p. 125-33.
216. 2012, t.s.; Available from: TEMwindows.com.
217. Jiang, J.Z., Kragh, F., Frost, D.J., Stähl, K. and Lindelov, H., *Hardness and thermal stability of cubic silicon nitride*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2001. 13(22).
218. Finkelshtein, D., et al., *LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(18): p. 7306-11.
219. Biris, N., et al., *Structure of the rhesus monkey TRIM5alpha PRYSPRY domain, the HIV capsid recognition module*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(33): p. 13278-83.
220. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. Nature, 2004. 427(6977): p. 848-53.
221. Munk, C., et al., *Multiple restrictions of human immunodeficiency virus type 1 in feline cells*. J Virol, 2007. 81(13): p. 7048-60.
222. Lochelt, M., et al., *The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(22): p. 7982-7.
223. Stieler, K. and N. Fischer, *Apobec 3G efficiently reduces infectivity of the human exogenous gammaretrovirus XMRV*. PLoS One, 2010. 5(7): p. e11738.

-
224. Noguchi, C., et al., *Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 432-40.
225. Maegawa, H., et al., *Silencing of tripartite motif protein (TRIM) 5alpha mediated anti-HIV-1 activity by truncated mutant of TRIM5alpha*. J Virol Methods, 2008. 151(2): p. 249-56.
226. Song, B., et al., *Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates*. J Virol, 2005. 79(7): p. 3930-7.
227. Si, Z., et al., *Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(19): p. 7454-9.
228. Ylinen, L.M., et al., *Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5alpha alleles*. J Virol, 2005. 79(18): p. 11580-7.

13 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Dafür möchte ich mich zuallererst bei Herrn PD Dr. Norbert Bannert für die Bereitstellung des interessanten Themas der Doktorarbeit und der Betreuung während meiner Doktorandenzeit bedanken. Weiterhin gilt mein Dank Prof Dr. Rupelt Mutzel für die Betreuung meiner Arbeit und die Möglichkeit für die Promotion im Fachbereich Biologie an der Freien Universität Berlin. Ein großes Dankeschön geht an die Gruppen ZBS4: Schnelldiagnostik biologisch relevanter Erreger und ZBS6: Proteomik und Spektroskopie, für die hervorragende technische Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich Dr. Peter Hermann, Janett Piesker, Gudrun Holland, Lars Möller, Antje Hermelink und Michael Laue danken.

Für die großartige Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima während meiner Doktorandenzeit bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe. Ich danke Euch für eure Freundschaft, Zusammenarbeit, Spaß und Hilfsbereitschaft, auch über die Arbeitszeit hinaus. Ich werde immer mit Freude an diese schöne Zeit zurückdenken. Insbesondere geht mein Dank dabei an Dr. Claudia Chudak, Dr. Lars Niederstadt, Dr. Kirsten Hanke und Dr. Oliver Hohn.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Für Eure Liebe, Eure aufmunternden Worte, für die Freude und den Spaß den wir miteinander teilen sowie die Feste die wir feierten und noch feiern werden. Dabei geht mein größter Dank an Euch liebe Aline, Anika und Kerstin.

Der größte Dank geht an meinen Freund Nico, ohne dessen Unterstützung, Freundschaft und Liebe ich nicht so weit gekommen wäre. Danke, dass du da bist!

Danke!

14 Eigenständigkeitserklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 15. September 2009 bis zum 31. Dezember 2012 durchgeführt.

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

Berlin, den 12. Juli 2013

Veronika Lausch

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus
Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus
Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

Schriftliche Veröffentlichungen

Hermann, P., Hermelink, A., **Lausch, V.**, Holland, G., Möller, L., Bannert, N. and Naumann, D. (2011): *Evaluation of tip-enhanced Raman spectroscopy for characterizing different virus strains*; Analyst DOI: 10.1039/c0an00531b

Chudak, C., Beimforde, N., George, M., Zimmermann, A., **Lausch, V.**, Hanke, K. and Bannert, N. (2013, eingereicht in *Journal of Retrovirology*): *Identification of late assembly domains of the Human Endogenous Retrovirus-K(HML-2)*

Lausch, V., Hermann, P., Laue, M. and Bannert, N. (in Präparation): *Silicon-based grids are compatible with correlative negative staining electron microscopy and tip-enhanced Raman spectroscopy for use in the rapid detection of micro-organisms*

Lausch, V. *, Kramer, P. *, Seeher, S., Kurth, R. and Bannert, N. (in Präparation): *Host Range and Cellular Tropism of the Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) *geteilte Erst-Autorenschaft*

Vorträge

Kongress „Gesellschaft für Virologie“ (2012, Essen): *Cell tropism and evidence for a post-entry block in HERV-K(HML-2) infection*

Posterpräsentationen

Kongress „Gesellschaft für Virologie“ (2011, Freiburg): *Reconstitution of the original HERV-K113 and phylogenetic analysis of haplotypes*; **Lausch, V.**, Beimforde, N., Kurth, R. and Bannert, N.

Halbjähriges BiGRUDI Treffen (Mai 2010 bis November 2011) im Rahmen des BiGRUDI-Projekttreffens