



**Hüllproteine endogener Retroviren interferieren mit der
allostimulatorischen Aktivität dendritischer Zellen**

**Human endogenous retrovirus envelope proteins target dendritic
cells to modulate T-cell activation**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität (GK-520)

Vorgelegt von

Jonas Florian Hummel

aus

Bergisch Gladbach

Würzburg, Juni 2015

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

2. Betreuer: Prof. Dr. Ulrike Kämmerer

3. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Lutz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Humane endogene Retroviren	6
1.1.1. Struktur der HERV-Hüllproteine	9
1.2. Rolle der HERV-Proteine in der menschlichen Plazenta	10
1.2.1. Struktur der menschlichen Plazenta	10
1.2.2. Plazenta-exprimierte HERV-Hüllproteine und deren Funktionen	11
1.2.3. Immunzellen in der Plazenta	15
1.2.4. Immunologische Synapse	16
1.3. Immuntoleranz in der Plazenta	17
1.4. Fragestellung	19
2. Materialien	20
2.1. Zellen	20
2.1.1. Zelllinien	20
2.1.2. Primäre Zellen	20
2.2. Bakterien	21
2.3. Plasmide	21
2.4. Primer	22
2.5. siRNAs	23
2.6. Antikörper	23
2.6.1. Unmodifizierte Primärantikörper	23
2.6.2. Sekundärantikörper	24
2.6.3. Modifizierte Primärantikörper	24
2.7. Fluoreszierende Farbstoffe	24
2.8. Zellkulturmedien und Zusätze	24
2.8.1. Eukaryotische Zellen	25
2.9. Bakterien	25
2.10. Puffer und Lösungen	25
2.11. Kits	27
2.12. Chemikalien und Reagenzien	28
2.13. Plastikware und Verbrauchsmaterialien	28
2.14. Geräte	28
2.15. Software	28
3. Methoden	30
3.1. Zellkultur	30
3.1.1. Zellkultur von Zelllinien	30
3.1.2. Bestimmung der Lebendzellanzahl	30
3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
3.1.4. Isolation peripherer Blut mononukleärer Zellen (PBMCs)	31
3.1.5. Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten in vitro	31
3.1.6. Aufreinigung und Aktivierung von T-Zellen	33
3.2. RNA-Methoden	34
3.2.1. RNA-Extraktion	34

3.2.2. cDNA-Synthese	34
3.3. Molekularbiologische Methoden	34
3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.3.2. DNA-Agarose-Gelelektrophorese & DNA-Aufreinigung	35
3.3.3. Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.3.4. Transformation kompetenter Bakterien und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA und Sequenzierung	36
3.4. Zellbiologische Methoden	37
3.4.1. Polyethylenimin (PEI)-Transfektion	37
3.4.2. siRNA-Protein Knock-down in Chorionkarzinom-Zelllinien	37
3.4.3. Fusionsassay	38
3.4.4. DC Ko-Kultivierung mit Effektorzellen und Zytokinmessung	38
3.4.5. T-Zell-Proliferation	39
3.4.5.1. T-Zell-Proliferation mittels CFSE-Färbung	39
3.4.5.2. T-Zell-Aktivierung mittels α -CD3- und α -CD-28-Antikörper-Stimulation	39
3.4.5.3. Mixed Leukocyte Reaction (MLR)	40
3.4.6. Durchflusszytometrie	40
3.4.6.1. Oberflächenexpression	40
3.4.6.2. Intrazelluläre Proteinexpression	41
3.4.7. Immunfluoreszenzfärbung	41
3.4.8. Quantifizierung von DC/T-Zell-Konjugaten mittels Durchflusszytometrie	41
3.4.9. Ca^{2+} -Mobilisierung in DC/T-Zell-Konjugaten	42
3.4.10. DC/T-Zell-Interface Analyse	42
3.5. Statistik	43
4. Ergebnisse	44
4.1. Expression der HERV-Hüllprotein-Rezeptoren auf Immunzellen	44
4.2. Expression der HERV-Hüllprotein-Rezeptoren auf Effektorzellen	46
4.3. Funktionelle Überprüfung der HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen	50
4.4. Modulatorische Eigenschaften der HERV-Hüllproteine	53
4.4.1. Chorionkarzinom-Zelllinien, aber keine HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen inhibierten die T-Zell-Proliferation	53
4.4.2. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen hatten keinen Effekt auf die LPS-vermittelte phänotypische DC-Reifung	57
4.4.3. Differentielle Regulation der LPS-DC-Zytokin-Produktion durch Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen	62
4.4.4. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen veränderten die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation	66
4.4.5. Blockierung der HERV-Hüllproteinexpression auf den Chorionkarzinom-Zelllinien	69
4.4.6. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen hemmten die DC/T-Zell-Konjugatbildung	71
4.4.7. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen hemmten die Aktivität der immunologischen Synapse	76

5. Diskussion	85
6. Zusammenfassung	98
7. Summary	99
8. Literaturverzeichnis	100
9. Abkürzungsverzeichnis	112
10. Abbildungsverzeichnis	117
11. Tabellenverzeichnis	120
12. Publikationen und Präsentationen	121
12.1. Publikationen	121
12.2. Präsentationen	121
12.2.1. Vorträge	121
12.2.2. Poster	122
13. Danksagung	123
14. Lebenslauf	124
15. Eidesstattliche Erklärung	125

1. Einleitung

1.1. Humane endogene Retroviren

Humane endogene Retroviren (HERVs) gehören zu den Retroelementen. Diese Retroelemente sind Sequenzen, welche für ihre replikative Transposition revers transkribiert werden. Sie kommen zu ungefähr 42 % im menschlichen Genom vor (Lander, *et al.*, 2001). Viele dieser Retroelemente sind retroviralen Ursprungs und werden von zwei LTRs (*long terminal repeats*) flankiert, wobei die internen Regionen Homologe zu den retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env* darstellen (Abb. 1.1) (Boeke and Stoye, 1997). Die LTRs enthalten essentielle Signale für die Expression des Genoms wie z.B. Promotor und Enhancer (Larsson and Andersson, 1998). Die Elemente retroviralen Ursprungs werden endogene Retroviren (ERVs) genannt und sind wahrscheinlich provirale Überreste einer retroviralen Infektion (Boeke and Stoye, 1997, Gifford and Tristem, 2003, Harris, 1998). Die Gene *gag*, *pol* und *env* werden für die virale Replikation und Partikelbildung benötigt. So kodiert das *gag*-Gen für Strukturproteine (Kapsid- und Matrixproteine), das *pol*-Gen für virale Enzyme und das *env*-Gen für die Hüllproteine (Coffin, 1979).

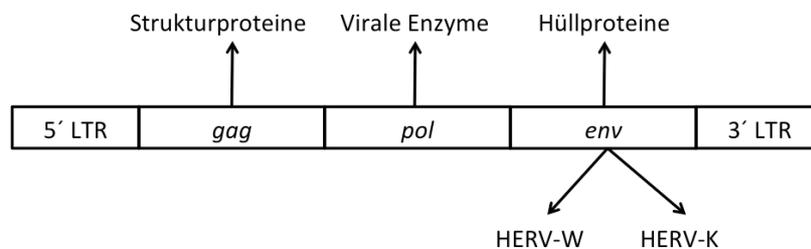


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Retroelements viralen Ursprungs. Das Gen *gag* kodiert für Kapsid- bzw. Strukturproteine, *pol* für virale Enzyme wie z.B. die reverse Transkriptase und *env* für die Hüllproteine. Das Retroelement ist von LTRs flankiert. Retrovirale Hüllproteine sind z.B. Syncytin-1 (HERV-W) und HML-2 (HERV-K) (modifiziert nach (Coffin, 1979, Kammerer, *et al.*, 2011)).

Durch Integration in die humane Keimbahn endogenisierte Retroviren werden humane endogene Retroviren (HERVs) genannt. HERVs kommen zu ungefähr 8 % im menschlichen Genom vor und werden in ungefähr 80 verschiedene Familien eingeordnet, die anhand ihrer basenspezifischen Aminoacyltransferase an den tRNAs, welche die Primer der retroviralen reversen Transkription darstellen, differenziert werden (Bock and Stoye, 2000, Jurka, 2000). Die spezifische Aminosäure wird zur Namensgebung des HERVs mit dem jeweiligen

Buchstaben abgekürzt (Blomberg, *et al.*, 2009, Larsson, *et al.*, 1989). HERVs werden in mindestens drei Klassen unterteilt: zur Klasse 1 gehören HERVs, welche mit Gammaretroviren wie dem Murinen Leukämie Virus (MLV) verwandt sind (beispielsweise HERV-W (W = Tryptophan)). In die Klasse 2 sind HERVs eingeordnet, die Ähnlichkeiten mit Betaretroviren wie dem Maus-Mammatumovirus (MMTV) aufweisen (z. B. HERV-K (K = Lysin) Subtypen). Die Klasse 3 beinhaltet HERVs mit Gemeinsamkeiten zu Spumaretroviren, wozu HERV-L (L = Leucin) und HERV-S (S = Serin) gehören (Abb. 1.2) (Johnson and Coffin, 1999). Viele dieser Insertionen liegen wahrscheinlich zwischen 20 und 40 Millionen Jahre zurück und sind auf exogene Infektionen von Keimbahnzellen der Primaten-Vorläufer zurückzuführen (Benit, *et al.*, 1999, Martin, *et al.*, 1997). Die Klassen 1 und 3 sind die ältesten Gruppen, wobei die Klasse 1 ebenfalls neuere HERVs aufweist. So konnte gezeigt werden, dass in der Klasse 1 manche HERVs vor ungefähr fünf Millionen Jahren ins Genom integriert wurden (Medstrand and Mager, 1998). Nach der Keimbahninfektion wurden die HERVs nach den Mendelschen Gesetzen durch sexuelle Transmission an die nachfolgenden Generationen übertragen (Abb. 1.3).

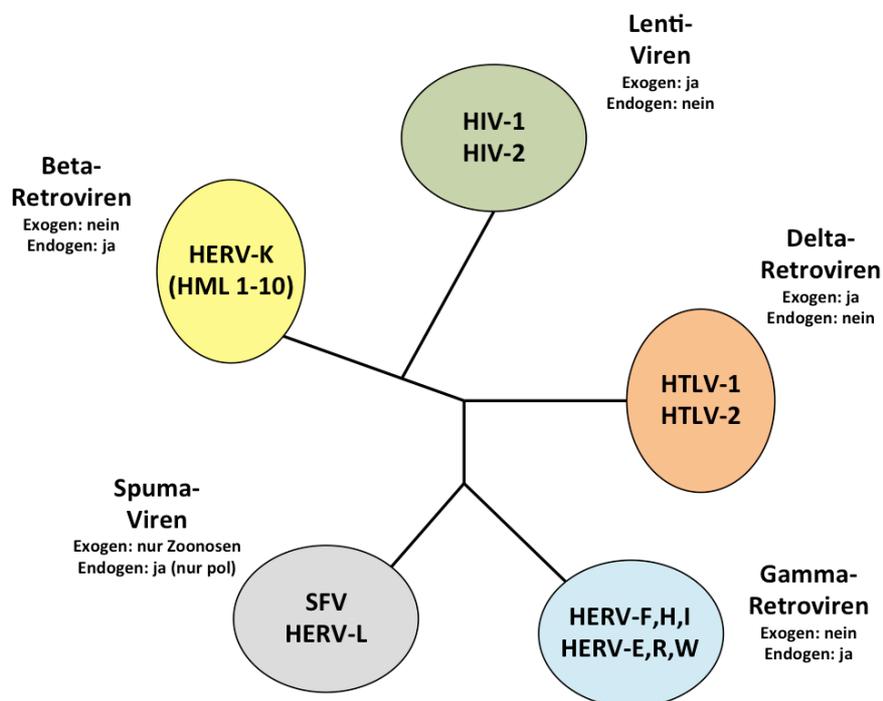


Abbildung 1.2: Phylogenetischer Baum der humanen Retroviren. Es sind verschiedene Klassen der exogenen und endogenen Retroviren und repräsentative Vertreter dieser Klassen dargestellt (modifiziert nach (van der Kuyl, 2012)).

HERV-Sequenzen sind aufgrund ihrer lang zurück liegenden Endogenisierung in Abwesenheit von Selektionsdruck häufig Mutationen und Deletionen unterworfen, die im Laufe der Evolution zum Verlust der Funktionalität der viralen Proteine bis hin zum Verlust der Infektiosität führen (Boeke and Stoye, 1997). Genom-Analysen zeigten jedoch, dass manche HERVs dennoch offene Leserahmen (*open reading frames*; ORFs) besitzen (de Parseval, *et al.*, 2003, Villesen, *et al.*, 2004). Dies konnte auch für ERVs der Maus (Dupressoir, *et al.*, 2005), des Schafs (York, *et al.*, 1992) und des Schweins (Vernochet, *et al.*, 2011) gezeigt werden. Für HERV-K wurde neben der Expression viraler Proteine die Produktion Virus-ähnlicher Partikeln (*virus-like particles* (VLPs)), jedoch nicht infektiöser Partikel beschrieben (Boller, *et al.*, 2008).

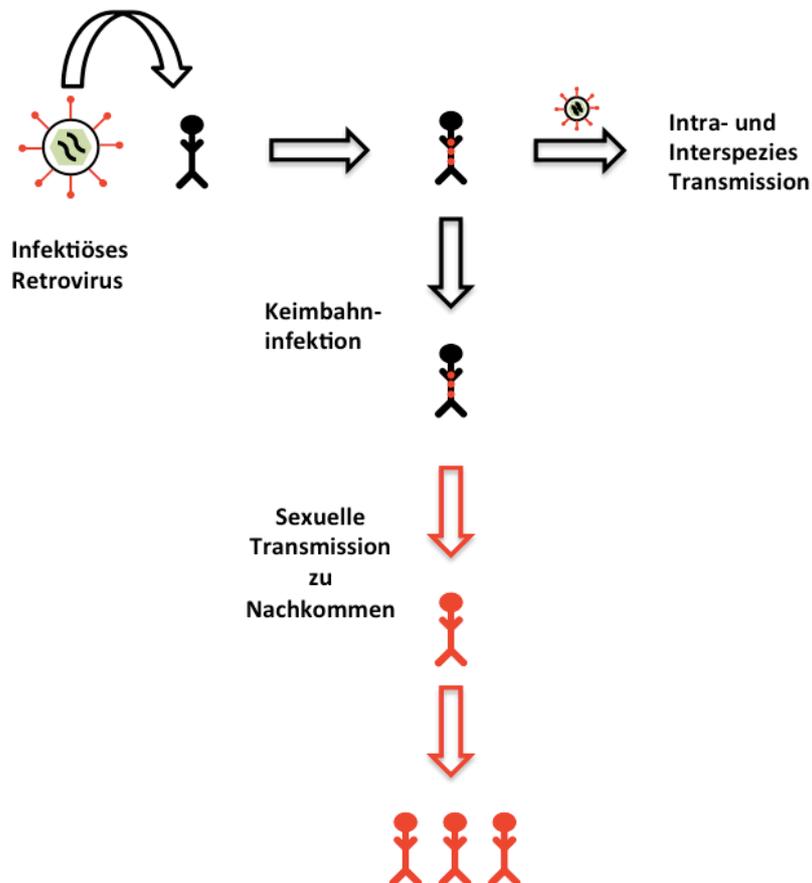


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Endogenisierung der HERVs.

Retroviren können in seltenen Fällen Keimzellen infizieren. Diese Keimbahninfektion wird durch sexuelle Transmission auf die Nachkommen übertragen und wird danach als HERV bezeichnet (modifiziert nach (Cornelis, *et al.*, 2012, Dupressoir, *et al.*, 2012)).

1.1.1. Struktur der HERV-Hüllproteine

Ein besonderes Augenmerk liegt auf den Hüllproteinen (*envs*) der HERVs, die in der Regel gut konserviert sind und eine mögliche Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen spielen (Blaise, *et al.*, 2003, Medstrand and Blomberg, 1993). HERV-Glykoproteine gehören zum Typ 2 und bestehen nach proteolytischer Prozessierung aus zwei Subeinheiten (Abb. 1.4). Die Oberflächen-Domäne (*surface unit* (SU)) beinhaltet die Rezeptor-bindende Region (*receptor binding domain* (RBD)). Die Transmembran-Region (*transmembrane region* (TM)) beinhaltet ein endständiges Fusionspeptid, eine putative immunsuppressive Domäne (*immunosuppressive domain* (ISD)), eine Transmembran und eine zytoplasmatische Domäne. Nach Bindung der SU der einen Zelle an den Fusions-Rezeptor der Zielzellen bleiben die beiden SU- und TM-Einheiten verbunden. Das Fusionspeptid der TM führt zu einer rezeptorabhängigen Fusion mit der Plasmamembran der Zielzelle (Blaise, *et al.*, 2003, Blond, *et al.*, 2000). HERV-Glykoproteine sind vor allem in der Plazenta exprimiert, in der einkernige Trophoblasten zu mehrkernigen Syncytiotrophoblasten fusionieren.

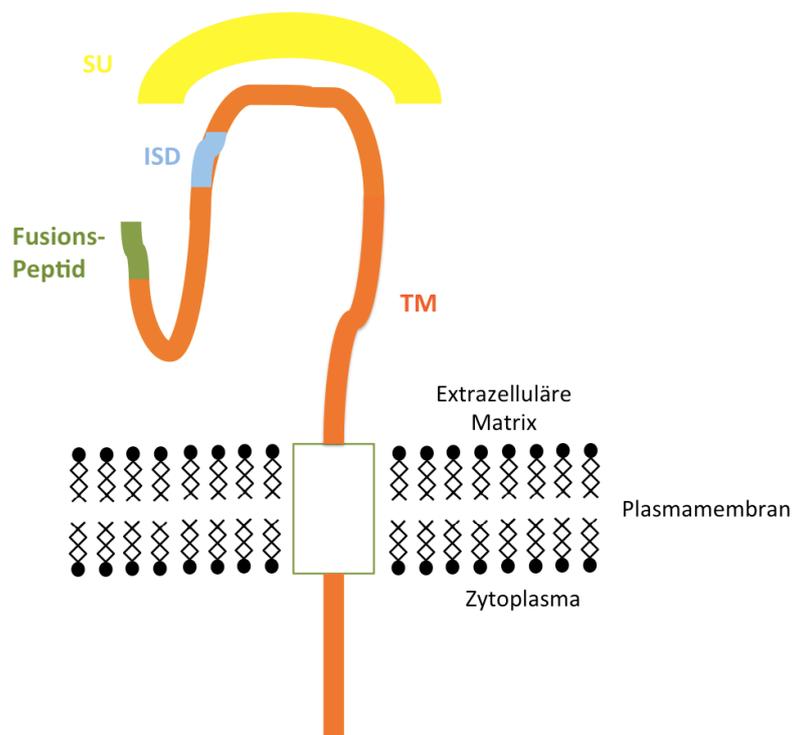


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines HERV-Glykoproteins. Die SU ist außerhalb der Zelle positioniert und bindet den spezifischen Rezeptor auf der Zielzelle. TM: *transmembrane region*, SU: *surface unit*, ISD: *immunosuppressive domain*, RBD: *receptor binding region* (modifiziert nach (Mangeny, *et al.*, 2007)).

1.2. Rolle der HERV-Proteine in der menschlichen Plazenta

1.2.1. Struktur der menschlichen Plazenta

Die Plazenta gilt als immunprivilegiertes Organ, da eine Toleranz gegenüber dem semi-allogenen Fetus vorhanden sein muss (Bischof and Irminger-Finger, 2005, Ohshima, *et al.*, 2001). Voraussetzung für einen weitgehenden Schutz vor Kontakt zwischen mütterlichen Immunzellen und fetalen Antigenen ist die Entwicklung einer physikalischen Barriere, die infolge der Differenzierung von Plazentazellen (Trophoblasten) entsteht (Beer and Quebbeman, 1986). Cytotrophoblasten entstehen aus peripheren Blastozysten und sind an der Membran des Uterus verankert (Abb. 1.5).

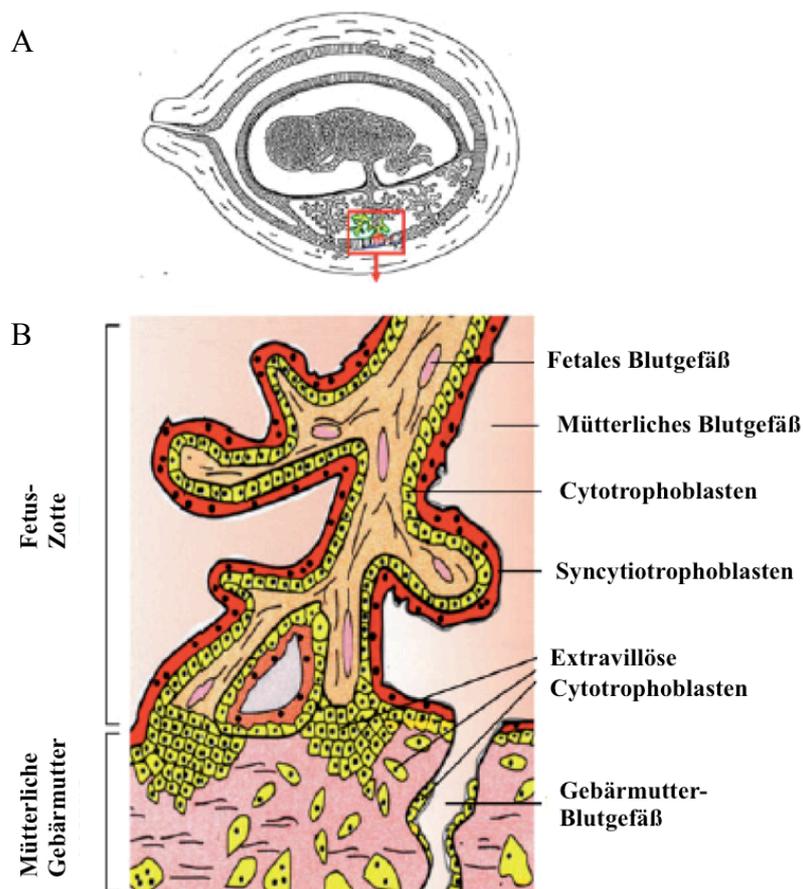


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der menschlichen Plazenta.

A. Schema der menschlichen Plazenta mit implantiertem Fetus und B. Vergrößerung einer Chorionzotte der Plazenta (modifiziert nach (Harris, 2010)).

Nach Tag 6 der Embryogenese fusionieren die einkernigen Cytotrophoblasten miteinander zu Syncytiotrophoblasten, welche eine invasive mehrkernige Zellschicht bilden. Diese Zellschicht unterstützt die Implantierung des Embryos in das mütterliche Endometrium. Ab dem 16. Tag werden die Chorionzotten entwickelt, die von Syncytiotrophoblasten umhüllt sind, welche mit der Wand des Uterus verankert sind und in die neu gebildeten Blutgefäße reichen (Gude, *et al.*, 2004). Außerdem entstehen extravillöse Cytotrophoblasten, die einen unabhängigen Entstehungsprozess durchlaufen. Sie migrieren von den Chorionzotten in die mütterliche Dezidua und die Blutgefäße, um den Blutfluss zum Embryo zu erhöhen (Gude, *et al.*, 2004).

1.2.2. Plazenta-exprimierte HERV-Hüllproteine und deren Funktionen

Im gesunden Menschen werden HERV-Proteine nur in speziellen Geweben, wie z.B. der Plazenta exprimiert und sind in anderen Geweben durch Hypermethylierung inaktiv. Aufgrund krankheitsassoziiierter Modifikationen, die auch deren Methylierungsstatus ändern können, kann jedoch die HERV-Proteinexpression als Epiphänomen induziert werden (Gimenez, *et al.*, 2009, Lavie, *et al.*, 2005, Matouskova, *et al.*, 2006, Ruebner, *et al.*, 2013).

HERVs wurden mit verschiedenen pathologischen Bedingungen in Zusammenhang gebracht. So wurde den HERVs schon früh ein möglicher Einfluss in der Pathogenese der Multiplen Sklerose zugesprochen (Perron, *et al.*, 1997). Daneben werden sie aber auch mit anderen Krankheiten assoziiert, wie der Entstehung von Tumoren (z.B. Melanomen) (Kassiotis, 2014), der HIV-Infektion und verschiedenen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Schiavetti, *et al.*, 2002, Yang and Perry-Lalley, 2000). Die Rolle der HERVs in diesen Erkrankungen ist nicht bekannt und es ist daher ungewiss, ob sie wirklich eine Funktion im Krankheitsverlauf spielen oder ob es sich nur um eine krankheitsassoziierte HERV-Expression handelt.

Es ist jedoch bekannt, dass HERV-Hüllproteine in der Plazentaentwicklung einen wichtigen Einfluss haben. Es wurden mehrere HERV-Hüllproteine beschrieben, welche stark in der Plazenta exprimiert werden.

In 1999 wurde erstmalig das HERV-W Hüllprotein Syncytin-1 in der Plazenta beschrieben (Blond, *et al.*, 1999, Blond, *et al.*, 2000). Das Plazenta-exprimierte HERV-W Hüllprotein wird in allen Stadien der Plazentation in allen Trophoblasten-Typen exprimiert (Malassine, *et al.*, 2005, Muir, *et al.*, 2006). Durch seine fusogenen Eigenschaften, die zur Fusion von Trophoblasten zu Syncytiotrophoblasten führen, hat es eine essentielle Funktion während der Plazentabildung (Blond, *et al.*, 1999, Blond, *et al.*, 2000, Mi, *et al.*, 2000).

Als Syncytin-1-Fusionsrezeptoren wurden SLC1A4 (ASCT-1) und SLC1A5 (ASCT-2) identifiziert, die zur der Familie der *solute carrier* gehören und ubiquitär (auch auf Cytotrophoblasten) exprimierte Natrium-abhängige (Na^+ -) neutrale Aminosäuretransporter sind (Cheynet, *et al.*, 2006). Sie weisen eine Homologie von ungefähr 54 % auf und haben eine wichtige Funktion in der Fusion der Cytotrophoblasten, die infolge der Herunterregulation von ASCT-1, aber auch der von ASCT-2 vermindert ist (Blond, *et al.*, 2000, Marin, *et al.*, 2003). ASCT-1 und -2 werden in der Plazenta sehr stark exprimiert, kommen aber auch in den Nebennieren, den Hoden, dem Gehirn, den Lymphknoten, der Milz und der Bauchspeicheldrüse vor (Lavillette, *et al.*, 2002).

Im Jahr 2003 wurde das HERV-FRD Hüllprotein (FRD = Phenylalanin, Arginin, Asparaginsäure) oder Syncytin-2 erstmalig charakterisiert (Blaise, *et al.*, 2003, Blaise, *et al.*, 2004) und nachfolgend ebenfalls als Fusionsprotein identifiziert (Chen, *et al.*, 2008, Vargas, *et al.*, 2009).

Dessen Fusionsrezeptor ist *Major facilitator superfamily domain containing 2A* (MFSD2A), der zu der *carbohydrate carrier* Familie gehört und den Transport von Fettsäuren und Docosahexaensäuren vermittelt (Tabelle 1.1). MFSD2A wird auf Cytotrophoblasten sowie Syncytiotrophoblasten exprimiert und wird, ebenfalls wie die Syncytin-1-Rezeptoren, für die Fusion von Trophoblasten benötigt (Esnault, *et al.*, 2008, Liang, *et al.*, 2010, Toufaily, *et al.*, 2013). Anders als ASCT-1 und -2 wird der Rezeptor MFSD2A spezifisch in der Plazenta exprimiert (Esnault, *et al.*, 2008).

Viele Studien haben sich auf die regulatorischen Signalwege konzentriert und die zugrundeliegenden Mechanismen der Syncytin-1 und -2-abhängigen Fusion von Trophoblasten untersucht. Das *glia missing cell-1*-(GCM-1) Protein scheint wesentlich für die Regulation der Syncytin-1- und -2-abhängigen Fusion zu sein, indem es die Expression dieser beiden Proteine erhöht (Chang, *et al.*, 2008, Liang, *et al.*, 2010). Gleichzeitig führt das GCM-1-Protein zur HtrA4-Expression, welche die Syncytin-1-abhängige Fusion hemmt, was wichtig für die fusionsunabhängige Differenzierung extravillöser Cytotrophoblasten ist, die in die Dezidua invadieren (Wang, *et al.*, 2012) (Abb. 1.6). Damit ist das GCM-1-Protein ein essentieller Regulator der Trophoblasten-abhängigen Fusion und reguliert die richtige Verteilung von Syncytiotrophoblasten und extravillösen Cytotrophoblasten.

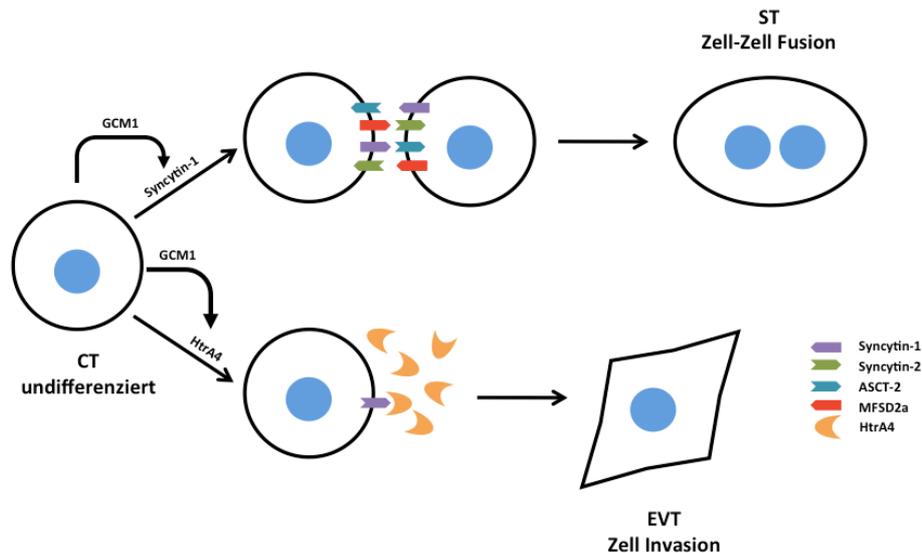


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Differenzierung von Cytotrophoblasten zu Syncytiotrophoblasten sowie extravillösen Trophoblasten.

Die Differenzierung zu Syncytiotrophoblasten wird von GCM-1 beeinflusst, was die Syncytin-1-Expression beeinflusst. Die Syncytin-1-Expression sowie die Syncytin-2-Expression auf der Oberfläche der Cytotrophoblasten kann mit anderen Cytotrophoblasten zur Bindung der jeweiligen Rezeptoren ASCT-2 und MFSD2A führen. Die Bindung führt zu einer Fusion dieser Cytotrophoblasten und damit zur Entstehung der mehrkernigen Syncytiotrophoblasten. Zeitgleich beeinflusst GCM-1 die Sezernierung von HtrA4 und die Bindung von HtrA4 an Syncytin-1 führt zur Differenzierung von Cytotrophoblasten zu extravillösen Cytotrophoblasten (modifiziert nach (Wang, *et al.*, 2012)).

Neben seiner Fusionsaktivität zeigte Syncytin-2 eine immunsuppressive Funktion. In einem *tumor rejection assay* konnte eine Immunsuppression von Syncytin-2 bewiesen werden (Mangeny, *et al.*, 2007). So konnte innerhalb der TM in der ISD des HERV-FRD-Hüllproteins ein 20-Aminosäure langes Peptid identifiziert werden, das Ähnlichkeiten mit einem CSK-17 synthetischen Peptid aufweist, dessen immunsuppressive Aktivität *in vivo* und *in vitro* beschrieben wurde. In einem B16 Melanom *tumor rejection model* konnte durch Applikation der ISD des humanen Syncytin-2 und des murinen Syncytin-B das Abstoßen des Tumors verhindert und somit das Tumorwachstum gefördert werden. In diesem Modell zeigte Syncytin-1 keine immunsuppressive Aktivität (Mangeny, *et al.*, 2007).

Erkrankungen in der Plazenta gehen oftmals mit einem ungewollten Schwangerschaftsabbruch und einer Entzündungsreaktion einher. In westlichen Ländern kommt es in 5 – 7 % aller Schwangerschaften zu ungewollten Schwangerschaftsabbrüchen und in Entwicklungsländern ist diese Zahl um ein Vielfaches höher. Oftmals sind die Ursachen einer Erkrankung der Plazenta auf diverse Infektionen zurückzuführen, aber auch auf Alkohol- und Drogenmissbrauch, Stress und physiologische Schädigung. Dies kann zu einem verlangsamten Wachstum der Plazenta führen, was auch *intrauterine growth*

restriction (IUGR) genannt wird, oder zu einer Präeklampsie, einer hypertensiven Erkrankung (Al-Jameil, *et al.*, 2014, Hogberg, 2005, Sastry, 1991).

Es konnte gezeigt werden, dass IUGR und Präeklampsie mit einer reduzierten mRNA- und Protein-Expression diverser HERV-Hüllproteine wie z.B. Syncytin-1 und -2 einhergehen (Knerr, *et al.*, 2004, Lee, *et al.*, 2001, Vargas, *et al.*, 2011). Auch die ASCT-2-Expression war während Präeklampsie reduziert (Chen, *et al.*, 2006) und für MFSD2A konnte ebenfalls eine verringerte Expression während der Präeklampsie gezeigt werden (Toufaily, *et al.*, 2013).

Dies führt zu Vermutung, dass HERV-Hüllproteine in der Entstehung der Plazenta, aber auch in der Aufrechterhaltung der Plazenta notwendig sind.

Das ebenfalls Plazenta-exprimierte HML-2 (HERV-K) wurde bis dato ausschließlich in den extravillösen Cytotrophoblasten gefunden. Da diese in die Dezidua invadieren und migrieren und dort mit den Immunzellen der Mutter in Kontakt kommen, wird insbesondere für HERV-K eine immuntolerogene Eigenschaft vermutet (Kammerer, *et al.*, 2011). Bis jetzt wurden sechs funktionelle Hüllproteine dieser Familie beschrieben, welche sehr stark konserviert sind (Boller, *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte eine ISD innerhalb der TM von HERV-K identifiziert werden, welche *in vitro* eine Immunsuppression von PBMCs bewirkte (Morozov, *et al.*, 2013). Ob HERV-K eine Bedeutung in der Fusion von Trophoblasten hat, wie es bei HERV-W oder HERV-FRD der Fall ist, ist unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass HERV-K in Melanomzellen eine fusogene Eigenschaft hat, aber ob dies auch auf gesunde Zellen zutrifft, ist weiterhin ungeklärt (Huang, *et al.*, 2013). Der oder die Rezeptoren des HML-2-Proteins sind ebenfalls nicht identifiziert.

Ein weiteres sehr altes und gut erforschtes HERV-Hüllprotein in der Plazenta ist ERV3 oder Syncytin-3, jedoch hat dieses Hüllprotein die fusogene und ebenfalls immuntolerogene Eigenschaft durch Mutationen in der ISD verloren, da dieses Hüllprotein nicht sehr gut konserviert ist (de Parseval and Heidmann, 1998, Kato, *et al.*, 1987).

Tabelle 1.1: Übersicht der am besten beschriebenen HERV-Hüllproteine mit deren Gen-Namen und (Fusions-) Rezeptoren.

Gen-Name	Hüllprotein-Name	Rezeptor
HERV-W	Syncytin-1	SLC1A4 (ASCT-1) SLC1A5 (ASCT-2)
HERV-FRD	Syncytin-2	MFSD2A
HERV-K	HML-2	unbekannt

1.2.3. Immunzellen in der Plazenta

Während der frühen Schwangerschaft sind viele CD45⁺-Leukozyten in der Plazenta vorhanden. Sie machen 50 - 75 % aller Zellen in der Plazenta aus. Jedoch ist wenig über ihre Verteilung und Funktionen bekannt (Maruyama, *et al.*, 1992, Starkey, *et al.*, 1988). In der frühen Schwangerschaft machen wiederum 70 % der CD45⁺-Leukozyten uterine natürliche Killerzellen (*uterine natural killer cells* (uNKs)) aus, denen ein wichtiger Einfluss in der Implantation zugesprochen wird. Sie weisen eine hohe CD56⁺-Expression auf, aber keine Expression von CD16⁺ (Kalkunte, *et al.*, 2008, King, *et al.*, 1991, Starkey, *et al.*, 1988). Es wurde ebenfalls eine hohe Anzahl von CD3⁺-T-Zellen in der Plazenta nachgewiesen, die dort 8 - 10 % der Leukozyten ausmachen (King, *et al.*, 1991, Starkey, *et al.*, 1988). Am Anfang der Schwangerschaft sind eher pro-inflammatorische T-Zellen wichtig, im zweiten Trimester kommt es zu einem Anstieg der anti-inflammatorischen T-Zellen (Mor, 2008, Mor, *et al.*, 2011). Regulatorische T-Zellen (Tregs) kommen ebenfalls in einer relativ hohen Anzahl vor (Mjosberg, *et al.*, 2010), jedoch gibt es nur wenige Th17-Zellen und CD19⁺-B-Zellen in der Plazenta (Trundley and Moffett, 2004). CD4⁺-T-Helfer-Zellen und Tregs sind in der Plazenta für die Immuntoleranz essentiell, da sie wichtige Regulatoren in der Produktion von Th1/Th2-Zytokinen sind (zusammengefasst in (Erlebacher, 2013, Mincheva-Nilsson, *et al.*, 2006, Pedroza-Pacheco, *et al.*, 2013). In der immuntoleranten Plazenta ist eine Verschiebung der Th1- zur Th2-Zytokinproduktion ein wichtiger Schritt (Szekeres-Bartho and Wegmann, 1996, Wegmann, *et al.*, 1993).

Klassische Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen, CD83⁺-mDCs (reife dendritische Zellen) und CD209⁺-iDCs (unreife DCs) sowie CD14⁺-Monozyten werden ebenfalls in der Plazenta gefunden (Kammerer, *et al.*, 2003, Kammerer, *et al.*, 2000, Rieger, *et al.*, 2004). Ungefähr 8 - 10 % von allen CD45⁺-Zellen in der Plazenta sind iDCs. Plazenta-residente oder auch uterine DCs (uDCs) sind sehr wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung der organspezifischen Toleranz. Im Gegensatz zu peripheren DCs zirkulieren uDCs nicht in die Lymphknoten. Faktoren dieser Geweberesidenz sind weitgehend unbekannt. uDCs sind phänotypisch unreif (niedrige CD86⁺- und CD83⁺-Expression), erreichen jedoch nach Aktivierung durch LPS in der Plazenta einen semireifen Phänotyp (Collins, *et al.*, 2009, Gardner and Moffett, 2003, Kammerer, *et al.*, 2003, Kammerer, *et al.*, 2000, Miyazaki, *et al.*, 2003). Sie tragen zur Differenzierung von uNK-Zellen bei, denen eine entscheidende Rolle in der Immunregulation in der Plazenta zukommt. So sind Präeklampsie sowie ungewollte Schwangerschaftsabbrüche mit einer reduzierten uNK-Zellanzahl assoziiert. Eine Reduktion der extravillösen Invasion wird ebenfalls mit einer

geringeren Anzahl von uNK-Zellen in Zusammenhang gebracht (Schwede, *et al.*, 2014). Darüber hinaus wird uDCs eine essentielle regulatorische Bedeutung in der gesunden Plazenta und der dabei induzierten Immuntoleranz durch direkte und indirekte Eigenschaften zugesprochen, welche näher im Abschnitt 1.3 beschrieben werden. In diversen Erkrankungen in der Plazenta wurde aber auch eine erhöhte Anzahl von uDCs und eine gesteigerte Frequenz von mDCs beschrieben (Al-Jameil, *et al.*, 2014, Cappelletti, *et al.*, 2013, Darmochwal-Kolarz, *et al.*, 2003, Huang, *et al.*, 2008).

1.2.4. Immunologische Synapse

Eine immunologische Synapse (IS) ist die Kontaktzone zwischen einer APC, hier einer DC und einer Antigen-spezifischen T-Zelle (Abb. 1.7). Die Aktivierung der T-Zelle kann durch sehr kurze, repetitive, oder auch bis zu Stunden andauernde Kontakte erfolgen. Die Kontaktdauer wird von verschiedenen Umwelteinflüssen beeinflusst, jedoch konnte gezeigt werden, dass mehrere kurze Kontakte (3 – 20 min) ebenfalls zu einer T-Zell-Aktivierung führen können (Friedl, *et al.*, 2005, Gunzer, *et al.*, 2000, Miller, *et al.*, 2004). Für die erfolgreiche Aktivierung ist insbesondere bei naiven T-Zellen die Interaktion kostimulatorischer Moleküle (CD86⁺, CD80⁺ auf DCs (Monks, *et al.*, 1998), CD28⁺ auf T-Zellen) notwendig, für die Stabilisierung der T-Zell/DC-Bindung die Aktivierung von Integrinen (Bromley, *et al.*, 2001, Fooksman, *et al.*, 2010, Huppa and Davis, 2003). Die Erkennung des Antigens in diesem Kontext leitet die T-Zell-Aktivierung ein, die durch die Mobilisierung von Kalzium (Ca²⁺)-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) infolge der Aktivierung von Inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) durch die Phospholipase C (PLC) ausgeschüttet werden (Smith-Garvin, *et al.*, 2009). Sekundär werden Ca²⁺-Kanäle (CRAC - *calcium releasing-activated channel*) in der Plasmamembran geöffnet, die zu einem kontinuierlichen extrazellulären Ca²⁺-Einstrom in die T-Zelle führen (Feske, 2007, Oh-hora and Rao, 2008). Das intrazelluläre Ca²⁺ fungiert als Signalmolekül und führt z.B. zu einer Transkription des *il2*-Gens, welches zur IL-2-Produktion führt. Dies ist wiederum für die T-Zell-Aktivierung über den IL-2 Rezeptor notwendig, welcher auf der T-Zelle exprimiert wird. Außerdem führt die TZR-Aktivierung ebenfalls zur Phosphorylierung von *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs). So werden *Lck*- und *Src*-Tyrosinkinase phosphoryliert und aktiviert und führen zu einem Komplex mit *ZAP-70* und *LAT*. Diese Kaskade führt zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF-κB, MAPK/ERK oder NFAT, welche zur Aktivierung der T-Zelle führen.

Aktiviert T-Zellen proliferieren und führen zur klonalen Expansion, was mit einer Zytokinproduktion von diversen Interleukinen wie IL-2 und IL-5, aber auch TNF- α und IFN- γ einhergeht.

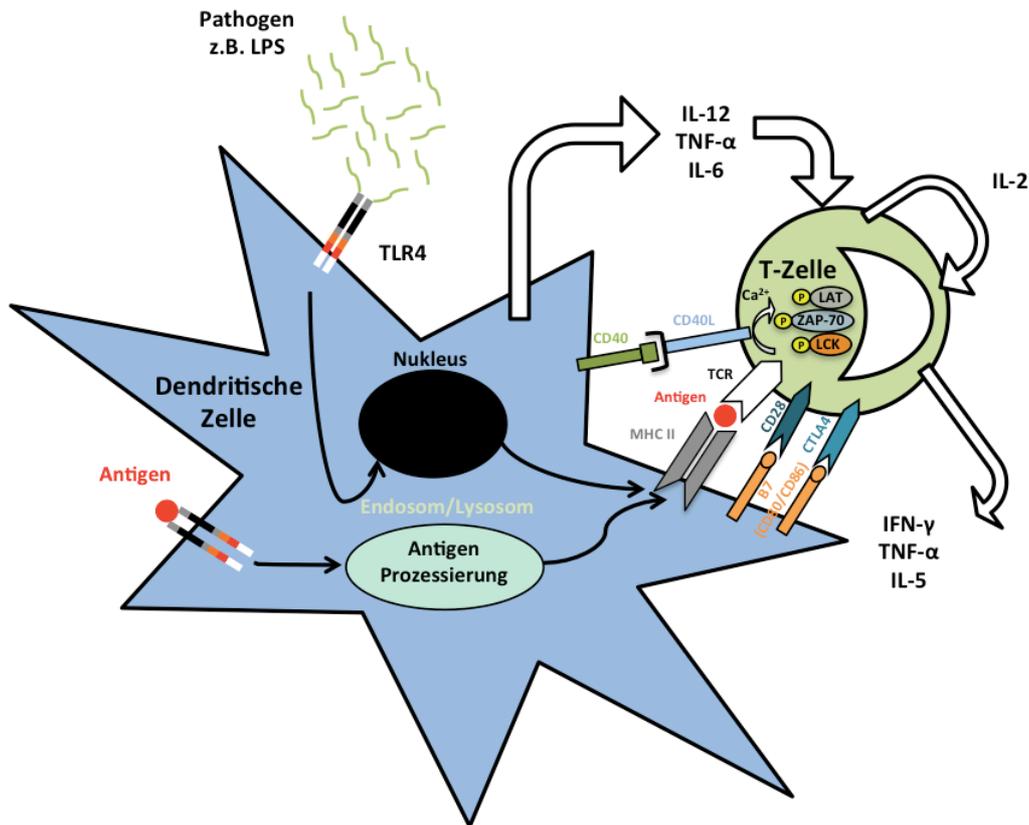


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung einer immunologischen Synapse zwischen einer DC als APC und einer T-Zelle.

Die DC wird durch die Bindung von Pathogenen (z.B. LPS an TLR4) an ihrer Zellmembran und aktiviert die T-Zelle mittels Antigenpräsentierung über MHC-II und TZR-Bindung sowie anderer kostimulatorischer Moleküle stimuliert. Die kostimulatorischen Moleküle sind CD80 und CD86 auf der DC und binden an CD28 oder CTLA4 auf der T-Zelle bzw. CD40 auf der DC bindet an CD40L der T-Zelle. Dabei werden ebenfalls T-Zell-stimulierende Zytokine wie z.B. IL-6, IL-12 und TNF- α seitens der DC ausgeschüttet. Zielmoleküle in der T-Zelle wie *LAT*, *ZAP-70* und *Lck* werden durch TZR-Aktivierung phosphoryliert und führen zur T-Zell-Aktivierung (charakterisiert durch IL-2, IL-5, IFN- γ und TNF- α) (modifiziert nach (Huppa and Davis, 2003)).

1.3. Immuntoleranz in der Plazenta

Neben dem Schutz des Fetus durch die physiologische Barriere der Syncytiotrophoblasten hat sich die Plazenta während evolutionärer Prozessen zu einem sehr spezifischen Organ entwickelt, das durch verschiedene immunevasive Mechanismen den Fetus vor dem Abstoßen beschützt (Mincheva-Nilsson, *et al.*, 2006). So wurde gezeigt, dass die Plazenta-Trophoblasten bakterielle und virale Infektionen ohne Schädigung des Fetus

bekämpfen können, jedoch sind die unterliegenden Mechanismen weitgehend unbekannt (Beer and Quebbeman, 1986, Chatterjee, *et al.*, 2014, King, *et al.*, 2000, Srinivas, *et al.*, 2006, Vasquez, *et al.*, 2013). Der damit offensichtlichen Immunkompetenz der Plazenta steht eine organspezifische Toleranz gegenüber, die die Abstoßung des semi-allogenen Fetus verhindert. Hierbei wird den HERV-Hüllproteinen eine wichtige Rolle in der Immunsuppression zugesprochen, da sie einerseits stark in der Plazenta exprimiert werden und andererseits während pathologischer Konditionen wie Präeklampsie dysreguliert sind, aber auch für die beschriebene ISD kodieren.

Bis jetzt wurde der direkte Einfluss der HERV-Hüllproteine wenig untersucht, sondern hauptsächlich die Suppression immunologischer Parameter durch Trophoblasten, die neben der HERV Hüllprotein-Expression über weitere, potentiell suppressive Faktoren verfügen.

So sezernieren Trophoblasten immunsupprimierende lösliche Mediatoren wie *thymic stromal lymphopoietin* (TSLRP) und *macrophage inhibitor cytokine-1* (MIC-1), mit denen sie die DC-Reifung sowie deren Zytokinproduktion *in vitro* reduzierten (Du, *et al.*, 2014, Guo, *et al.*, 2010, Segerer, *et al.*, 2012). Ähnliche immunsuppressive Eigenschaften wurden durch *ex vitro* kultivierte Trophoblasten beschrieben, welche die Reifung und Zytokinproduktion von DCs, Monozyten und Makrophagen hemmten (Cappelletti, *et al.*, 2013, Grasso, *et al.*, 2014, Panda, *et al.*, 2012, Salamone, *et al.*, 2012).

Eine Bedeutung von HERV-Hüllproteinen hierbei ist nicht direkt bewiesen, jedoch konnten immuntolerogene Eigenschaften dieser Proteine gezeigt werden. So wurde in einem *tumor rejection assay* gezeigt, dass eine ISD innerhalb der TM von Syncytin-2 immunsuppressive Eigenschaften hat, jedoch konnte dies nicht für Syncytin-1 gefunden werden (Mangeny, *et al.*, 2007). Es konnten ebenfalls immunsuppressive Plazenta-Mikrovesikel identifiziert werden, welche für eine interzelluläre Kommunikation in der Plazenta sowie der Trophoblasten-abhängigen Fusion notwendig sind (Lokossou, *et al.*, 2014, Record, 2014). Diese Mikrovesikel werden von Trophoblasten exozytiert und exprimieren unter anderem Syncytin-1 und -2 (Kshirsagar, *et al.*, 2012, Vargas, *et al.*, 2014), (Tolosa, *et al.*, 2012).

Rekombinantes Syncytin-1 hemmte die Zytokinproduktion von Monozyten und PBMCs (Holder, *et al.*, 2012, Rolland, *et al.*, 2006), während rekombinantes HML-2 die Proliferation von PBMCs *in vitro* stark verminderte (Morozov, *et al.*, 2013).

1.4. Fragestellung

Aufgrund der semi-allogenen Toleranz der Plazenta in der gesunden Schwangerschaft und der damit assoziierten Immunsuppression der HERV-Hüllproteine durch deren beschriebene ISD sowie deren immunsuppressive Aktivität wird für eine wichtige Funktion der HERV-Hüllproteine in der semi-allogenen Toleranz vermutet. Bis dato wurde deren Aktivität entweder mittels rekombinanter, nicht membranständiger HERV-Hüllproteine untersucht oder für membranständige auf Trophoblasten exprimierte HERV-Hüllproteine, die aber sehr wahrscheinlich mit anderen immunmodulatorischen Mediatoren dieser Zellen gemeinsam wirken.

In dieser Arbeit sollten spezifisch die modulatorischen Eigenschaften verschiedener HERV-Hüllproteine (Syncytin-1, -2 und HML-2) auf Immunzellen untersucht werden. Hierfür sollten für die HERV-Hüllprotein-Genprodukte transgene Effektorzellen etabliert werden und nachfolgend mögliche regulatorische Effekte auf Viabilität und Aktivierung von T-Zellen oder DCs evaluiert werden.

2. Materialien

2.1. Zellen

2.1.1. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (Tabelle 2.1) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Kämmerer aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg sowie von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bereitgestellt.

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Medium
BeWo	Humanes Plazenta Chorionkarzinom (adhärent)	RPMI 1640 mit 10 % FKS
JEG-3	Humanes Plazenta Chorionkarzinom (adhärent)	RPMI 1640 mit 10 % FKS
JAR	Humanes Plazenta Chorionkarzinom (adhärent)	RPMI 1640 mit 10 % FKS
GH	Humanes Plazenta Chorionkarzinom (adhärent)	RPMI 1640 mit 10 % FKS
HEK 293 T	Humanes embryonales Nierenepithel mit stabiler Expression des SV 40 T-Antigens, adhärent	DMEM mit 10 % FKS
CHO	Ovarien des chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>)	MEM mit 5 % FKS

2.1.2. Primäre Zellen

T-Zellen und aus Monozyten generierte dendritische Zellen (DCs) wurden aus Leukozytenkonzentraten gewonnen, welche von der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg bereitgestellt wurden (Tabelle 2.2; Abschnitt 3.1.5 und 3.1.6). Alle Blutspender haben der Ethikvereinbarung der Ethikkommission der Universität Würzburg zugestimmt.

Tabelle 2.2: Verwendete primäre Zellen.

Zellen	Ursprung	Medium
T-Zellen	PBLs	RPMI 1640 mit 10 % FKS
Dendritische Zellen	PBMCs	RPMI 1640 mit 10 % FKS

2.2. Bakterien

Die verwendeten kompetenten Bakterien *E. coli* Gold sowie *E. coli* Top10 (Invitrogen) wurden für die Transformation zur Amplifikation von Plasmiden verwendet.

2.3. Plasmide

Tabelle 2.3: HERV-Hüllprotein-Plasmide.

Plasmid	Kodiertes Protein	Restriktionsenzyme
pCG-Syncytin-1	HERV-W env - Syncytin-1	Sal-I/Pst-I
pCG-Syncytin-2	HERV-FRD env - Syncytin-2	Sal-I/Pst-I
pCG-HML-2	HERV-K env - HML-2	Pac-I/Xho-I
pCG-ASCT-2	ASCT-2 - SCL1A5	Xba-I/Pst-I
pCG-MFSD2A	MFSD2A	Pac-I/Xho-I

Die einzelnen HERV-Hüllproteine und -Rezeptoren wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pCG mit spezifischen Klonierungsprimern kloniert (Tabelle 2.3). Der leere pCG-Vektor wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies bereitgestellt (Abb. 2.1).

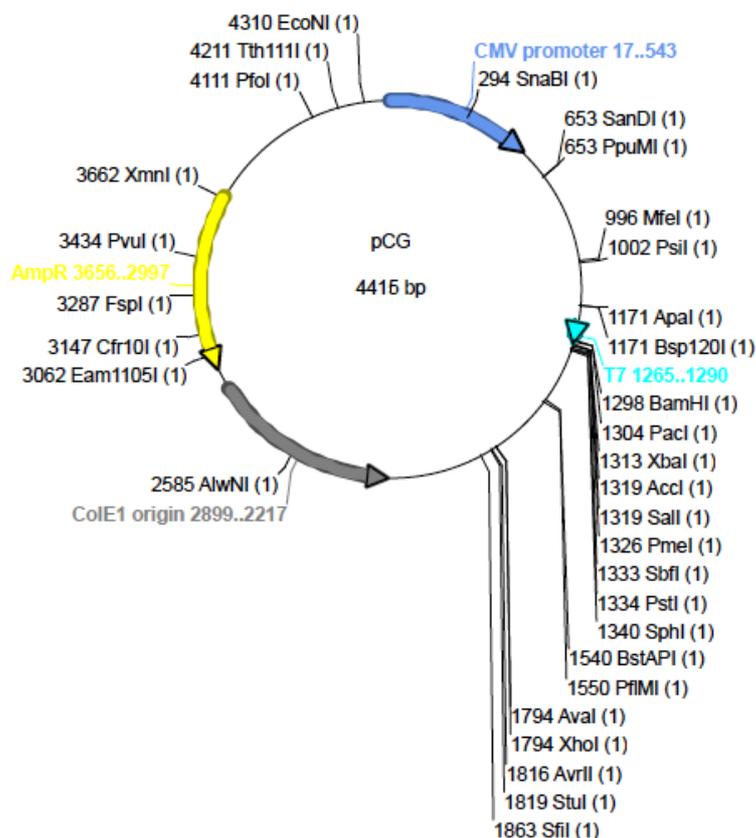


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pCG.

2.4. Primer

CDS (*coding sequence*)-Primer wurden gewählt, um die funktionellen kodierenden Sequenzen aus DNA zu gewinnen (Tabelle 2.4). Die Klonierungsprimer wurden verwendet, um die CDS-Sequenz in der richtigen Leserichtung in den pCG-Vektor mit Hilfe von Restriktionsenzymen zu ligieren (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.4: Primer für die Isolation der CDS aus cDNA.

Primer		Sequenz 5'-3'
Syncytin-1	FW	ATGGCCCTCCCTTATCATATTTTT
	REV	CTAACTGCTTCCTGCTGAATTG
Syncytin-2	FW	ATGGGCCTGCTCCTGCTGGT
	REV	TTAGAAGGGTGACTCTTGAATATT
HML-2	FW	TCAGCTTCCTGTTTGGATACCC
	REV	GCCTTGAGATTCTGTTAATVTAT
ASCT-2	FW	ATGAACATCCTGGGCT
	REV	CATGACTGATTCCTTCT
MFS2A	FW	ATGGCAAAGGAGAAG
	REV	CTGGCTAGCATCCTC

Primer FW: 5'-Primer; Primer REV: 3'-Primer.

Tabelle 2.5: Primer für die Klonierung in den pCG-Vektor.

Primer		Sequenz 5'-3'	Restriktionsenzyme
Syncytin-1	FW	GATAGGTCGACCGGCCGCCACCATGGCCCT CCCTTAT	Sal-I
	REV	TCAGCAGGAAGCAGTTATCCATATGACGTC CCAGACTATGCCTGACTGCAGGATAG	Pst-I
Syncytin-2	FW	GATAGGTCGACCGGCCGCCACCATGGGCCT GCTCCT	Sal-I
	REV	AAGAGTCACCCTTCTATCCATATGACGTCCC AGACTATGCCTGACTGCAGGATAG	Pst-I
HML-2	FW	GATAGTTAATTAACGGCCGCCACCATGAAC CCATCAGAG	Pac-I
	REV	TGTTACTGTGTCTGTGTATCCATATGACGTC CCAGACTATGCCTGACTCGAGGATAG	Xho-I
ASCT-2	FW	GATAGTCTAGACGGCCGCCACCATGAACAT CCTGGGCT	Xba-I
	REV	CTATCCTGCAGTCAGGCATAGTCTGGGACG TCATATGGATACATGACTGATTCCTTCT	Pst-I

MFSD2A	FW	GATAGTTAATTAACGGCCGCCACCATGGCC AAAGGAGAAG	Pac-1
	REV	CTATCCTCGAGTCAGGCATAGTCTGGGACG TCATATGGATAGAGGATGCTAGCCAG	Xho-1

Primer FW: 5'-Primer; Primer REV: 3'-Primer.

2.5. siRNAs

Die siRNA-Sequenzen wurde mit Hilfe Online-Programm BLOCK-iT™ RNAi Designers von Life Technologies generiert und über Sigma-Aldrich bestellt (Tabelle 2.6)

Tabelle 2.6: HERV-Hüllprotein-spezifische siRNA-Sequenzen.

Primer		Sequenz 5'-3'
siRNA-Syncytin-1	Oligo	CUGGUAAGCCUAAUUUAAUU[dT][dT]
	Oligo_as	AAUUAAAUAGGCUUACCAG[dT][dT]
siRNA-Syncytin-2	Oligo	CCUACCGCAUCCUGAUUU[dT][dT]
	Oligo_as	AAAUCAGGAUGGCGGUAGG[dT][dT]
siRNA-HML-2	Oligo	CCGCCAGUAGCCUAUCAAU[dT][dT]
	Oligo_as	AUUGAUAGGCUACUGGCGG[dT][dT]

2.6. Antikörper

2.6.1. Unmodifizierte Primärantikörper

Name	Hersteller	Klon	Isotyp/Ursprung	FACS	IF
α -Syncytin-1/HERV-W	Bioss	polyklonal	Kaninchen	1:50	1:100
HERV-FRD Antibody (N-Terminus)	Abgent	polyklonal	Kaninchen	1:50	1:100
α -HERV-K envelope protein. IgG fraction	Austral Biologicals	monoklonal	Maus	1:50	1:100
α -Neutral Amino Acid Transporter	EMD Millipore	polyklonal	Kaninchen	1:50	1:100
α -Human SLC1A5	Creative BioMart	polyklonal	Kaninchen	1:50	1:100
MFSD2A α -Human (C-Terminus) Antibody	LifeSpan BioSciences	polyklonal	Kaninchen	1:50	1:100
α -Phosphotyrosine (Klon 4G10)	EMD Millipore	monoklonal	Maus	-	1:100
α -LFA-1/CD11a (Klon NKI-L15)	LifeSpan BioSciences	monoklonal	Maus	1:100	-
α -ICAM (Klon P2A4)	Chemicon	monoklonal	Maus	1:100	-
Purified NA/LE α -Human CD3 ⁺ (Klone UCHT1)	BD	monoklonal	Maus	1:1000	-
Purified NA/LE α -Human CD28 ⁺ (Klon CD28.2)	BD	monoklonal	Maus	1:1000	-

2.6.2. Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Klon	Isotyp/Ursprung	FACS	IF
Alexa Fluor 647 F(ab') ₂ fragment of goat α -rabbit IgG (H+L)	Invitrogen	polyklonal	Ziege	1:200	1:200
Alexa Fluor 488 goat α -rabbit IgG (H+L)	Invitrogen	polyklonal	Ziege	1:200	1:200
Alexa Fluor 488 rabbit α -mouse IgG (H+L)	Invitrogen	polyklonal	Ratte	1:200	1:200

2.6.3. Modifizierte Primärantikörper

Name	Hersteller	Klon	Isotyp/Ursprung	FACS	IF
α -human CD3 ⁺ FITC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	1:200
α -human CD3 ⁺ APC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	1:200
α -human CD11c ⁺ FITC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	1:200
α -human CD11c ⁺ APC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	1:200
α -human CD40 ⁺ FITC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	-
α -human CD40 ⁺ APC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	-
α -human CD83 ⁺ FITC	BD	monoklonal	Maus	1:100	1:200
α -human CD86 ⁺ FITC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	-
α -human CD80 ⁺ FITC	ImmunoTool	monoklonal	Maus	1:100	-
α -human HLA-DR ⁺ FITC	ImmunoTec	monoklonal	Maus	1:100	1:200
α -human CD4 ⁺ FITC	ImmunoTec	monoklonal	Maus	1:100	-
α -human CD8 ⁺ FITC	ImmunoTec	monoklonal	Maus	1:100	-

2.7. Fluoreszierende Farbstoffe

Name	Hersteller	Spezifische Färbung von	FACS	IF
Phalloidin 594	Molecular Probes	F-Aktin	1:50	1:40
CFSE	Molecular Probes	Intrazelluläre Lysin Reste	1:2000	1:2000
DAPI	Bio-Rad	Zellkern	-	1:200
Octadecyl Rhodamine B Chloride (R18)	Life Technologies	Membran	-	1:200

2.8. Zellkulturmedien und Zusätze

Die Zellkulturmedien sowie das ATV, PBS und Versen wurden in der Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg hergestellt.

2.8.1. Eukaryotische Zellen

Medium	Hersteller
RPMI 1640	Medienküche
MEM	Medienküche
5,6 % Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Medienküche
ATV	Medienküche
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin (100 I.E./ml)	Medienküche
Interleukin 4 (IL-4)	Miltenyi Biotech
GM-CSF	Immunex
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Staphylococcal enterotoxin B from <i>Staphylococcus aureus</i> (SEB)	Sigma-Aldrich

RPMI 1640 und MEM wurden mit 5,6 % NAHCO₃ sowie 100 I.E Penicillin und Streptomycin versetzt. Zusätzlich wurde das RPMI 1640 mit 10 % FKS und das MEM mit 5 % FKS versehen.

2.9. Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton
	171 mM NaCl
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
Medium	Zusammensetzung
LB Agar	wie LB Medium
	1,5 % (w/v) Agar-Agar

Für die anschließende Selektion wurde das LB/Agar-Medium nach dem Autoklavieren mit 50 µg/ml Ampicillin angereichert.

2.10. Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
50 x TAE-Puffer	2,0 M Tris pH 8,0
	0,1 M EDTA
	1,0 M Essigsäure

Name	Zusammensetzung
ATV	136,9 mM NaCl
(Medienküche)	5,4 mM KCl
	5,6 mM D(+)-Glucose
	6,9 mM NaHCO ₃
	21,5 µM Trypsin
	0,7 mM Versen

Name	Zusammensetzung
FACS-Puffer	0,5 % (w/v) BSA
(Medienküche)	0,02 % (v/v) NaN ₃
	in PBS (Ca ²⁺ - and Mg ²⁺)

Name	Zusammensetzung
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO in FKS

Name	Zusammensetzung
Mini-Präparationspuffer	
Lösung 1	1 M Tris pH 7,5
	0,5 M EDTA pH= 8,0 (4 °C)
	1 ml RNase 10 mg/ml
Lösung 2	0,2 M NaOH
	1 % (w/v) SDS
Lösung 3	3,0 M Kalium-Acetat
	pH 5,5 mit Essigsäure einstellen
Lösung 4	0,1 M Tris pH 6,4
	0,5 M EDTA pH 8,0
	2,1 % (v/v) Triton X-100
	77,3 M Geno Cyanate
DIA Erde	3,3 M Diatomeen Erde
	1% (v/v) HCl
Waschpuffer	5 M NaCl
	1 M Tris pH 7,5
	0,5 M EDTA pH 8,0
	10 % (v/v) EtOH

Name	Zusammensetzung
NTE-Puffer	1 mM NaCl
	0,1 M Tris, pH 7,4
	0,01 M EDTA

Name	Zusammensetzung
Paraformaldehyd (4 %)	13,3 M Paraformaldehyd In PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei)

Name	Zusammensetzung
PBS	1,4 M NaCl 26,8 mM KCl 71,9 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 14,7 mM KH ₂ PO ₄

Name	Zusammensetzung
Saponin-Puffer	0,33 Saponin In PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei)

Name	Zusammensetzung
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.5 1 mM EDTA

Name	Zusammensetzung
Trypanblau	0,25 % (w/v) in PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei)

Name	Zusammensetzung
Versen	536,6 µM KCl
(aus hausinterner Medienküche)	293,9 µM KH ₂ PO ₄ 805,9 µM Na ₂ HPO ₄ 28,1 mM NaCl 136,9 µM Versen

2.11. Kits

Name	Hersteller
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Endofree® Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
FlowCytomix™	eBioscience
illustra™ pureTaq Ready-To-Go PCR Beads	GE Healthcare
NucleoSpin® Extract II Kit (PCR Clean-up)	Macherey-Nagel
Phusion High-Fidelity PCR Kit	Finnzymes
RNeasy® Mini Kit	Qiagen

2.12. Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht anders angegeben wurden Chemikalien und Reagenzien von Sigma Aldrich oder Applichem bezogen.

Name	Hersteller
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
DharmaFECT 1 Transfektions Reagent	ThermoScientific
EDTA	Sigma-Aldrich
Fluoromount-G	Southern Biotech
GelRed™	Biotium
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich
jetPEI™ Cationic polymer transfection reagent	Polyplus Transfection
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
[methyl-3H] Thymidine (37 MBq in 1000 µl)	Hartmann Analytik
TRIzol® RNA Isolation Reagents	Life Technologies
Trypton	Becton Dickinson

2.13. Plastikware und Verbrauchsmaterialien

Falls nicht anders angegeben wurde Plastikware und Verbrauchsmaterialien von BD-Falcon, Greiner bio-one, Sarstedt oder Eppendorf verwendet. Zellkultur Plastikware wurde von Greiner bio-one und die Chamber SlidesLabTEK II wurden von Nunc benutzt.

2.14. Geräte

Name	Hersteller
FACS Calibur - Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop DM IRE2	Leica
Harvester96® MACH 3	Tomtec
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 780	Zeiss
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz
PCR-Maschine, PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research (BioRad)
Sequenzierapparatur ABI PRISM® 3100 x genetic Analyzer	Advanced Biolab Service
Szintillationszähler MicroBeta2™	Perkin Elmer

2.15. Software

Name	Hersteller
ApE – A plasmid Editor v1.17	Wayne Davis
Cell Quest Pro	Becton Dickinson

FlowCytomix Pro 2.4	eBioscience
FlowJo	Tree Star Inc.
LSM Image Browser	Zeiss
Prism	GraphPad
ZEN 2012	Zeiss

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien, sowie primäre Zellen wurden in Plastik- Zellkulturflaschen oder -Zellkulturplatten in einem Brutschrank kultiviert, welcher eine wasserdampfhaltige Atmosphäre generierte und eine konstant 37°C warme, sowie 5 % CO₂-reiche Umgebung hatte.

3.1.1. Zellkultur von Zelllinien

Die verwendeten adhären Zellen (CHO-, BeWo- und JEG-Zellen; Tabelle 2.1) wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit ATV gewaschen und zum Ablösen mit frischem ATV eine min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren ab gespült, zentrifugiert (5 min, 300 x g), in frischem Medium resuspendiert und 1 : 10 mit frischem Medium verdünnt.

3.1.2. Bestimmung der Lebendzellanzahl

Der Vitalfarbstoff Trypanblau bindet an DNA im Zytoplasma toter Zellen und färbt diese blau. Dazu wurde eine abgelöste Zellsuspension 1 : 4 mit Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Mithilfe eines Lichtmikroskops wurde die Zellanzahl ungefärbter lebender Zellen bestimmt. Die Lebendzellanzahl wurde anhand von folgender Formel berechnet:

$$\text{Lebendzellanzahl} = \frac{\text{gezählte Zellanzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate.}}$$

3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden ungefähr 5×10^6 abgelöste Zellen zentrifugiert (5 min, 300 x g), in 1 ml 10 % FKS/DMSO-Lösung resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden sofort mittels einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox zum langsamen Herunterkühlen auf -80°C abgekühlt und in Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen kryokonservierter Zellen wurden diese im 37°C Wasserbad kurz aufgetaut und sofort mit 10 ml vorgewärmten Medium gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min; 300 x g), um das toxische DMSO zu entfernen, wurde das Zell-Pellet in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.4. Isolation peripherer Blut mononukleärer Zellen (PBMCs)

Periphere mononukleäre Blut-Zellen aus dem Blut (PBMCs) wurden von der Transfusionsmedizin der Universität Würzburg aus Blut von gesunden, freiwilligen Spendern mittels eines Leukozytendepletionsfilters gewonnen. Das ca. 7 ml Leukozytenkonzentrat wurde mit Versen auf 50 ml aufgefüllt und langsam auf zwei 50 ml Röhrchen mit 9 ml vorgelegtem Ficoll (Histopaque 1077) gegeben. Durch eine Gradientenzentrifugation (30 min; 300 x g; mit 2 min Anlauf/Bremse) wurden die PBMCs von Blutplasma und Erythrozyten getrennt. Die gewonnenen PBMCs wurden anschließend dreimal mit vorgewärmten PBS gewaschen (5 min; 300 x g).

3.1.5. Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten *in vitro*

Für die *in vitro* Differenzierung von dendritischen Zellen (moDCs) aus Monozyten wurden Monozyten aus PBMCs mittels Adhärenz-Selektion isoliert. Dafür wurden PBMCs in 25 ml RPMI/10 % FKS aufgenommen und in eine 175 cm² Zellkulturflasche überführt. Nach drei Stunden adhärten die Monozyten an den Boden der Zellkulturflaschen, im Überstand befanden sich die PBLs (periphere Blut-Leukozyten) bestehend aus B- und T-Zellen sowie NK-Zellen. Der Überstand (PBLs) wurde abgenommen und diente als Quelle für die Aufreinigung von T-Zellen. Die Monozyten wurden dreimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit frischem 25 ml RPMI/10 % FKS versetzt. Nach 24 Stunden lösten sich die Monozyten von dem Zellkulturflaschenboden wieder ab und wurden gezählt. Die Monozyten wurden in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml für die Differenzierung in DCs eingesetzt. Die Differenzierung zu unreifen DCs (iDCs) wurde mittels Zytokinausreifung (500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 in das RPMI/10 % FKS Medium) erreicht. Das Zytokin-haltige Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach 5 Tagen waren die Monozyten zu iDCs differenziert wie anhand der Expression von Oberflächenmarkern (CD11c⁺, HLA-DR⁺, CD86^{niedrig}) mittels Durchflusszytometrie überprüft werden konnte. Die Reinheit der Kultur wurde durch die Abwesenheit von CD3⁺ T-Zellen in der DC-Zellkultur mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 3.1).

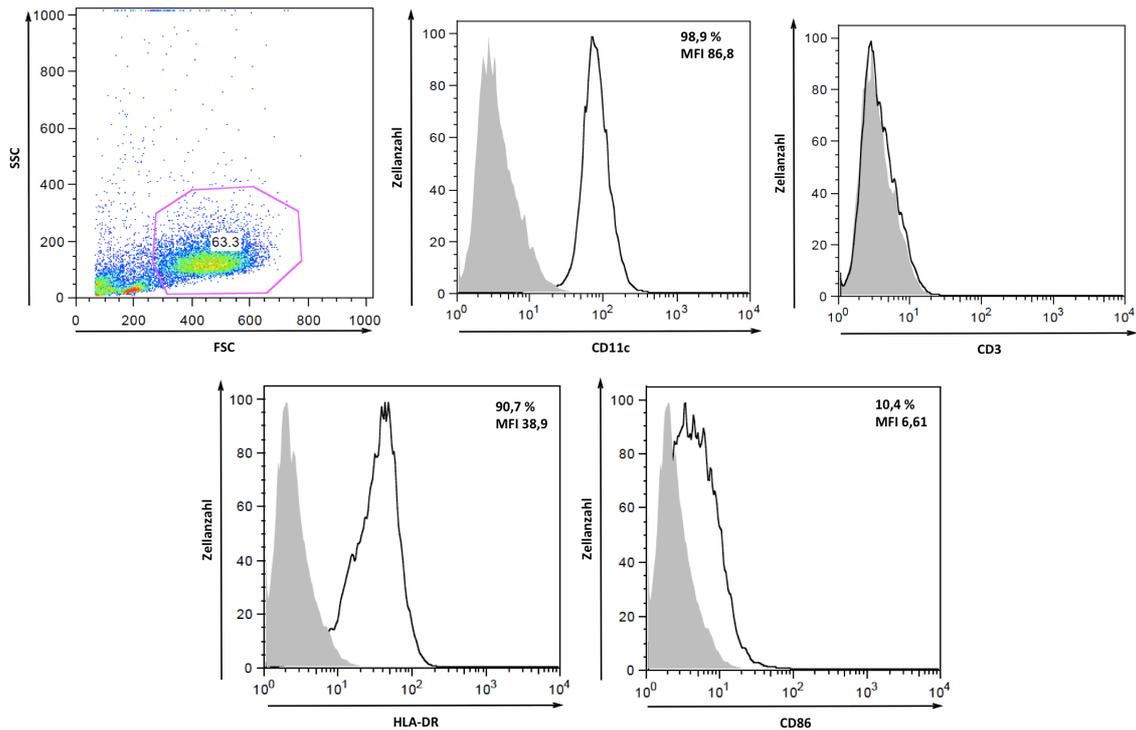


Abbildung 3.1: Charakterisierung von iDCs.

moDCs wurden nach fünf Tagen in GM-CSF- und IL-4-reicher Zellkultur auf die Expression von Oberflächenmolekülen ($CD11c^+$, $HLA-DR^+$, $CD86^{\text{niedrig}}$) mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die Reinheit wurde mittels Abwesenheit von $CD3^+$ T-Zell-Oberflächenmarkern bestimmt.

Die iDCs wurden mittels Zugabe von 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) zu reifen DCs (mDCs) stimuliert und nach 24 Stunden anhand hochregulierter Expression mDC-typischer Oberflächenmoleküle ($CD86^{\text{hoch}}$, $CD80^+$, $CD83^+$) in der Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 3.2).

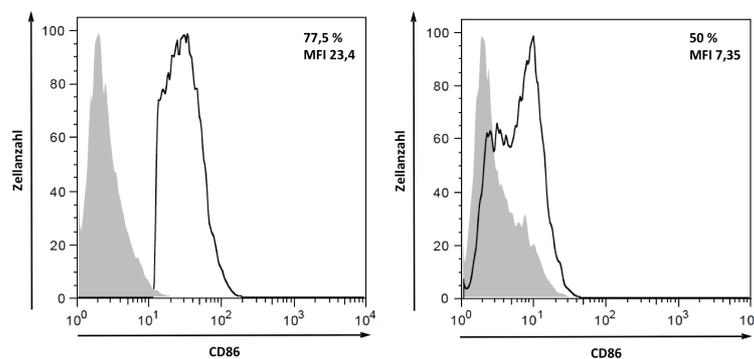


Abbildung 3.2: Charakterisierung von mDC.

moDCs wurden 24 Stunden nach LPS-Stimulation auf die Expression von Oberflächenmolekülen ($CD83^+$, $CD86^{\text{hoch}}$) mittels Durchflusszytometrie überprüft.

3.1.6. Aufreinigung und Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen wurden aus PBLs anhand von Nylonwolle isoliert. Dabei weisen B-Zellen eine höhere Bindungsaffinität als T-Zellen auf. Ungefähr 2×10^8 PBLs wurden in vorgewärmtem RPMI/5 % FKS Medium aufgenommen und in eine 50 ml Spritze überführt, welche mit 2 g Nylonwolle ausgefüllt und sterilisiert worden war. Um ein Auslaufen zu verhindern wurde am unteren Ende ein Plastikschlauch befestigt und mit einer Metallklammer verschlossen. Vor Zugabe der PBLs wurde ca. 20 ml Medium zu der Nylonwolle in der Spritze vorgelegt und danach die PBLs in 7 ml Medium zugegeben. Anschließend wurde die Säule bei 37°C 45 min inkubiert und anschließend zweimal mit RPMI/5 % FKS gewaschen. Damit wurden die ungebundenen T-Zellen aus der Säule gewaschen und die an die Nylonwolle gebundenen B-Zellen blieben in der Säule zurück. Der Durchfluss (T-Zellen) wurden zentrifugiert (5 min, 300 x g), gezählt und in einer Konzentration von 4×10^6 in RPMI/10 % FKS Medium kultiviert. Die T-Zell-Reinheit wurde mittels $CD3^+$ -T-Zell-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt ebenso sowie die Frequenz von $CD4^+$ -T-Helfer- und $CD8^+$ -zytotoxischen-T-Zellen (Abb. 3.3). Zur Aktivierung von T-Zellen wurden diese mit 40 ng/ml PMA und 0,5 μ M Ionomycin stimuliert.

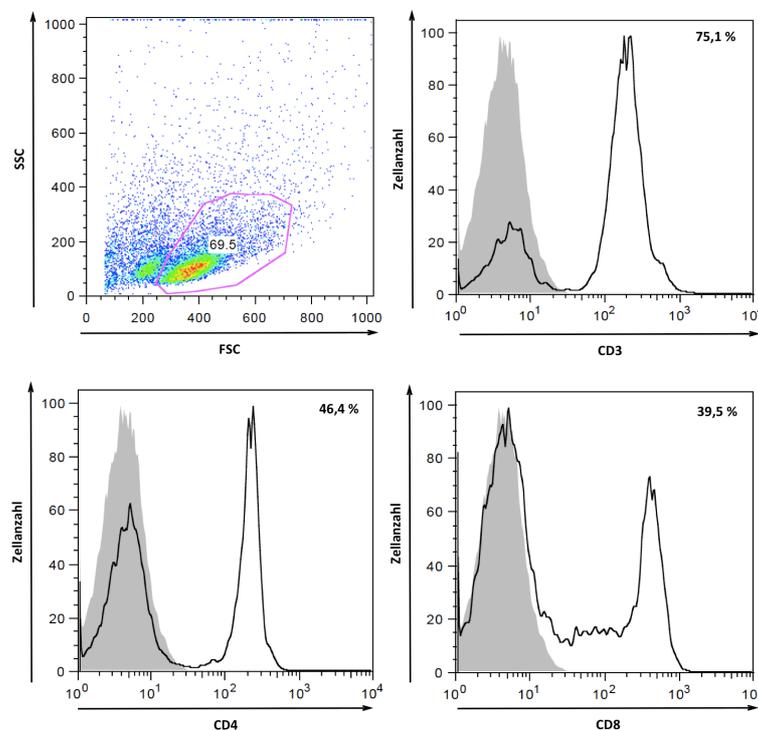


Abbildung 3.3: Charakterisierung primärer T-Zellen und deren Subpopulationen nach Aufreinigung. Die Reinheit wurde mittels $CD3^+$ -T-Zell-Oberflächenexpression bestimmt, ebenso wurde die Frequenz der $CD4^+$ -T-Helfer- und $CD8^+$ -zytotoxischen-T-Zellen ermittelt.

3.2. RNA-Methoden

3.2.1. RNA-Extraktion

Zytoplasmatische RNA wurde mittels Trizol[®] aus einem Zellpellet (1×10^7 Zellen; 5 min zentrifugiert, 300 x g) isoliert. Dafür wurde das Zellpellet in 1 ml Trizol[®] aufgenommen, 5 min bei Raumtemperatur (RT) lysiert und mit 200 μ l Chloroform versehen. Nach Mischen durch Invertieren und 3 min Inkubation wurde das Gemisch zentrifugiert (5 min, 16.000 x g) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die RNA mit 500 μ l Isopropanol 10 min inkubiert, danach zentrifugiert (10 min, 16.000 x g), mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 16.000 x g). Das Pellet wurde in 50 μ L RNA-freiem Wasser aufgenommen und 10 min auf 55°C erhitzt. Die RNA Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (Nanodrop).

3.2.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels des *First Strand cDNA Kits* durchgeführt. Dabei wurden 2 μ g RNA mit 1 μ l Oligo(dt)- bzw. random hexamer Primer gemischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden 1 x Reaktionspuffer, 1 mM dNTPs, Ribolock RNase Inhibitor (1 U/ μ l) und M-MalVRT (2 U/ μ l) hinzugefügt, eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend 5 min auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurde ein DNA-Fragment mittels zyklischer Wiederholung von drei Schritten amplifiziert: Denaturierung (DNA-Doppelstrang wird durch hohe Temperaturen einzelsträngig), Annealing (spezifische Primer binden an die einzelsträngige DNA) und Elongation (Polymerase bindet an den Primer und repliziert den einzelsträngigen DNA-Strang zu einem neuen doppelsträngigen DNA-Fragment). Diese Schritte werden 35 - 40 x wiederholt. Aufgrund der Korrekturlese-Aktivität der verwendeten Phusion-Polymerase wurde die Insertion von Mutationen während der PCR verhindert. Die Zusammenstellung der PCR-Reaktion ist in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Phusion-PCR Reaktion.

Komponente	Endkonzentration
5x Phusion HF Buffer	1x
10 mM dNTPs	200 μ M
Primer FW	0.5 μ M
Primer REV	0.5 μ M
DNA-Fragment	2 μ g
Phusion DNA-Polymerase (2 U/ μ l)	0,01 U/ μ l
H ₂ O	ad

Primer FW: 5'-Primer (FW: engl: forward); Primer REV: 3'-Primer (REV: engl: reverse)

Tabelle 3.2: PCR-Reaktionsprogramm für den ThermoCycler.

	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	98°C	30 sec	1
Denaturierung	98°C	10 sec	25
Annealing	65°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	10 min	1

Die Primer-Paare wurden für eine optimale Schmelztemperatur von 65⁰C generiert. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem ThermoCycler PTC-200 anhand des Programmes aus Tabelle 3.2 durchgeführt.

3.3.2. DNA-Agarose-Gelelektrophorese & DNA-Aufreinigung

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese trennt DNA-Fragmente nach ihrer Größe anhand ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Spannungsfeld. Dafür wurde ein 1,5 % Agarose/TAE-Gel hergestellt und mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Gel-Red (1:30000) versehen. Ungefähr 1 μ l des PCR-Produktes wurde zusammen mit 6 x Ladepuffer auf das Agarosegel aufgetragen und zwei Stunden bei 120 mV aufgetrennt. Die DNA-Fragmente konnten anschließend unter UV-Licht visualisiert werden. Das gewünschte Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels NucleoSpin® Extract II Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dafür wurde das Gelstück unter Hitze aufgelöst, die DNA an eine Säule gebunden, gewaschen und in 40 μ l Wasser eluiert.

3.3.3. Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Der Ansatz des Restriktionsverdaus (Tabelle 3.3) wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend auf einem Agarosegel überprüft. Die DNA wurde anschließend wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben ausgeschnitten und aufgereinigt.

Tabelle 3.3: Übersicht des verwendeten Restriktionsverdau.

Reaktionsansatz	Doppelverdau	
	DNA-Fragment	Vektor
RE-Puffer (10x Tango)	1 x	1 x
DNA	100 ng/ μ l	100 ng/ μ l
Restriktionsenzym	je 1 U/ μ l	je 2 U/ μ l
Wasser	ad 50 μ l	ad 250 μ l

Das DNA-Fragment und der Vektor wurden an den durch die Restriktionsenzyme spezifisch verdauten Stellen ligiert. Hierfür wurde das DNA-Fragment in gleicher Menge oder im dreifachen Überschuss zur Vektor-DNA eingesetzt (Tabelle 3.4). Die Ligationsreaktion wurde eine Stunde bei RT gestartet und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tabelle 3.4: Übersicht über die Ligationsreaktion.

Reaktionsansatz	1:1 Ligation	1:3 Ligation
10x T4 DNA-Ligasepuffer	3 μ l	3 μ l
50 % PEG	3 μ l	3 μ l
Vektor	100 ng	50 ng
DNA-Fragment	100 ng	150 ng
T4 DNA Ligase	1,5 μ l	1,5 μ l
Wasser	auffüllen auf 30 μ l	auffüllen auf 30 μ l

3.3.4. Transformation kompetenter Bakterien und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA und Sequenzierung

Bei der Transformation werden Plasmide zur Vermehrung in Bakterien eingeführt. 100 μ l kompetente *E.coli* XL-10 Bakterien wurden mit 10 μ l der Ligationsreaktion aus Abschnitt 3.3.3 gemischt, 30 min auf Eis inkubiert, 30 sec auf 42°C erhitzt und anschließend wieder auf Eis 5 min abgekühlt. Danach wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium 2 Stunden bei 37°C in einem Schüttler (225 rpm) inkubiert, auf eine Selektionsplatte (LB-Agar mit Selektionsantibiotikum, hier: Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bis zur Bildung von Kolonien bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde eine Bakterienkolonie ausgewählt und in 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. DNA, nicht aber RNA, Proteine und Unreinheiten bindet an eine Membran und wird anschließend eluiert, in Endotoxin-freiem Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt. Plasmide wurden nachfolgend nach dem Prinzip von Sanger einer Sequenzanalyse unterzogen. Dafür wurde das BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit nach Herstellerangaben benutzt. Es wurde ungefähr 1 ng DNA eingesetzt und Sequenzierungsprimer im Abstand von ca. 600

Basenpaaren verwendet bzw. gewählt. Die Amplifikation erfolgte mit dem Folgenden Reaktionsansatzes (Tabelle 3.5) und Thermocycler-Programms (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.5: PCR-Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR.

Komponente	Ansatz
Primer	0.5 μ M
5x Reaktions-puffer	1 x
BigDye	1 μ l
DNA	1 ng

Tabelle 3.6: PCR-Reaktionsprogramm für die Sequenzierungs-PCR.

	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	96°C	30 sec	29
Hybridisierung	50°C	15 sec	
Elongation	60°C	4 min	
Abkühlung	10°C	∞	1

Die Aufreinigung des PCR-Produkts sowie des Sequenzierungs-Produkts erfolgte in der diagnostischen Abteilung des Institutes der Virologie mittels dem ABI PRISM 3100 x genetic Analyzer.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Polyethylenimin (PEI)-Transfektion

Zur Generierung von Effektorzellen wurden CHO-Zellen mit PEI transfiziert. Dafür wurden 2 - 3 x 10⁵ CHO-Zellen/Napf in einer 6-Napf-Platte am Tag vor der Transfektion ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 3 μ g Plasmid und 12 μ g PEI in 150 mM NaCl gemischt, 20 min inkubiert und in 1 ml Antibiotika- und FKS-freiem MEM (Medium) zu den Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden in normalem MEM/5 % FKS Medium kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Expression des Transgens durchflusszytometrisch mit spezifischen Antikörpern bestimmt und die Zellen wurden sofort für funktionelle Analysen verwendet.

3.4.2. siRNA-Protein *Knock-down* in Chorionkarzinom-Zelllinien

Um die Expression eines oder mehrerer Proteine in Zellen, hier BeWo- oder JEG-Zellen, zu vermindern, wurden diese mit sequenz-spezifischen siRNAs mit DharmaFECT 1 nach Herstellerangaben transfiziert. Ungefähr 2,5 x 10⁵ BeWo-Zellen/Napf wurden in einer 6-

Napf-Platte am Vortag ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde 6 μ l DharmaFECT 1 und 20 μ M siRNA gemischt, 20 min inkubiert und in 1 ml Antibiotika-freiem RPMI/10 % FKS Medium zu den Zellen gegeben. Nach 96 Stunden wurde die Proteinexpression an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern bestimmt.

3.4.3. Fusionsassay

Um die Funktionalität der generierten Plasmide bzw. Fusionsproteine, sowie deren Rezeptoren zu überprüfen, wurden Fusionsassays durchgeführt. Dazu wurden CHO-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und nach 48 Stunden mit DAPI, einem Zellkernfarbstoff, gefärbt. Die Zellen wurden 5 min im Dunkeln bei RT mit DAPI inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Rezeptor- bzw. Fusionsprotein-exprimierende Zellpopulationen für 48 Stunden in einer 6-Napf Platte ko-kultiviert mit einer jeweiligen Zellkonzentration von 3×10^5 Zellen/Napf in der Gegenwart oder Abwesenheit von 100 μ M Forskolin. Als Kontrollen wurden CHO-Zellen verwendet, welche nur mit Fusionsprotein oder Rezeptor transfiziert wurden. Die mehrkernigen Zellen (*giant nuclei cells*) wurden mittels Zellkerngrößenbestimmung anhand des DAPI-Signals am Fluoreszenzmikroskop gezählt und mit ImageJ ausgewertet.

3.4.4. DC Ko-Kultivierung mit Effektorzellen und Zytokinmessung

iDCs (5×10^5) wurden mit Effektorzellen, entweder $2,5 \times 10^5$ HERV Hüllprotein-exprimierenden CHO-Zellen oder $2,5 \times 10^5$ BeWo- bzw. JEG-Zellen, 24 Stunden ko-kultiviert. Als Kontrollen wurden entweder unkonditionierte DCs oder DCs, die mit CHO-Leervektor-transfizierten Zellen kontaktiert worden waren, verwendet. Danach wurde mit LPS (100 ng/ μ l) stimuliert oder unstimulierte Zellen als Kontrollen verwendet. Nach weiteren 24 Stunden wurden Reifungsmarkern auf DCs durchflusszytometrisch oder Zytokine im Überstand von DCs bestimmt. Hierfür wurden Überstände zunächst bei -80°C gelagert, und mittels des eBioscience FlowCytomixTM multiplex bead System nach Herstellerangaben analysiert. Dafür wurden pro Ansatz 50 μ l unverdünnter Überstand verwendet, der vor der Analyse über Nacht bei 4°C gelagert wurde. Die Messung erfolgte am BD FACS CaliburTM und wurde mit der eBioscience FlowCytomix Pro Software analysiert.

3.4.5. T-Zell-Proliferation

3.4.5.1. T-Zell-Proliferation mittels CFSE-Färbung

Die Expansion primärer T-Zellen wurde generell mittels Bestimmung der CFSE-Intensität gemessen. Hierfür wurden die T-Zellen 5 min mit 2,5 μM CFSE in PBS bei RT inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen (5 min Zentrifugation; 300 x g), mit PMA (40 ng/ml) und Ionomycin (0,5 μM) stimuliert und wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/Napf in eine 6-Napf-Platte ausgesät. Nach fünf Tagen wurde die CFSE-Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie gemessen. Proliferierende Zellen verlieren das CFSE-Signal mit jeder Zellteilung und nicht-proliferierende Zellen behalten das CFSE-Signal. In Abbildung 3.4 ist exemplarisch die T-Zell-Proliferation nach 5 Tagen dargestellt.

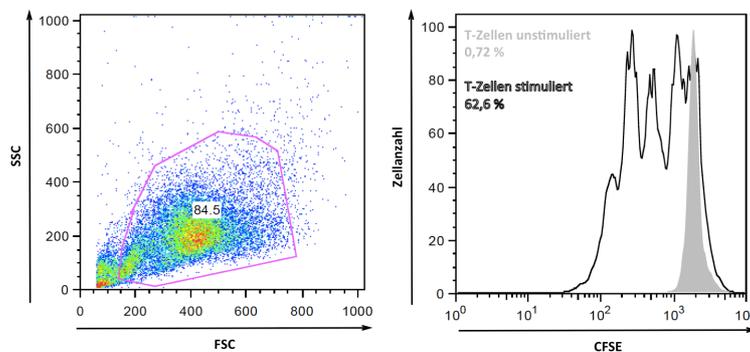


Abbildung 3.4: Exemplarische Darstellung der Messung der T-Zell-Proliferation. T-Zellen (entweder mit PMA/Ionomycin stimuliert oder unstimuliert) wurden mittels CFSE Signalintensität in der Durchflusszytometrie nach 5 Tagen analysiert.

Je nach Experiment wurden 1×10^6 T-Zellen mit Effektorzellen, entweder $2,5 \times 10^5$ HERV-Hüllprotein-exprimierende CHO-Zellen oder $2,5 \times 10^5$ BeWo- bzw. JEG-Zellen, für 24 Stunden vor der PMA/Ionomycin-Stimulation ko-kultiviert. Als Negativkontrollen wurden entweder unkonditionierte T-Zellen oder T-Zellen, die mit CHO-Leervektor-transfizierten Zellen kontaktiert worden waren, verwendet.

3.4.5.2. T-Zell-Aktivierung mittels α -CD3- und α -CD-28-Antikörper-Stimulation

Die TZR-vermittelte T-Zell-Aktivierung wurde mittels α -CD3- und α -CD28-Antikörper-Stimulation analysiert. Dafür wurde eine 96-Napf-Platte mit 200 μl Ziege- α -Maus IgG (25 μg in 50 mM Tris pH 8,7) eine Stunde im Brutschrank vorbehandelt und dreimal mit PBS gewaschen. Gleichzeitig wurden 5×10^5 primäre T-Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert und danach mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -CD3- und α -CD28-Antikörper gemischt und 20 Minuten auf Eis

inkubiert. Nach Abnehmen des Ziege- α -Maus IgG-Antikörpers von der 96-Napf-Platte wurden 100 μ l des frisch resuspendierten T-Zell-Antikörper-Mixes in die 96-Napf-Platte gegeben.

Nach zwei Tagen wurden die T-Zellen mit Tritium-markiertem-Thymidin (radioaktivem ^3H -Thymidin) 16 Stunden inkubiert und anschließend wurde die T-Zell-Proliferation anhand der Inkorporation von radioaktivem ^3H -Thymidin mittels eines Szintillationszählers MicroBeta2TM gemessen.

Je nach Experiment wurden 5×10^5 primäre T-Zellen mit 5×10^4 CHO-Zellen 24 Stunden vorbehandelt. Als Negativkontrolle wurden unkonditionierte T-Zellen verwendet. Für die T-Zell-Aktivierung wurden T-Zellen von den Effektorzellen zurückgewonnen.

3.4.5.3. Mixed Leukocyte Reaction (MLR)

Bei der MLR werden APCs mit allogenen T-Zellen ko-kultiviert, welche die MHC-II Peptid-Komplexe der APCs als fremd erkennen, aktiviert werden und proliferieren.

$2,5 \times 10^4$ DCs wurden mit LPS ausgereift und nach 24 Stunden mit 2×10^5 T-Zellen in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF in eine 96-Napf Platte mit rundem Boden pipettiert. Als Kontrollen dienten T-Zellen, die entweder ohne DCs oder mit unreifen DCs ko-kultiviert wurden. Nach vier Tagen wurden die Ko-Kulturen mit radioaktiv markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]$ Thymidin, 0,5 $\mu\text{Ci/Napf}$) 16 Stunden gepulst, mittels eines Zell-Harvesters (TomTEC Harvester96 MACH3) auf eine Filtermembran übertragen und die Menge an eingebautem Thymidin mit einem Szintillationszähler MicroBeta2TM gemessen.

3.4.6. Durchflusszytometrie

3.4.6.1. Oberflächenexpression

Für durchflusszytometrische Analysen der Oberflächenexpression wurden 1×10^5 Zellen in 50 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit primären oder direkt konjugierten Antikörpern 45 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Bei Verwendung eines unkonjugierten Antikörpers wurden die Zellen einmal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min zentrifugiert bei 300 x g), mit einem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper in 50 μ l FACS-Puffer 45 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert, mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min zentrifugiert bei 300 x g) und in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am BD FACS CaliburTM und wurde entweder mit der BD CellQuest Pro Software oder der FlowJo Software ausgewertet.

3.4.6.2. Intrazelluläre Proteinexpression

Für eine intrazelluläre Proteinanalyse wurden 1×10^5 Zellen mit $200 \mu\text{l}$ 4 % PFA/PBS bei 4°C fixiert und zweimal mit PBS gewaschen (5 min, $300 \times g$). Danach wurde nach dem Protokoll der Oberflächenfärbung vorgegangen, jedoch wurden die Antikörper nicht in FACS-Puffer verdünnt, sondern in Saponinpuffer. Alle anderen Schritte wurden beibehalten.

3.4.7. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenz wurden 3×10^4 Zellen auf eine 8-Napf Chamber-Slide (Nunc, Lab-TekII Chamber Slide) gegeben (für adhärente Zelllinien über Nacht, für primäre T-Zellen und DCs 20 min), welche mit 0,01 % Poly-L-Lysin vorbehandelt worden war. Die Zellen wurden in 4 % PFA/PBS bei RT fixiert und mit 0,01 % Triton X-100/PBS auf Eis 5 min permeabilisiert, mit 0,1 % BSA/PBS für 20 min auf RT blockiert und über Nacht mit spezifischen Antikörpern in $100 \mu\text{l}$ 0,1 % BSA/PBS bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit dem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper in $100 \mu\text{l}$ 0,1 % BSA/PBS 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Chamber Slide mit einem Objektglas und Fluoromount-G Medium eingedeckt.

3.4.8. Quantifizierung von DC/T-Zell-Konjugaten mittels Durchflusszytometrie

5×10^5 DCs wurden mit Superantigen (Staphylococcal enterotoxin B from *Staphylococcus aureus* (SEB) ($1 \mu\text{g/ml}$) 20 min bei 37°C beladen. Allogene T-Zellen wurden mit CFSE ($2,5 \mu\text{M}$) 5 min bei RT gefärbt, dreimal mit PBS gewaschen und in 10-fachem Überschuss (5×10^6) 20 - 30 min bei 37°C mit den mDC inkubiert. Als Positivkontrollen wurden unkonditionierte mDCs oder mDCs, die mit CHO-Zellen, die mit Leervektor-transfizierten ko-kultiviert worden, mit T-Zellen ko-kultiviert. Als Negativkontrollen wurden unkonditionierte iDCs oder iDCs, die mit CHO-Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren, mit T-Zellen ko-kultiviert. Die DC/T-Zell-Konjugate wurden mit 4 % PFA/PBS 10 min fixiert und direkt mittels BD FACS CaliburTM analysiert, indem der Prozentsatz CFSE-positiver T-Zellen in der DC-Population gemessen wurde, welches durch die FSC- und SSC-Einstellungen definiert wurde. (Abb. 3.5).

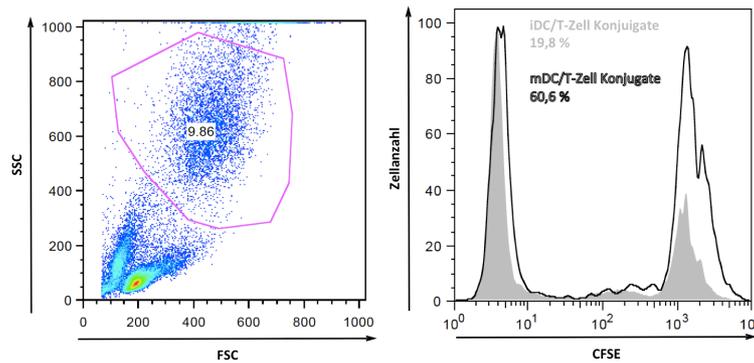


Abbildung 3.5: Exemplarische Darstellung der iDC/T-Zell- und mDC/T-Zell-Konjugat-Analyse mittels Durchflusszytometrie.

Die DC/T-Zell-Konjugate wurden anhand CFSE-positiver T-Zellen in der DC-Population durch die FSC- und SSC-Einstellungen gemessen.

3.4.9. Ca^{2+} -Mobilisierung in DC/T-Zell-Konjugaten

Die Calcium (Ca^{2+})-Mobilisierung in T-Zellen und damit die T-Zell-Aktivierung wurde durch die Markierung der T-Zellen mit dem Farbstoff Fluo-4 gemessen. Bei einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg steigt die Intensität des Fluo-4 Farbstoffes an und lässt sich durchflusszytometrisch bestimmen. T-Zellen wurden in 10 mM HEPES/HANKS ($-\text{Ca}^{2+}/-\text{Mg}^{2+}$) Medium mit pH 7,5 gewaschen. Danach wurden 5×10^6 T-Zellen/ml in 10 mM HEPES/HANKS ($-\text{Ca}^{2+}/-\text{Mg}^{2+}$)-Medium resuspendiert, mit 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Fluo-4 (stock 1 mM in DMSO) 30 min bei 37°C inkubiert, einmal mit PBS ($-\text{Ca}^{2+}/-\text{Mg}^{2+}$) gewaschen (5 min zentrifugiert bei 300 x g) und für erneut 30 min bei 37°C mit HEPES/HANKS ($-\text{Ca}^{2+}/-\text{Mg}^{2+}$)-Medium gewaschen. 5×10^6 Fluo-4 markierte T-Zellen wurden mit 5×10^5 SEB (1 μg , 20 min) beladenen DCs 20 – 30 min ko-kultiviert. Die Messung erfolgte wie im Abschnitt 3.4.9.1 beschrieben mittels Durchflusszytometrie.

3.4.10. DC/T-Zell-Interface Analyse

$2,5 \times 10^4$ mDCs wurden mit 1 μg SEB 20 min bei 37°C beladen und auf eine 8-Napf Chamber-Slide (Nunc, Lab-TekII Chamber Slide) gegeben, welche mit 0,01 % Poly-L-lysin vorbehandelt worden war. Nach 20 min wurden $2,5 \times 10^5$ allogene T-Zellen zugegeben. Nach 20 – 30 min wurden die Konjugate mit 4 % PFA/PBS bei RT 10 min fixiert, mit 0,01 % Triton X-100/PBS auf Eis 5 min permeabilisiert, mit 0,1 % BSA/PBS 20 min bei RT geblockt und über Nacht mit p-tyr-Antikörper und Phalloidin (konjugiert an ein 593 nm emittierendes Fluorochrom) in 100 μl 0,1 % BSA/PBS bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Konjugate dreimal mit PBS gewaschen, mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper α -Maus Alexa 488 in 100 μl 0,1 % BSA/PBS 45 min bei 4°C im Dunkeln

inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Objektglas und Fluoromount-G Medium eingedeckt. Die Proben wurden mittels konfokaler Mikroskopie (Zeiss LSM 780) analysiert und mit der Zeiss ZEN 2012 Software ausgewertet. Aufnahmen wurden mit einem 40 x Ölobjektiv (Plan-Apochromat) mit einem Laserlicht bei 488 nm und 584 nm gemacht. Die DC/T-Zell-Kontaktebene wurde durch Visualisierung von 20 – 30 Z-Stapeln in einem 0,15 µm Intervall analysiert. Eine 3D-Rekonstruktion der Z-Stapel wurde mittels eines integrierten Programms durchgeführt und für die Quantifizierung wurden 30 DC/T-Zell-Konjugate pro Probe ausgewertet.

3.5. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism4 benutzt. Statistische Signifikanz wurde mittels *one-way* ANOVA gefolgt von Bonferroni *post-hoc test* oder dem Student's T-Test berechnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ und ns für nicht signifikant).

4. Ergebnisse

HERV-Hüllproteine werden auf der Zelloberfläche von Trophoblasten exprimiert und haben fusogene Eigenschaften. Diese HERV-Hüllproteine fusionieren in einer Zell-Zell-Bindung mit ihren Fusionsrezeptoren, welche ebenfalls auf der Zelloberfläche von Trophoblasten exprimiert werden. Dadurch entstehen aus den einkernigen Cytotrophoblasten mehrkernige Syncytiotrophoblasten. Darüber hinaus wurde HERV-Proteinen eine immuntolerogene Funktion aufgrund ihrer ISD zugesprochen, die vermutlich über Zell-Zell-Kontakt vermittelt wird. Im Folgenden wird die modulatorische Funktion verschiedener HERV-Hüllproteinen auf diversen Immunzellen untersucht.

4.1. Expression der HERV-Hüllprotein-Rezeptoren auf Immunzellen

Der modulatorische Effekt der HERV-Hüllproteine wird wahrscheinlich über spezifische Rezeptorbindungen vermittelt, jedoch wurden bis dato lediglich Fusionsrezeptoren identifiziert, für die keine immunmodulierende Funktion beschrieben wurde.

Da diese Rezeptoren möglicherweise einen Beitrag zum modulatorischen Effekt von HERV-Proteinen leisten, wurde zunächst die HERV-Rezeptorexpression auf verschiedenen Immunzellarten analysiert. Die mRNA-Expression der HERV-Rezeptoren wurde nach RNA-Extraktion aus Immunzellen und nachfolgender cDNA-Synthese mittels einer RT-PCR gezeigt. Die Oberflächenexpression der Proteine wurde mittels Durchflusszytometrie sowie Immunfluoreszenz analysiert.

Monozyten, iDCs und mDCs exprimierten die mRNAs für die HERV-Rezeptoren ASCT-1, -2 (Rezeptoren für Syncytin-1) und MFSD2A (Rezeptor für Syncytin-2) (Abb. 4.1).

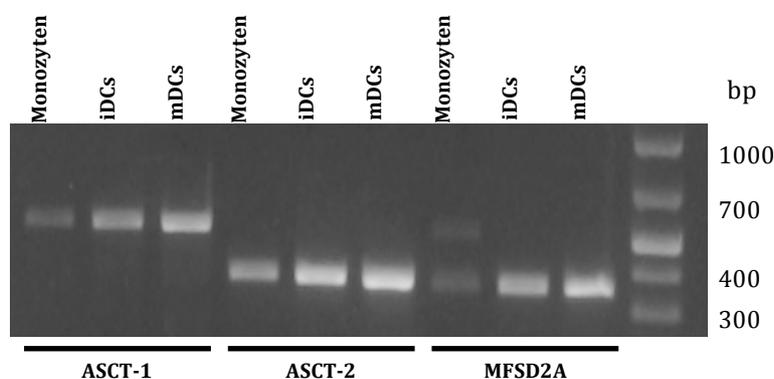


Abbildung 4.1: mRNA-Expression der HERV-Rezeptoren ASCT-1, -2 und MFSD2A. Die mRNA-Expression wurde in Monozyten, iDCs und mDCs mittels RT-PCR analysiert.

Für eine mögliche Zell-Zell-Bindung der HERV-Hüllproteine an die Zielzellen ist es wichtig, zusätzlich zur mRNA-Expression die Oberflächenexpression der Rezeptoren nachzuweisen. Alle analysierten HERV-Rezeptoren (ASCT-1, -2 und MFSD2A) wurden auf der Oberfläche von iDCs und T-Zellen exprimiert (Abb. 4.2). Die Anzahl der positiven Zellen war in der DC-Population höher als in der T-Zellpopulation. Dabei war die Frequenz der Zellpopulation, die positiv für MFSD2A war, höher im Vergleich zu ASCT-1 und -2 sowohl in der DC- als auch in T-Zellpopulation (DCs: 78,3 %; T-Zellen: 38,1 %). Die Frequenz der ASCT-1-positiven Zellen war am geringsten (DCs: 66,9 %; T-Zellen 26,0 %) und ASCT-2 wurde auf 64 % der DCs und 32,8 % der T-Zellen exprimiert.

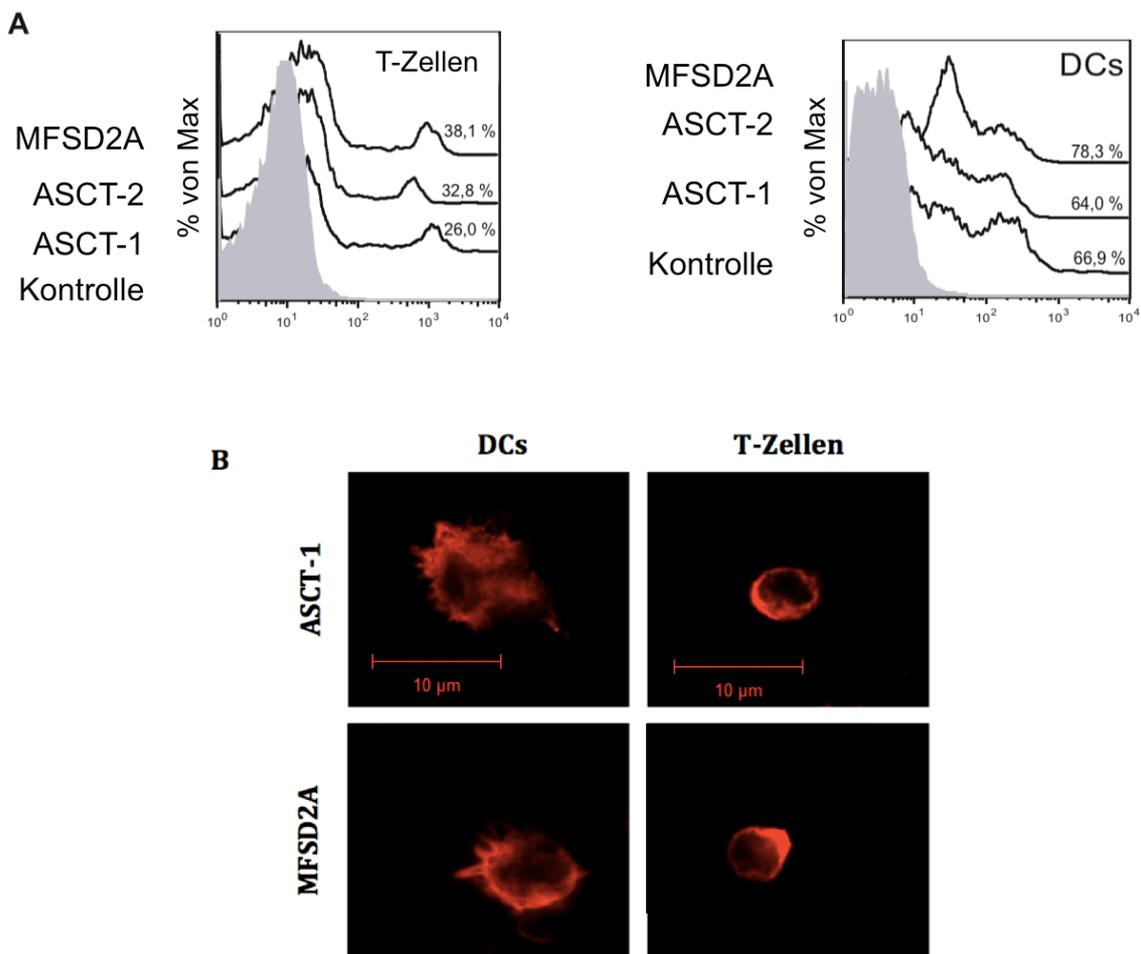


Abbildung 4.2: Proteinexpression der HERV-Rezeptoren ASCT-1, -2 und MFSD2A auf DCs und T-Zellen.

A. Oberflächenexpression der HERV-Rezeptoren wurde auf T-Zellen (rechts) und auf DCs (links) mittels Durchflusszytometrie gemessen. Analysiert wurden ausschließlich $CD3^+$ -T-Zellen und $CD11c^+$ -DCs. B. Exemplarische Darstellung der Proteinexpression von ASCT-1 und MFSD2A auf $CD11c^+$ -DCs und $CD3^+$ -Zellen mittels konfokaler Mikroskopie (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

4.2. Expression der HERV-Hüllprotein-Rezeptoren auf Effektorzellen

Chorionkarzinom-Zelllinien sind immortalisierte Zellen aus Trophoblastentumoren der Plazenta. Es wurde gezeigt, dass primäre Trophoblasten sowie Chorionkarzinom-Zellen HERV-Hüllprotein-mRNA und ebenfalls funktionelle HERV-Hüllproteine exprimieren.

Die Zelloberflächenexpression der HERV-Hüllproteine auf den Chorionkarzinom-Zelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Alle drei untersuchten HERV-Hüllproteine, Syncytin-1, -2 und HML-2, wurden auf der Oberfläche von den Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG vergleichbar stark exprimiert (Abb. 4.3). Dabei war die Oberflächenexpression der HERV-Hüllproteine auf BeWo-Zellen geringfügig höher verglichen mit JEG-Zellen (BeWo: Syncytin-1: 52,0 MFI (*mean fluorescence intensity*); Syncytin-2: 40,1; HML-2: 29,9 MFI; JEG: Syncytin-1: 36,8 MFI; Syncytin-2: 33,2 MFI; 25,2 MFI). Syncytin-1 war in BeWo- und JEG-Zellen das am höchsten und HML-2 das am schwächsten exprimierte HERV-Hüllprotein.

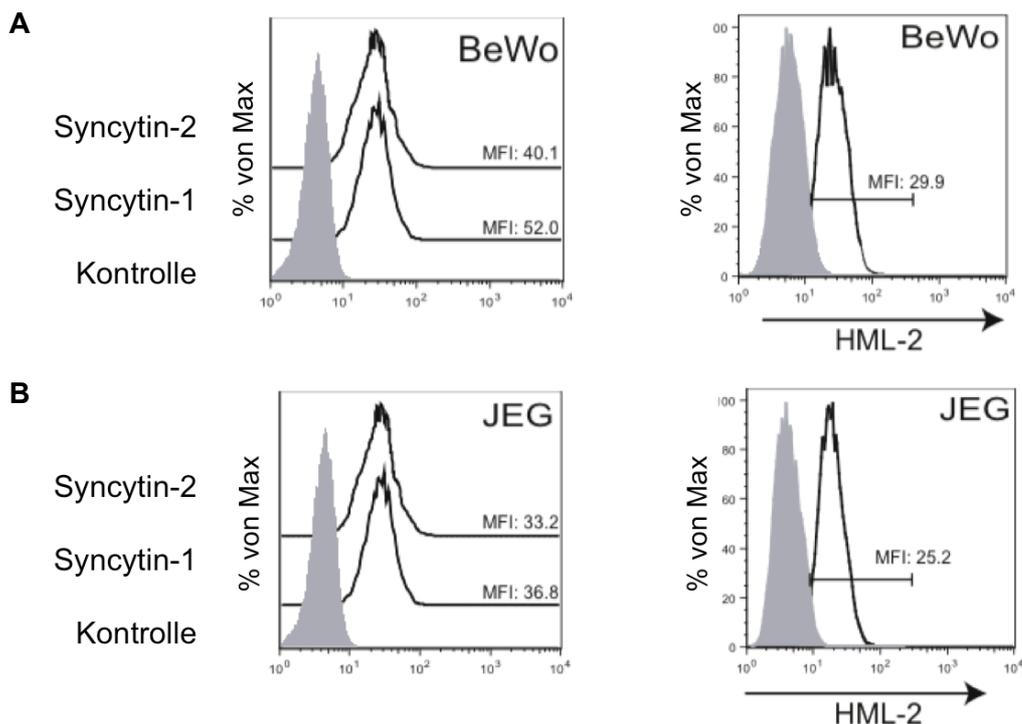


Abbildung 4.3: Oberflächenexpression der HERV-Hüllproteine Syncytin-1, -2 und HML-2 auf den Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG.

A. Die BeWo-Oberflächenexpression wurde von Syncytin-1 und -2 anhand von spezifischen Primärantikörpern und α -Kaninchen Alexa 647 nm Sekundärantikörpern (links) und die Oberflächenexpression von HML-2 wurde mittels spezifischer Primärantikörper und α -Maus Alexa 488 nm Sekundärantikörper (rechts) gemessen. B. JEG-Oberflächenexpression von Syncytin-1 und -2 (links) sowie HML-2 (rechts) wurde mit denselben Antikörpern wie in A durchgeführt. Die

Fluoreszenzintensität wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Um die Wirkung einzelner HERV-Hüllproteine zu untersuchen, wurden die Hüllproteine Syncytin-1, - 2 und HML-2 aus Chorionkarzinom-Zelllinien kloniert, da diese identische kodierende Sequenzen für HERV-Hüllproteine wie primäre Trophoblasten aufweisen.

Dazu wurde aus der Chorionkarzinom-Zelllinie BeWo zunächst RNA isoliert und diese mit spezifischen Primern, die die komplette kodierende Sequenz von Syncytin-1, -2 und HML-2 flankieren, revers transkribiert (siehe Tab. 2.3), um die mRNA-Expression dieser Hüllproteine mittels RT-PCR nachzuweisen (Abb. 4.4).

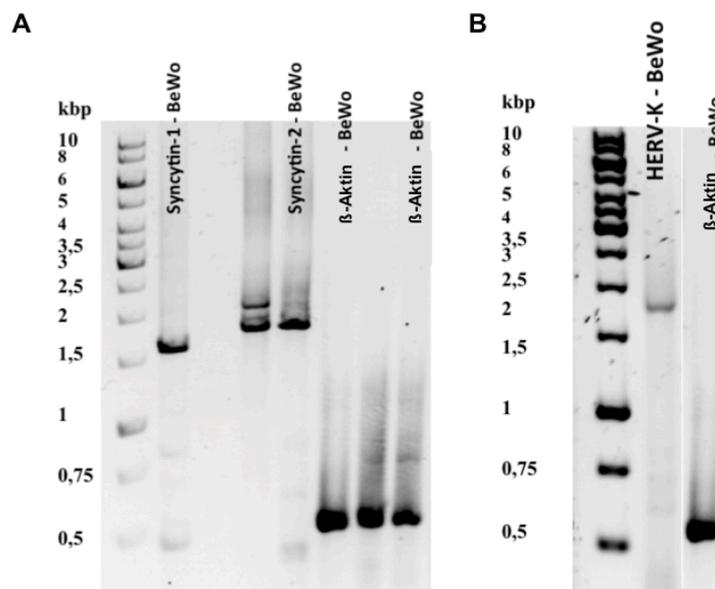


Abbildung 4.4: mRNA-Expression von Syncytin-1, -2 und HML2 in der Chorionkarzinom-Zelllinie BeWo.

Die mRNA-Expression von Syncytin-1 und -2 (A) und HML-2 (B) wurde in BeWo-Zellen mit einer β-Aktin-Kontrolle mittels RT-PCR analysiert.

Die mRNA-Expression für Syncytin-1, -2 und HML-2 in BeWo-Zellen wurde mittels RT-PCR nachgewiesen (Abb. 4.4).

Anschließend wurden diese cDNA-Fragmente mit Primern, welche mit spezifischen Restriktionsschnittstellen (Tabelle 2.3) versehen waren, mittels RT-PCR amplifiziert, auf ein Agarosegel aufgetragen und eluiert. Die PCR-Produkte wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pCG ligiert und das gewonnene Ligationsprodukt wurde in *E. coli* transformiert. Danach wurde das Plasmid mittels Maxi-Präparation gereinigt und sequenziert. Für funktionelle Experimente mit den HERV-Hüllproteinen wurden diese zunächst transient in HEK-Zellen exprimiert, die sich jedoch für weitere Analysen als nicht geeignet erwiesen,

da sie endogenes Syncytin-1 exprimierten. Dies ließ sich mittels Immunfluoreszenzfärbung und nachfolgender konfokaler Mikroskopie bestätigen (Abb. 4.5).

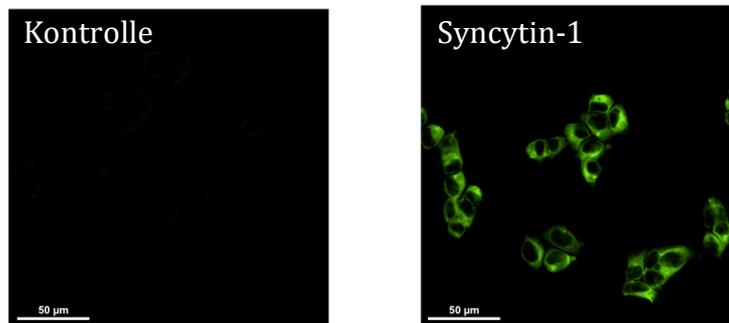


Abbildung 4.5: Syncytin-1-Expression in HEK-Zellen.

HEK-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem Syncytin-1 Primärantikörper, sowie einem α -Kaninchen Alexa 488 nm Sekundärantikörper inkubiert (rechts). Die Negativkontrolle wurde mit dem Sekundärantikörper α -Kaninchen Alexa 488 nm behandelt (links). Die Syncytin-1-Expression wurde mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

Da humane Tumorzellen und somit auch humane Zelllinien diverse HERV-Hüllproteine bzw. mutierte HERV-Hüllproteine exprimieren können, wurden HERV-Hüllprotein-negative CHO-Zellen als Akzeptoren für die transiente Expression der Effektorproteine Syncytin-1, -2, und HML-2 gewählt.

Eine Woche nach Transfektion mit Syncytin-1- oder -2-kodierenden Konstrukten wurden für das jeweilige Transgen die positiven Zellen mittels FACS-Sortierung isoliert und nach einer weiteren Woche in Kultur die Expression des Transgenes durchflusszytometrisch analysiert.

Die stabil-transfizierten CHO-Zellen waren nach einer Woche schwach positiv für die Oberflächenexpression von Syncytin-1 (MFI 4,8) oder Syncytin-2 (MFI 4,6) (Abb. 4.6-A). Das Oberflächen-Expressionsniveau in den CHO-Zellen war somit wesentlich niedriger als in den Chorionkarzinom-Zelllinien (siehe Abb. 4.4, Syncytin-1: 52,0 MFI, Syncytin-2: 40,1 MFI). Eine durchflusszytometrische Analyse permeabilisierter Transfektanten ergab, dass diese zwar zu 100 % positiv für das jeweilige Transgen waren, jedoch nur einen sehr geringen Anteil auf der Zelloberfläche exprimierten (Abb. 4.6-B). Um die Oberflächenexpression zu erhöhen, wurden die stabil-transfizierten CHO-Zellen mit 100 μ M Forskolin (FK) behandelt, das die Expressionsniveaus der HERV-Hüllproteine auf Chorionkarzinom-Zelllinien erhöht (Wice, *et al.*, 1990). Da die FK-Behandlung das Expressionsniveau der Hüllproteine nur leicht erhöhte und damit weit unter dem der Chorionkarzinom-Zelllinien blieb, wurden keine funktionellen Experimente mit den stabil-transfizierten CHO-Zellen durchgeführt (Abb. 4.6-A).

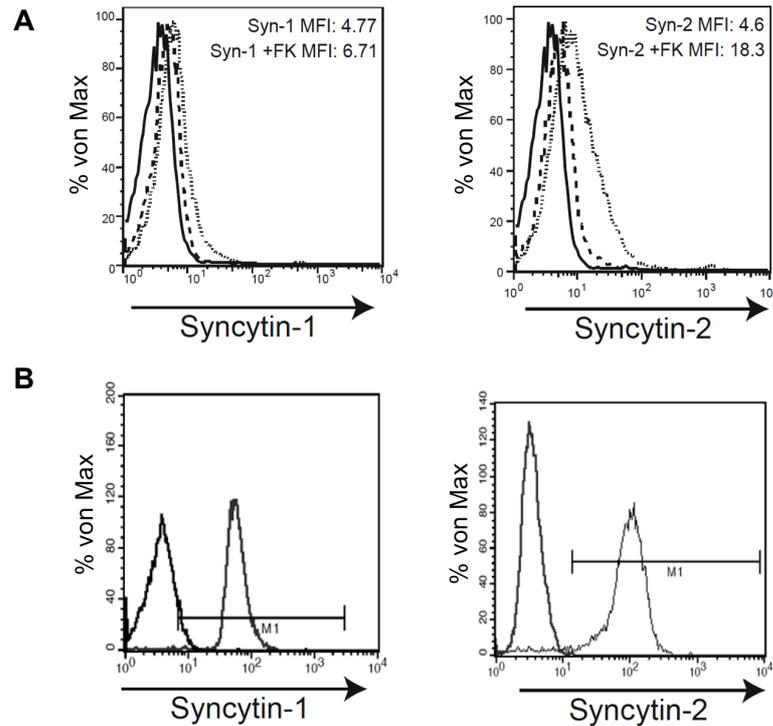


Abbildung 4.6: Expression von Syncytin-1 und -2 auf stabil-transfizierten CHO-Zellen. A. Oberflächenexpression von Syncytin-1 und -2 mit und ohne Forskolin-Behandlung. Die Syncytin-1 (links; gestrichelte Linie) und -2 (rechts; gestrichelte Linie) Oberflächenexpression wurde eine Woche nach FACS-Sortierung analysiert. Die schwarze Linie repräsentiert die Negativkontrolle, und die gepunktete Linie zeigt die Hüllproteinexpression nach 48-stündiger FK-Behandlung. B. Expression von Syncytin-1 und -2 in fixierten und permeabilisierten CHO-Zellen. Die linke Population repräsentiert die Negativkontrolle und die rechte Population die Syncytin-AK gefärbte Population der jeweiligen Histogramme. Die Proteinexpression wurde im Durchflusszytometer analysiert.

Für eine bessere Hüllprotein-Oberflächenexpression wurde in einem transienten Transfektionssystem die Expression der HERV-Hüllproteine analysiert. Syncytin-1, -2 und HML-2 waren 48 Stunden nach Transfektion vergleichbar stark auf den CHO-Zellen exprimiert (Abb. 4.7). Die Oberflächenexpression war mindestens 96 Stunden nach der Transfektion stabil, was für die nachfolgend beschriebenen funktionellen Analysen wichtig war. Ebenfalls war das Expressionsniveau der HERV-Hüllproteine auf den CHO-Zellen mit denen der Chorionkarzinom-Zelllinien 48 Stunden nach der transienten Expression vergleichbar. Im Folgenden werden die transient-transfizierten CHO-Zellen als Effektorzellen bezeichnet und als Kontrolle wurden CHO-Zellen verwendet, die mit Leervektor transfiziert worden waren, welche im Folgenden als CHO-Kontrollen bezeichnet werden.

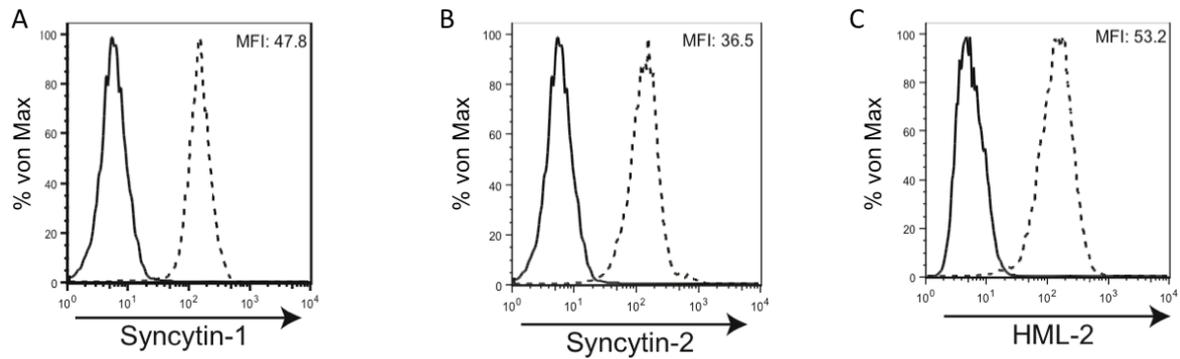


Abbildung 4.7: Oberflächenexpression von Syncytin-1, -2 und HML-2 auf transient-transfizierten CHO-Zellen.

Die Oberflächenexpression wurde 48 Stunden nach Transfektion von Syncytin-1 (A), Syncytin-2 (B) und HML-2 (C) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die schwarze Linie stellt die Negativkontrolle dar, die gestrichelte Linie zeigt die HERV-Hüllproteinexpression (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

4.3. Funktionelle Überprüfung der HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen

Als Fusionsproteine können HERV-Hüllproteine Rezeptor-abhängig die Ausbildung riesenkerniger Zellen *in vitro* vermitteln. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente war bekannt, dass Syncytin-1 mit dem Rezeptor ASCT-2 fusioniert und Syncytin-2 mit MFSD2A. Mittlerweile wurde eine Fusions-eigenschaft für HML-2 mit Melanom-Zellen nachgewiesen, jedoch nicht mit Trophoblasten (Huang, *et al.*, 2013). Der Rezeptor für HML-2 wurde bisher nicht identifiziert.

Die Funktionalität der generierten HERV-Hüllprotein-Plasmide wurde anhand ihrer fusogenen Eigenschaft in Fusionsexperimenten nachgewiesen. Dafür wurden CHO-Zellen mit Syncytin-1 oder dem Rezeptor ASCT-2 transfiziert. Die Oberflächenexpression von Syncytin-1 und ASCT-2 wurde 48 Stunden nach Transfektion im Durchflusszytometer überprüft. Unmittelbar vor der Ko-Kultur der Syncytin-1- und ASCT-2-exprimierenden CHO-Zellen wurden diese mit dem fluoreszierenden Zellkernfarbstoff DAPI gefärbt und zusätzlich mit 100 μ M Forskolin stimuliert, um eine höhere Fusionsrate zu erreichen. 48 Stunden nach Beginn der Ko-Kultur wurden die riesenkernigen Zellen im Fluoreszenzmikroskop gezählt. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl riesenkerniger Zellen in der CHO-Kontrolle von denen der Syncytin-1- und ASCT-2-transfizierten Zellen subtrahiert (Abb. 4.8).

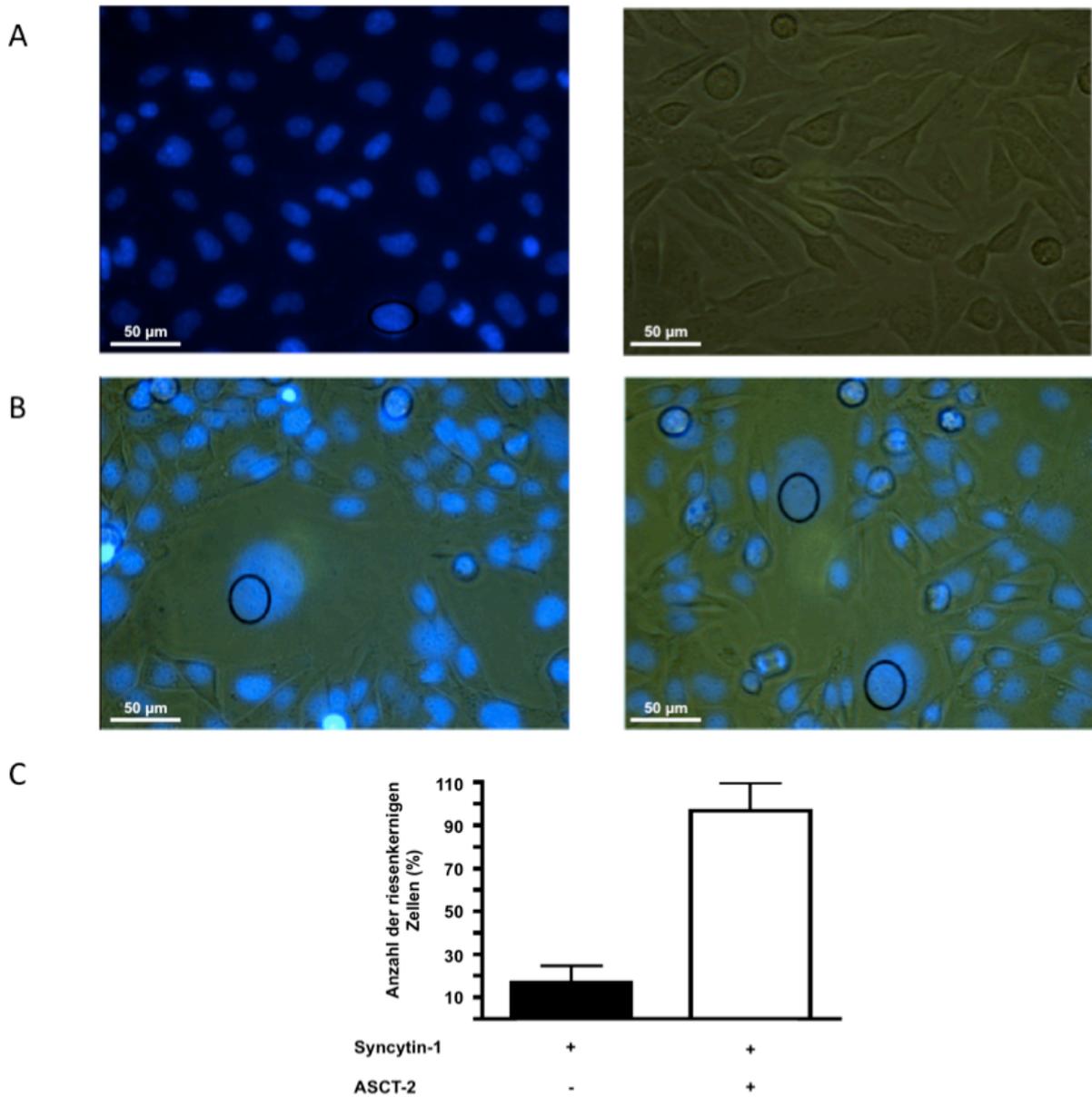


Abbildung 4.8: Fusion Syncytin-1-transfizierter CHO-Zellen mit ASCT-2-transfizierten CHO-Zellen. A: DAPI-Färbung einer Fusion Syncytin-1-transfizierter CHO-Zellen mit CHO-Kontroll-Zellen (links) und eine Hellfeld-Aufnahme desselben Ausschnittes (rechts; 96 Stunden nach Transfektion). B. Fusion Syncytin-1-transfizierter CHO-Zellen mit ASCT-2-transfizierten CHO-Zellen 48 Stunden nach Start der Ko-Kultur. Es ist gleichzeitig die Fluoreszenz und die Hellfeld-Aufnahme bei einer 40-fachen Vergrößerung dargestellt. Die Oberflächenexpression wurde 24 Stunden nach Transfektion analysiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die CHO-Zellen mit DAPI gefärbt, zusammen ko-kultiviert und zusätzlich mit 100 µM FK stimuliert. Nach weiteren 48 Stunden (96 Stunden nach Transfektion) wurde die Fusionsrate durch Zählen der riesenkernigen Zellen ausgewertet. C. Quantifizierung von 20 Bildaufnahmen aus drei Fusionsexperimenten. Dabei wurden die riesenkernigen Zellen in der CHO-Kontrolle von denen der Syncytin-1- und ASCT-2-transfizierten Zellen subtrahiert.

In den CHO-Kontrollzellen identifizierte riesenkernige Zellen repräsentierten vermutlich keine fusionierten, sondern mitotische Zellen. Deswegen wurden Zellen erst dann als riesenkernige Zellen gewertet, wenn diese mindestens die Größe von drei Zellkernen erreicht hatten. Diese wurden bei Ko-Kultivierung Syncytin-1- und ASCT-2-exprimierender CHO-Zellen (nicht bei Syncytin-1 oder ASCT-2 alleine) beobachtet (Abb. 4.8-A und B). Die Ko-Kultivierung Syncytin-1- und ASCT-2-exprimierender CHO-Zellen resultierte in der Ausbildung riesenkerniger Zellen, welche in 20 Bildaufnahmen aus drei Experimenten quantifiziert wurden (Abb. 4.8-C), womit die Funktionalität der Plasmid-kodierten Proteine gezeigt werden konnte.

Neben Syncytin-1 ist Syncytin-2 ebenfalls ein Fusionsprotein, jedoch hatte die klonierte Sequenz für den Fusionsrezeptor MFSD2A eine Punktmutation und konnte daher nicht für die Fusionsexperimente benutzt werden. Deshalb wurde das Fusionsexperiment modifiziert und die Rezeptor-exprimierenden BeWo-Zellen mit Syncytin-2 Effektorzellen ko-kultiviert. Da BeWo-Zellen jedoch neben MFSD2A (jedoch nicht ASCT-1) Syncytin-1 und -2 exprimieren, wurden die Effektorzellen mit dem Membranfarbstoff R18 und die Zielzellen mit dem Farbstoff CFSE gefärbt, um spezifisch die Syncytin-2-abhängige Fusion darstellen zu können und sie von den HERV-Hüllprotein- und -Rezeptor-exprimierenden BeWo-Zellen abzugrenzen. 48 Stunden nach Syncytin-2-Transfektion wurde das Fusionsexperiment gestartet, indem Effektorzellen mit Zielzellen ko-kultiviert wurden und mit 100 μM FK stimuliert wurden. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Fusion von R18- und CFSE-doppeltpositiven Zellen analysiert (Abb. 4.9)

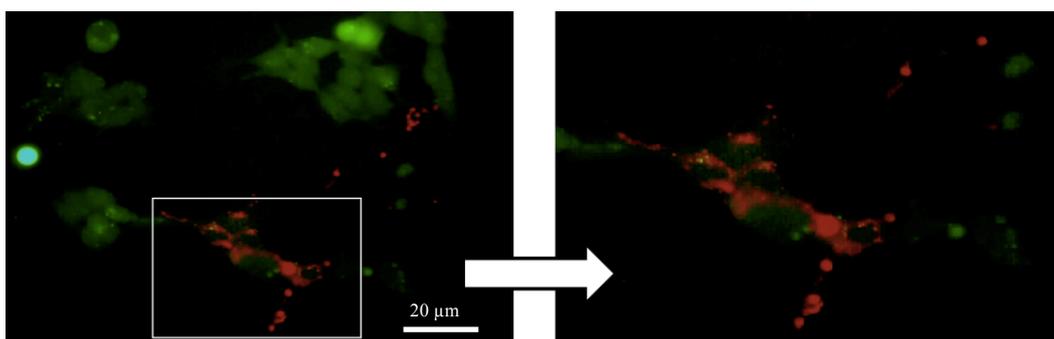


Abbildung 4.9: Fusion von Syncytin-2-transfizierten Effektorzellen mit BeWo-Zellen. Die Effektorzellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit R18 gefärbt und mit CFSE-positiven BeWo-Zellen ko-kultiviert. Die Fusionen wurden nach 48 Stunden mit einer 40-fachen Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop identifiziert.

Es konnte jedoch keine eindeutige Auswertung des Fusionsexperimentes durchgeführt werden, da es mit der angewandten Methode nicht eindeutig möglich war, einzelne Zellen als doppeltpositiv (für R18 und CFSE) zu identifizieren oder zu bestimmen ob die R18- und CFSE-Signale von überlagerten und nicht fusionierten Zellen stammten.

Deshalb konnte die Funktionalität von Syncytin-2 nicht bewiesen werden. Ein Fusionsexperiment mit HML-2 wurde nicht durchgeführt, da für HML-2 keine Fusionseigenschaft mit Trophoblasten nachgewiesen wurde.

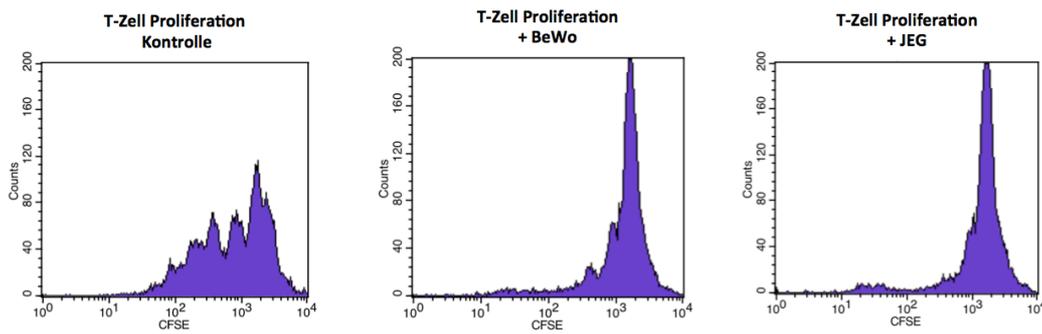
4.4. Modulatorische Eigenschaften der HERV-Hüllproteine

4.4.1. Chorionkarzinom-Zelllinien, aber keine HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen inhibierten die T-Zell-Proliferation

Da T-Zellen die bekannten Rezeptoren für HERV-Hüllproteine auf der Zelloberfläche exprimieren (Abb. 4.2), könnten die HERV-Hüllprotein-exprimierenden Chorionkarzinom-Zelllinien mit T-Zellen interagieren. Im Folgenden wurde der Effekt von den Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG auf die T-Zell-Proliferation analysiert.

Dafür wurden aus PBMCs frisch isolierte T-Zellen mit dem Farbstoff CFSE gefärbt und mit BeWo- oder JEG-Zellen im Verhältnis 10:1 ko-kultiviert. Als Kontrollen wurden unkonditionierte T-Zellen verwendet. Nach 24 Stunden wurden die T-Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert und nach weiteren 48 Stunden wurden die T-Zellen von den Effektorzellen getrennt. Die CFSE-Intensität wurde nach weiteren 96 Stunden mittels Durchflusszytometrie gemessen (in Abb. 4.10 exemplarisch dargestellt). Der Farbstoff CFSE markiert lebende Zellen und wird bei Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt, wodurch die Farbstoffintensität bei proliferierenden T-Zellen abnimmt. Somit ist die CFSE-Intensität ein direktes Maß der Proliferationsrate.

A



B

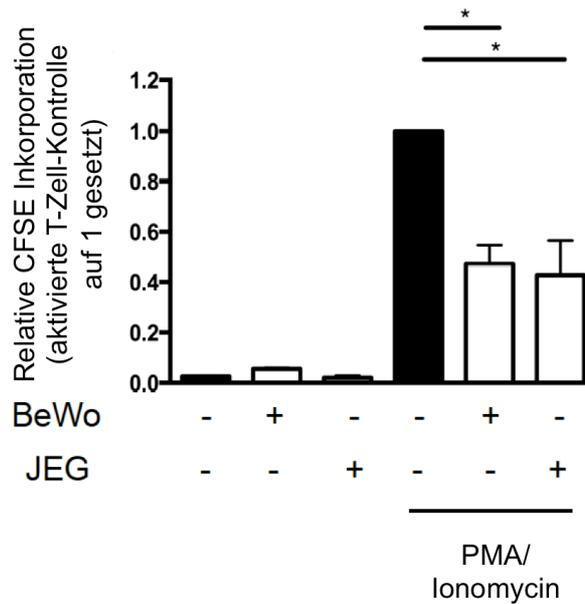


Abbildung 4.10: T-Zell-Proliferation nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien mittels CFSE-Inkorporation.

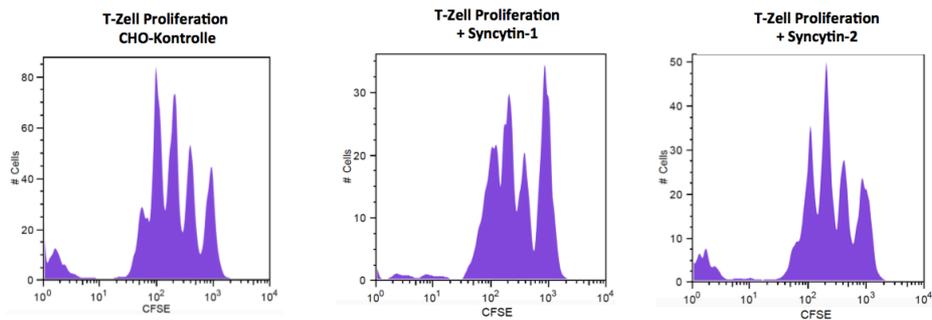
A: Exemplarische Darstellung der T-Zell-Proliferation unconditionierter Kontroll-T-Zellen (links) und T-Zellen, die mit BeWo-Zellen (Mitte) und JEG-Zellen (rechts) ko-kultiviert worden waren, sechs Tage nach PMA/Ionomycin-Stimulation. B: Quantifizierung der T-Zell-Proliferation aus fünf unabhängigen Experimenten, zur Normalisierung wurde die PMA/Ionomycin-T-Zell-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Chorionkarzinom-Zelllinien inhibierten die T-Zell-Proliferation nach PMA/Ionomycin-Stimulation sehr effizient. Die meisten unconditionierten T-Zellen in der Kontrolle proliferierten und durchliefen bis zu fünf Zellteilungszyklen. Hingegen proliferierte nur ein kleiner Teil der T-Zellen, die mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultiviert worden waren, während die meisten T-Zellen in ihrer Proliferation gehemmt waren. Darüber hinaus durchlief ein kleiner Teil an proliferierenden T-Zellen maximal nur einen Zellteilungszyklus (Abb. 4.10).

Ob die HERV-Hüllproteine einen Beitrag zu dieser T-Zell-Modulation leisten, wurde im Folgenden analysiert. Dafür wurden nun CFSE gefärbte T-Zellen mit HERV-Hüllprotein-

exprimierenden Effektorzellen, unter denselben Bedingungen wie in Abbildung 4.10, ko-kultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde ebenfalls fünf Tage nach PMA/Ionomycin-Stimulation mittels CFSE-Intensität im Durchflusszytometer gemessen und ist exemplarisch dargestellt in Abbildung 4.11 dargestellt. Als Kontrollen wurden T-Zellen mit CHO-Kontrollkulturen ko-kultiviert.

A



B

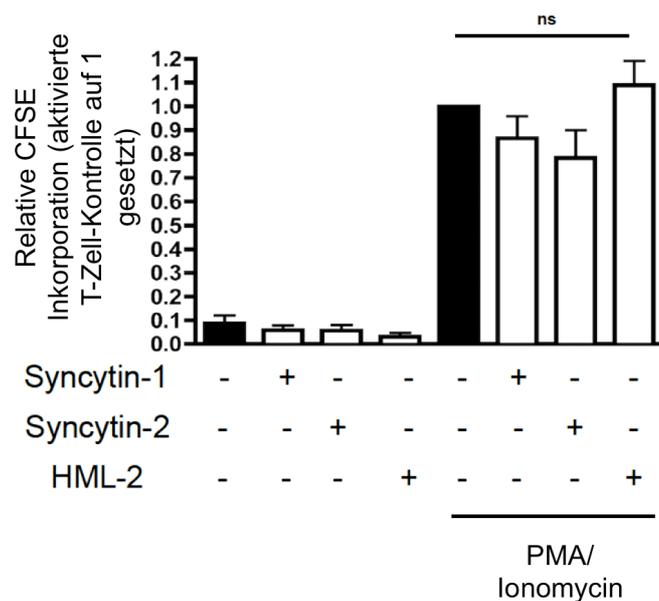


Abbildung 4.11: T-Zell-Proliferation nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen mittels CFSE-Inkorporation.

A: Exemplarische Darstellung der T-Zell-Proliferation nach Ko-Kultur mit CHO-Kontrollzellen (links), mit Syncytin-1-transfizierten CHO-Zellen (Mitte) und Syncytin-2-transfizierten CHO-Zellen (rechts) sechs Tage nach PMA/Ionomycin Stimulation. B: Quantifizierung der T-Zell-Proliferation aus fünf unabhängigen Experimenten, zur Normalisierung wurde die PMA/Ionomycin-T-Zell-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Anders als bei den Chorionkarzinom-Zelllinien konnte keine Inhibition der Proliferation der T-Zellen, die mit HERV-Hüllprotein-transfizierten Effektorzellen ko-kultiviert worden waren, gezeigt werden (Abb. 4.11). Es wurden ebenfalls Syncytin-1, -2 und HML-2 auf

Effektorzellen ko-exprimiert, mit T-Zellen ko-kultiviert und deren Proliferationskapazität gemessen. Dabei waren die Expressionsniveaus der ko-exprimierten HERV-Hüllproteine mit denen einzeln exprimierten HERV-Hüllproteinen vergleichbar (Syncytin-1: $46,88 \pm 8,54$ MFI; Syncytin-2: $31,0 \pm 4,93$ MFI; HML-2: $48,71 \pm 7,4$ MFI). Die Ko-Expression der HERV-Hüllproteine auf Effektorzellen hatte ebenfalls keine Hemmung der T-Zell-Proliferation nach PMA/Ionomycin-Stimulation zur Folge (Abb. 4.12).

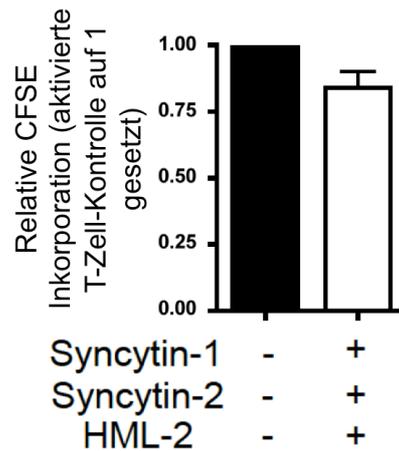


Abbildung 4.12: T-Zell-Proliferation nach Ko-Kultur mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-ko-exprimierenden Effektorzellen mittels CFSE-Inkorporation. Die T-Zell-Proliferation wurde sechs Tage nach PMA/Ionomycin-Stimulation mittels Durchflusszytometrie gemessen, es wurden drei unabhängige Experimente analysiert. Zur Normalisierung wurde die PMA/Ionomycin-T-Zell-Kontrolle auf 1 gesetzt.

Im Folgenden wurde analysiert, ob die HERV-Hüllprotein-transfizierten Effektorzellen ebenfalls keine Inhibition der Proliferation von T-Zellen zur Folge hatten, wenn diese mit α -CD3⁺ und α -CD28⁺-Antikörpern stimuliert wurden. Um einen Effekt der CHO-Kontrollkultur auszuschließen, wurden zunächst 5×10^5 T-Zellen mit CHO-Kontrollkulturen im Verhältnis 10:1 24 Stunden ko-kultiviert. Danach wurden die T-Zellen rückgewonnen und in eine α -CD3⁺/ α -CD28⁺-Antikörper beschichtete 96-Napf-Zellkulturplatte gegeben. Nach zwei Tagen wurden die T-Zellen mit Tritium-markiertem-Thymidin (radioaktivem ³H-Thymidin) 16 Stunden inkubiert und anschließend wurde die T-Zell-Proliferation anhand der Inkorporation von radioaktivem ³H-Thymidin mittels eines Szintillationszählers MicroBeta2TM gemessen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: α -CD3⁺/ α -CD28⁺-Antikörper stimulierte T-Zell-Proliferation mit und ohne Ko-Kultur von CHO-Kontrollkulturen.

	T-Zell-Kontrolle (unbehandelt)	T-Zellen + Leervektor- exprimierende CHO-Zellen
Keine Stimulation (cpm)	47,5 ± 10,5	106,5 ± 39,5
α -CD3 ⁺ / α -CD28 ⁺ Stimulation (cpm)	23.524 ± 5610,4	867,9 ± 286,2

Die T-Zell-Proliferation wurde zwei Tage nach α -CD3⁺/ α -CD28⁺-Antikörper-Stimulation mittels ³H-Thymidin-Inkorporation gemessen. Cpm: counts per minute

Der Effekt von HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen auf die TZR-vermittelte T-Zell-Proliferation konnte jedoch nicht anhand der α -CD3⁺/ α -CD28⁺-Antikörper-Stimulation analysiert werden, da aus methodischen Gründen die CHO-Kontrollkultur, ohne Expression der HERV-Hüllproteine, die α -CD3⁺/ α -CD28⁺-Antikörper-vermittelte T-Zell-Stimulation hemmte (Tabelle 4.1). Eine Zusätzliche Wirkung der HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen auf die T-Zell-Proliferation konnte somit nicht untersucht werden.

4.4.2. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen hatten keinen Effekt auf die LPS-vermittelte phänotypische DC-Reifung

Da die HERV-Hüllproteine offenbar keine inhibitorische Wirkung auf die stimulierte T-Zell-Proliferation hatten, wurde im Nachfolgenden überprüft, ob sie die Funktion von DCs beeinträchtigen. Hierzu wurde zunächst ein möglicher Effekt von HERV-Hüllproteinen auf die LPS-vermittelte phänotypische DC-Reifung untersucht.

Hierfür wurden iDCs aus Monozyten generiert (*monocyte derived* DCs), mit BeWo- und JEG-Zellen 24 Stunden ko-kultiviert und weiteren 24 Stunden mit LPS aktiviert (oder nicht). Der Experimentaufbau wurde mit diesen Ko-Kultivierungs- und Stimulationsprotokollen gewählt, um die Ergebnisse mit einer Publikation (Salamone, *et al.*, 2012) - in der *ex vivo* Trophoblasten mit LPS-aktivierten DCs ko-kultiviert wurden waren - vergleichen zu können. Die Expression von Oberflächenmolekülen (CD86⁺, HLA-DR⁺ und CD40⁺) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD86⁺-Expression ist in Abb. 4.13 exemplarisch dargestellt.

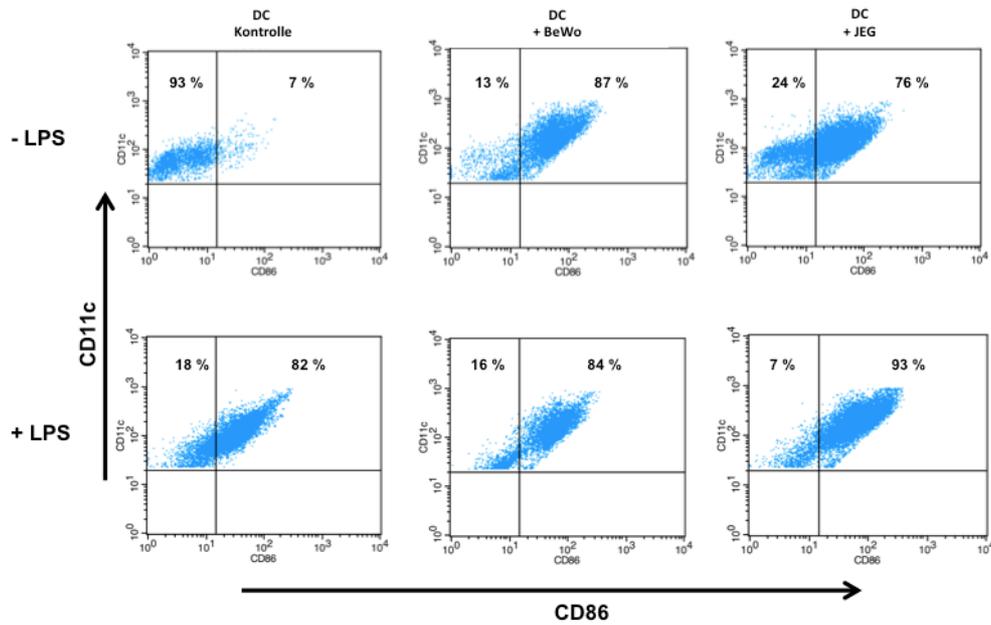


Abbildung 4.13: Exemplarische Darstellung der CD86⁺-Expression auf DCs nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien. Die CD11c⁺- und CD86⁺-Oberflächenexpressionen wurden auf DCs mit (unten) und ohne (oben) LPS-Aktivierung nach Ko-Kultur mit BeWo- (Mitte) bzw. JEG-Zellen (rechts) oder unkonditionierten DCs (links) im Durchflusszytometer analysiert.

Die Expressionsniveaus von CD86⁺, HLA-DR⁺ und CD40⁺ aus vier unabhängigen Experimenten wurden analysiert. Die CD86⁺-Oberflächenexpression auf Kontroll-DCs wurde durch LPS-Aktivierung (LPS-DCs) induziert. Die Ko-Kultur von DCs, die mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultiviert worden waren, induzierte bereits ohne LPS-Aktivierung eine erhöhte CD86⁺-Oberflächenexpression. Die LPS-Aktivierung hatte eine weitere schwache Hochregulierung der CD86⁺-Expression auf den mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultivierten DCs zur Folge. Die Expressionsniveaus von CD40⁺ und HLA-DR⁺ auf DCs wurden durch die Ko-Kultur von BeWo- und JEG-Zellen im Vergleich zu unkonditionierten DCs nicht beeinflusst (Abb. 4.14).

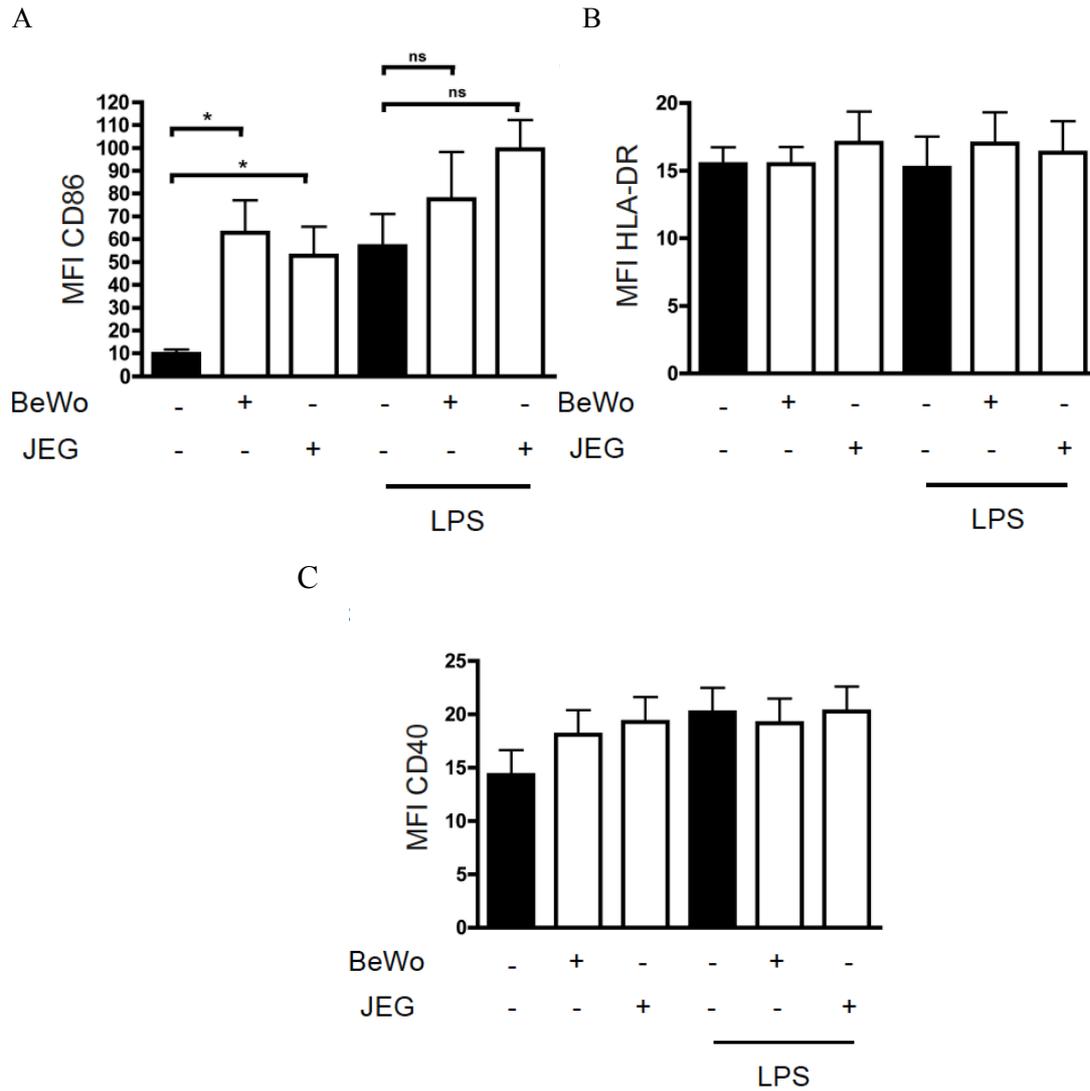


Abbildung 4.14: Oberflächenexpression von DC-Reifungsmarkern nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien.

Quantifizierung der Expression von CD86⁺ (A), HLA-DR⁺ (B) und CD40⁺ (C) auf DCs, die unbehandelt, mit BeWo- oder JEG-Zellen ko-kultiviert worden waren mit und ohne LPS-Aktivierung aus vier unabhängigen Experimenten. Die DCs wurden mit CD11c⁺ identifiziert und nur die CD11c⁺-Zellen wurden ausgewertet; die Analyse wurde mit Durchflusszytometer durchgeführt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Um einen möglichen Einfluss der HERV-Hüllproteine auf die LPS-aktivierte DC-Reifung zu analysieren, wurden HERV-exprimierende Effektorzellen mit iDCs ko-kultiviert. Damit ein potentieller Effekt der CHO-Kontrolle, in welcher CHO-Zellen (Leervektor transfiziert CHO-Zellen) auf die DC-Reifung bestimmt werden konnte, wurden iDCs unkontrolliert oder mit CHO-Kontrollzellen ko-kultiviert und mit LPS aktiviert (oder nicht) und die CD86⁺-Expression der DCs nach verschiedenen Zeitpunkten (12, 24 und 48 Stunden) analysiert (Abb. 4.15).

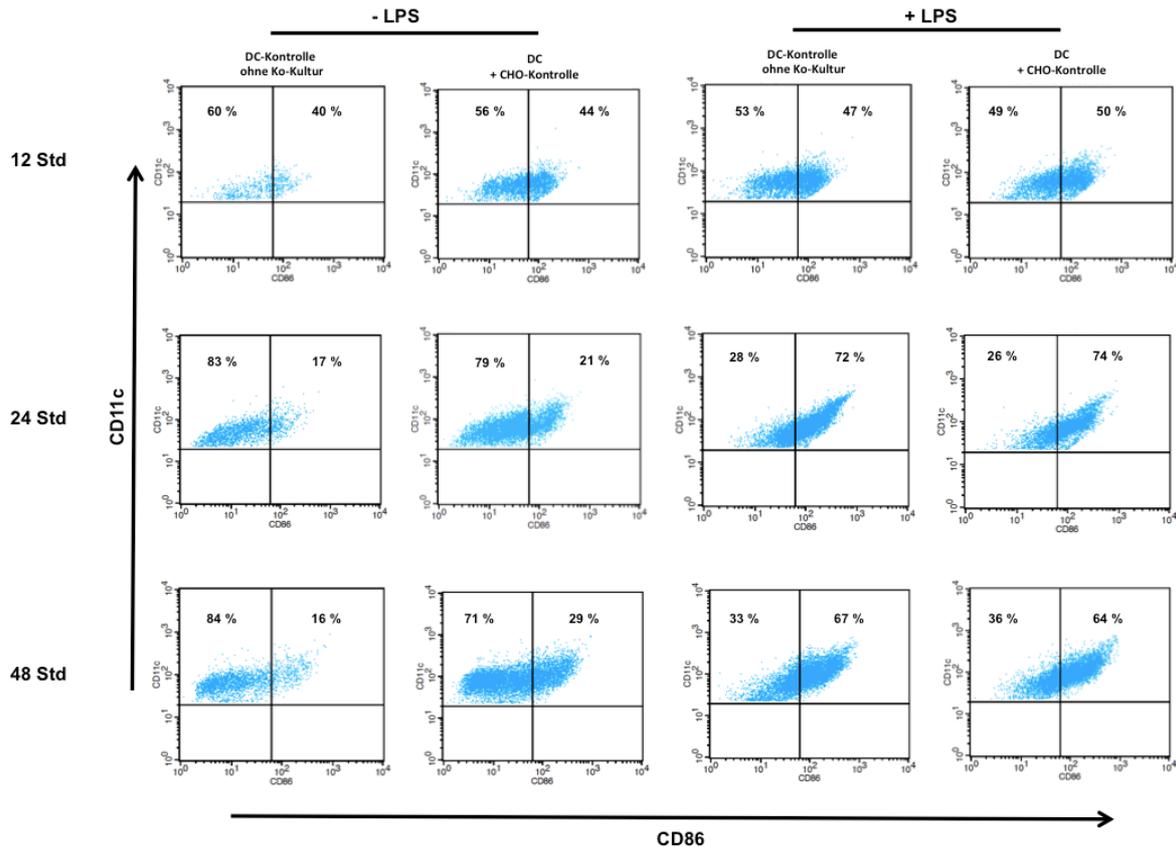


Abbildung 4.15: CD86⁺-Expression von unkonditionierten DCs oder DCs, die mit Leervektor-exprimierenden CHO-Zellen ko-kultiviert worden waren. Die iDCs wurden mit CHO-Zellen 24 Stunden ko-kultiviert (oder nicht), mit LPS (rechts) aktiviert (oder nicht – links) und die CD86⁺-Expression nach weiteren 12 (oben), 24 (Mitte) und 48 (unten) Stunden Ko-Kultur analysiert. Die CD11c⁺- und CD86⁺-Oberflächenexpressionen wurden im Durchflusszytometer analysiert und sind exemplarisch dargestellt.

Für die Analyse des Effektes HERV-Hüllprotein-exprimierender Effektorzellen auf die LPS-vermittelte DC-Reifung wurden die gleichen Zeitpunkte gewählt, wie schon für die Chorionkarzinom-Zelllinien beschrieben. Die CD86⁺-Expression der DCs war nach 12 Stunden LPS-Aktivierung erst schwach erhöht, die Leervektor-exprimierende CHO-Kontrolle hatte eine höhere CD86⁺-Expression verglichen zu den unkonditionierten DCs ohne LPS-Aktivierung nach 48 Stunden zur Folge (Abb. 4.15). Da die CD86⁺-Expression zwischen unkonditionierten DCs und DCs, die mit CHO-Kontrollzellen ko-kultiviert worden waren, nach 24 Stunden LPS-Aktivierung (oder nicht) fast vergleichbar war, wurden alle folgenden Experiment nach diesen Zeitintervallen durchgeführt.

Dafür wurden HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen 48 Stunden nach transientscher Transfektion, in gleicher Weise wie für Chorionkarzinom-Zelllinien beschrieben, mit DCs ko-kultiviert. Dies ist exemplarisch für die CD86⁺-Expression in Abb. 4.16 dargestellt.

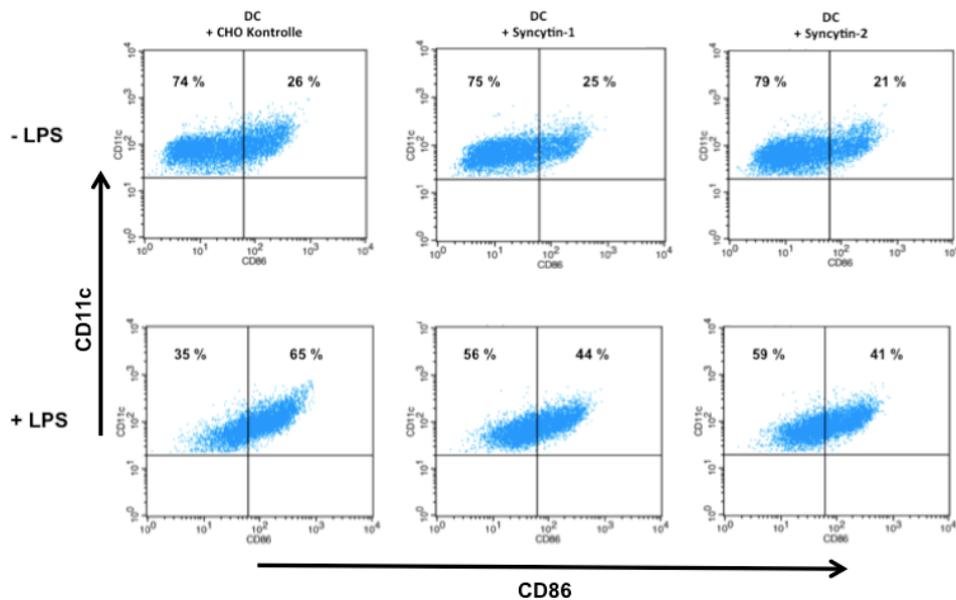


Abbildung 4.16: Exemplarische Darstellung der CD86⁺-Expression auf DCs nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen.

Die CD11c⁺- und CD86⁺-Oberflächenexpressionen wurden auf DCs mit (unten) und ohne (oben) LPS-Aktivierung nach Ko-Kultur mit Syncytin-1-exprimierenden (Mitte) und Syncytin-2-exprimierenden Effektorzellen (rechts) oder CHO-Kontrollzellen (links) im Durchflusszytometer analysiert.

Die Expressionsniveaus von CD86⁺, HLA-DR⁺ und CD40⁺ auf DCs aus vier unabhängigen Experimenten wurden analysiert. Durch LPS-Aktivierung wurde die CD40⁺- und CD86⁺-Oberflächenexpression auf DCs, die mit CHO-Kontrollen ko-kultiviert worden waren, hochreguliert, jedoch hatte die LPS-Aktivierung nur einen schwachen Effekt auf die HLA-DR⁺-Expression der DCs. Die CD86⁺-Expression der LPS-DCs wurde nur durch Syncytin-1- und -2-exprimierende Effektorzellen gehemmt, die HLA-DR⁺-Expression wurde nur durch Syncytin-1-exprimierende Effektorzellen gehemmt. Die Analyse der CD40⁺-Expression zeigte, dass die HERV-Hüllproteine weder deren Induktion vermitteln, noch deren LPS-induzierte Hochregulierung hemmen (Abb. 4.17).

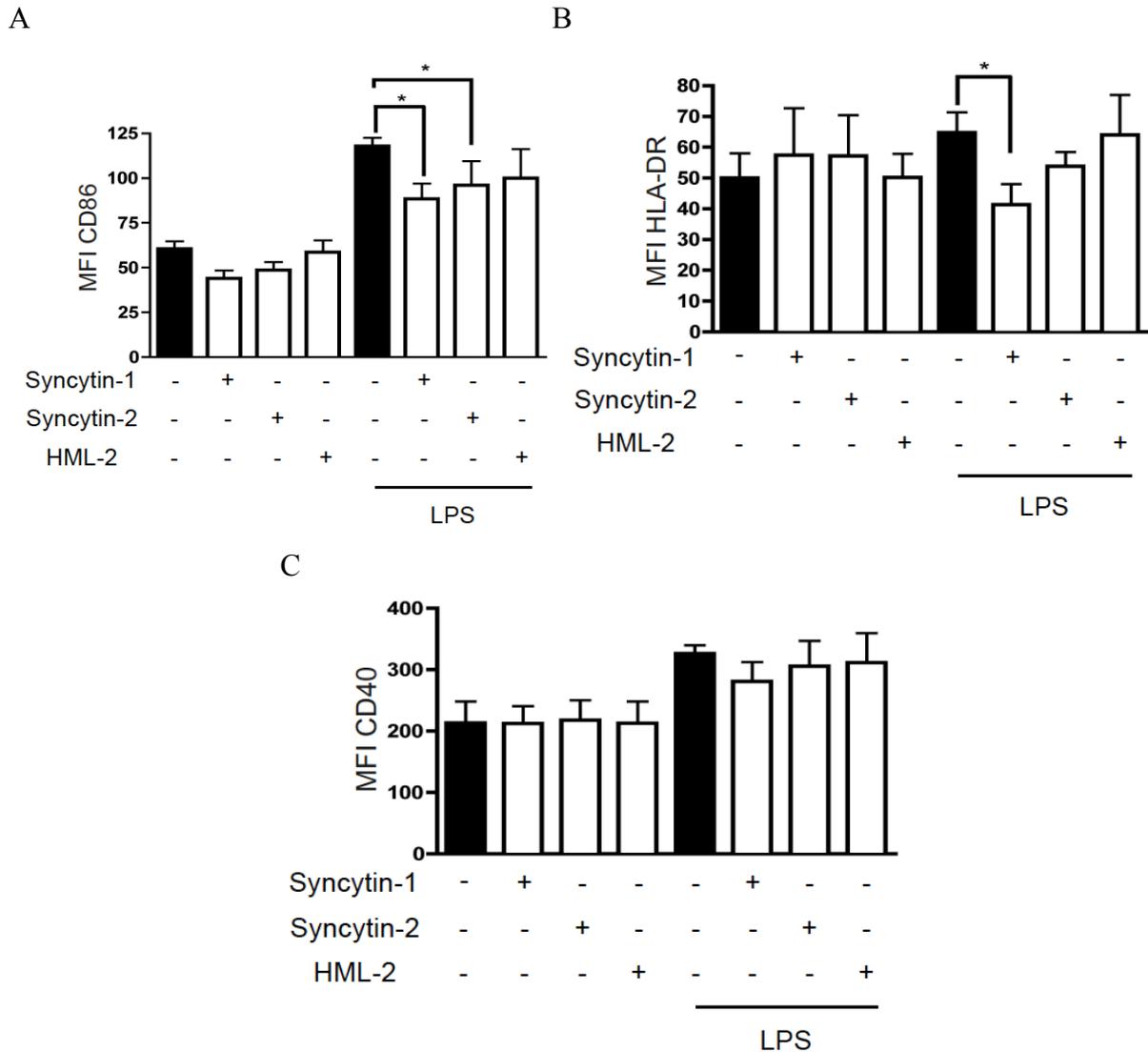


Abbildung 4.17: Oberflächenexpression von DC-Reifungsmarkern nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-transfizierten Effektorzellen. Quantifizierung der CD86⁺ (A), HLA-DR⁺ (B) und CD40⁺-(C) Oberflächenmoleküle auf DCs mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden oder CHO-Kontrollzellen mit und ohne LPS-Aktivierung aus vier unabhängigen Experimenten. DCs wurden durch die Expression von CD11c⁺ identifiziert. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde im Durchflusszytometer analysiert (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

4.4.3. Differentielle Regulation der LPS-DC-Zytokin-Produktion durch Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen

Der Einfluss von HERV-Hüllproteinen auf die LPS-DC-Zytokinproduktion wurde im Folgenden untersucht. Dafür wurde die Zytokinproduktion in Ko-Kulturen von DCs mit den HERV-exprimierenden Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG analysiert. Dafür wurden iDCs mit oder ohne BeWo- oder JEG-Zellen in Verhältnis 2:1 24 Stunden ko-kultiviert und für weitere 24 Stunden mit LPS aktiviert (oder nicht). Der Überstand wurde bei - 80°C

gelagert und die Zytokinproduktion von IL-12, TNF- α und IL-10 wurde im Überstand von DCs mittels des FlowCytomix™ multiplex bead assays aus zwei unabhängigen Experimenten gemessen (Abb. 4.18).

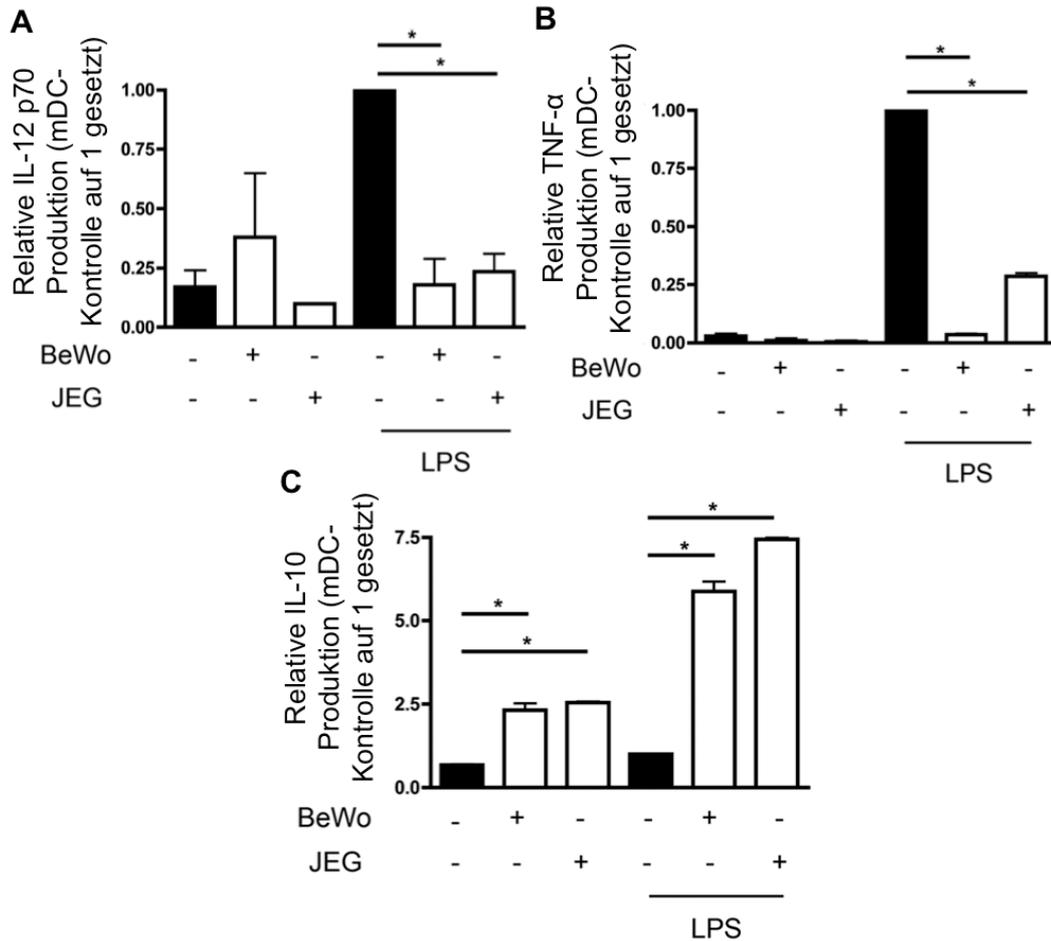


Abbildung 4.18: Zytokinproduktion von DCs nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien. Die DC-Zytokinproduktion von IL-12 (A), TNF- α (B) und IL-10 (C) wurde mittels eines FlowCytomix™ multiplex bead assays im Überstand aus zwei unabhängigen Experimenten gemessen. Dafür wurden iDCs mit oder ohne die Chorionkarzinom-Zelllinien 24 Stunden ko-kultiviert, mit LPS aktiviert oder nicht und nach weiteren 24 Stunden die Zytokinproduktion der DCs bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels der FlowCytomix Pro Software, zur Normalisierung wurden zwei unabhängige Experimente analysiert, die LPS-DC-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

In DCs, die nicht ko-kultiviert worden waren, führte die LPS-Aktivierung erwartungsgemäß zu einer Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α (Abb. 4.18), jedoch nicht des anti-inflammatorischen Zytokines IL-10. Die Ko-Kultur von DCs mit BeWo- oder JEG-Zellen hatte keinen Einfluss auf die IL-12- und TNF- α -Produktion in Abwesenheit der LPS-Aktivierung, während die IL-12- und TNF- α -Produktion von LPS-DCs durch Ko-Kultur der DCs mit BeWo- oder JEG-Zellen in annähernd gleichem Masse stark gehemmt

war (Abb. 4.18). Hingegen produzierten DCs, die mit BeWo- und JEG-Zellen konditioniert worden waren, spontan und in Antwort auf LPS-Aktivierung sogar höhere Mengen an IL-10 (Abb. 4.18).

Um zu analysieren, ob die HERV-Hüllproteine zu diesem Zytokin-Profil beitragen, wurden iDCs mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert und für weitere 24 Stunden mit LPS aktiviert (oder nicht). Die DC-Zytokinproduktion im Überstand wurde mittels des FlowCytomix™ multiplex bead assays in analoger Weise wie für die Chorionkarzinom-Zelllinien gemessen (Abb. 4.19).

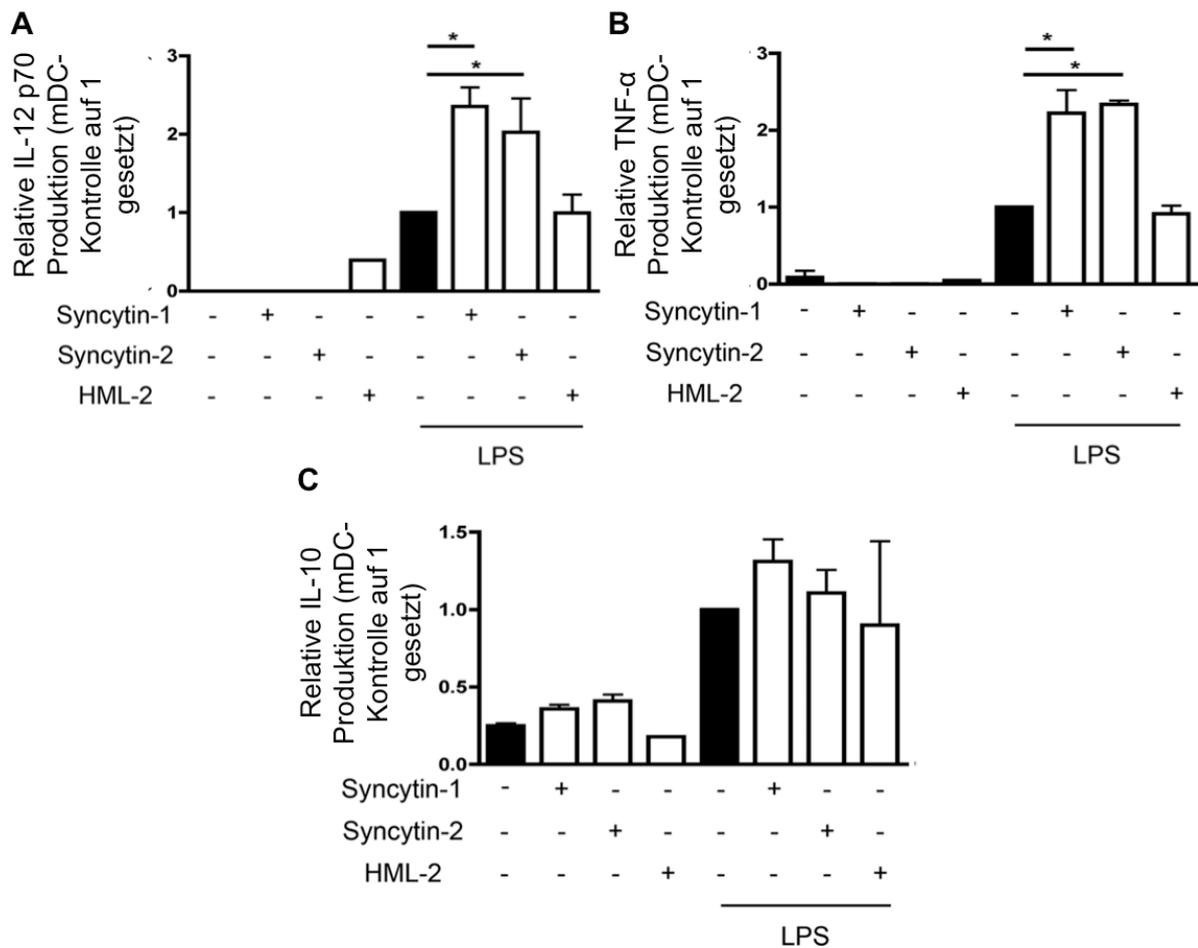


Abbildung 4.19: Zytokinproduktion von DCs nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen.

Die DC-Zytokinproduktion von IL-12 (A), TNF-α (B) und IL-10 (C) wurde mittels eines FlowCytomix™ multiplex bead assays im Überstand aus zwei unabhängigen Experimenten gemessen. Dafür wurden iDCs mit HERV-Hüllprotein-transfizierten oder CHO-Kontrollzellen 24 Stunden ko-kultiviert, mit LPS aktiviert oder nicht und nach weiteren 24 Stunden die Zytokinproduktion der DCs bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels der FlowCytomix Pro Software ausgewertet, zur Normalisierung wurden zwei unabhängige Experiment analysiert, die LPS-DC-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

In Abwesenheit von LPS induzierte keines der Transgene eine Zytokinproduktion der DCs. Im Gegensatz zu den DCs, die mit Chorionkarzinom-Zelllinien ko-kultiviert worden waren, hatten DCs, die mit Syncytin-1- und -2- (nicht aber HML-2-)-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren, einen fördernden, statt hemmenden Effekt auf die Freisetzung der LPS-DC-Zytokinproduktion von pro-inflammatorischem IL-12 und TNF- α . Die IL-10-Produktion in den LPS-DCs wurde durch die HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen nicht beeinflusst (Abb. 4.19).

Aufgrund der Hemmung der Zytokinproduktion von DCs durch die Chorionkarzinom-Zelllinien, wurde im Folgenden analysiert, ob eine Ko-Expression der HERV-Hüllproteine auf CHO-Zellen zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Dafür wurden CHO-Zellen mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-kodierenden Plasmiden transfiziert und nach 48 Stunden mit iDCs ko-kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die iDCs in Anwesenheit von Brefeldin A mit LPS aktiviert (oder nicht). Die IL-12- und IL-10-Produktion wurde nach weiteren 24 Stunden in den permeabilisierten DCs mittels spezifischer Antikörper in der Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 4.20).

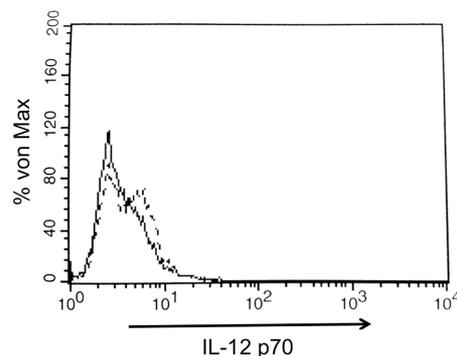


Abbildung 4.20: IL-12-Produktion von DCs nach Ko-Kultur mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-ko-exprimierenden Effektorzellen.

Exemplarische Darstellung der totalen DC-IL-12-Produktion nach Ko-Kultur mit Leervektor-exprimierenden CHO-Zellen. Dafür wurden iDCs mit CHO-Kontrollzellen 24 Stunden ko-kultiviert und danach mit LPS in der Anwesenheit von Brefeldin A aktiviert. Nach 24 Stunden wurden die DCs permeabilisiert, mit IL-12-Antikörper gefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die schwarze Linie repräsentiert die DCs ohne LPS-Aktivierung und die gepunktete Linie zeigt die DCs nach LPS-Aktivierung.

Die IL-12-Produktion wurde in DCs, die mit der Leervektor-Kontrolle ko-kultiviert wurden, durch die LPS-Aktivierung induziert, jedoch wurde die IL-12-Produktion durch die Ko-Kultur von LPS-DCs mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-ko-exprimierenden Effektorzellen in DCs nicht gehemmt (Tabelle 4.2). Die IL-10-Produktion in DCs konnte nicht analysiert werden, da die Sensitivität der Methode nicht für die niedrige IL-10-Produktion von DCs

ausreichend war. Es konnte ebenfalls kein Anstieg in der LPS-abhängigen IL-10-Produktion der DCs gemessen werden (Tabelle 4.2), da die IL-10-Produktion zu gering war.

Zusammenfassend inhibierten die Chorionkarzinom-Zelllinien die LPS-abhängige Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α von DCs und stimulierten das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, jedoch wurde dieser Effekt wahrscheinlich nicht durch die HERV-Hüllproteine hervorgerufen.

Tabelle 4.2: IL-12- und IL-10-Produktion von DCs nach Ko-Kultur mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-ko-exprimierenden Effektorzellen.

	DCs + CHO-Kontrolle	DCs + HERV- Hüllprotein Effektorzellen	DCs + CHO-Kontrolle	DCs + HERV- Hüllprotein Effektorzellen
	- LPS		+ LPS	
IL-12 p70 (in %)	9,6	43,7	11,6	49,5
IL-10 (in %)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Auswertung der IL-12- und IL-10-Produktion von DCs ko-kultiviert mit CHO-Kontrollzellen und HERV-Hüllprotein-ko-exprimierenden Effektorzellen mit und ohne LPS-Aktivierung. N.d. = nicht detektierbar.

4.4.4. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen veränderten die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation

Im Folgenden wurde untersucht, ob durch BeWo- bzw. JEG-Zellen oder DCs, die mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren, in der Lage sind, in einem allogenen System T-Zellen zu stimulieren. Dafür wurden DCs mit Chorionkarzinom-Zelllinien 24 Stunden ko-kultiviert, weitere 24 Stunden mit LPS aktiviert (oder nicht) und mit SEB beladen. Danach wurden $2,5 \times 10^4$ DCs mit allogenen T-Zellen in einem Verhältnis von 1:10 ko-kultiviert und nach vier Tagen mit Tritium-markiertem Thymidin (radioaktivem ^3H -Thymidin) 16 Stunden gepulst. Anschließend wurde die T-Zell-Proliferation anhand der Inkorporation von radioaktivem ^3H -Thymidin mittels eines Szintillationszählers MicroBeta2TM gemessen.

Die T-Zell-Proliferation - induziert durch allogene LPS-DCs, die mit Chorionkarzinom-Zelllinien konditioniert worden waren - ist in Abbildung 4.21 dargestellt.

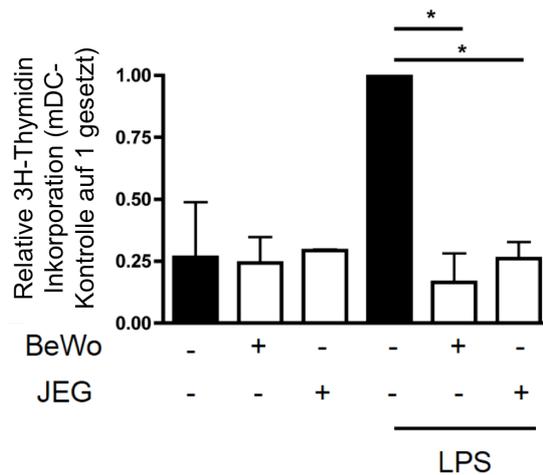


Abbildung 4.21: Effekt von Chorionkarzinom-Zelllinien auf die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation.

iDCs wurden mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultiviert, mit LPS aktiviert oder nicht und unter Zugabe von SEB vier Tage mit allogenen T-Zellen (1:10) kultiviert. Als Kontrollen wurden DCs unkontioniert belassen und mit allogenen T-Zellen mit und ohne LPS-Aktivierung kultiviert. Danach wurden in einer MLR proliferierende T-Zellen mit ³H-Thymidin markiert und gemessen. Zur Normalisierung wurden drei unabhängige Experimente analysiert, die LPS-DC-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Die unkontionierten LPS-DCs in der Kontrolle stimulierten erwartungsgemäß die Proliferation allogener T-Zellen (Abb. 4.21), während mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultivierte DCs nur sehr eingeschränkt dazu in der Lage waren (Abb. 4.21). Dabei war die allogene T-Zell-Proliferation stärker durch DCs gestört, die mit BeWo-Zellen konditioniert worden waren, als durch DCs, die mit JEG-Zellen konditioniert worden waren.

Ein möglicher Einfluss dieses Effekts durch HERV-Hüllproteine wurde untersucht, indem die DCs mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen vorbehandelt wurden und im Anschluss deren Stimulation der allogenen T-Zell-Proliferation unter den selben Bedingungen analysiert wurde, wie bereits für die Chorionkarzinom-Zelllinien beschrieben wurde (Abb. 4.22).

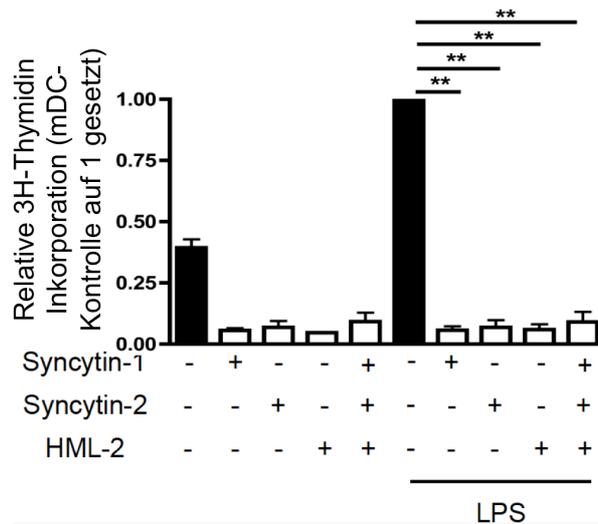


Abbildung 4.22: Effekt von HERV-Hüllproteinen auf die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation.

iDCs wurden mit HERV-Hüllprotein-transfizierten CHO-Zellen ko-kultiviert mit LPS aktiviert oder nicht und unter Zugabe von SEB vier Tage mit allogeenen T-Zellen (1:10) kultiviert. Danach wurden in einer MLR proliferierende T-Zellen mit ³H-Thymidin markiert und gemessen. Zur Normalisierung wurden drei unabhängige Experimente analysiert, die LPS-DC-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

LPS-DCs, welche mit CHO-Kontrollzellen ko-kultiviert wurden waren, stimulierten die allogene T-Zell-Proliferation erwartungsgemäß (Abb. 4.22). Wie für die Chorionkarzinom-Zelllinien beobachtet (Abb. 4.21), war die T-Zell-Proliferation durch allogene LPS-DCs, die mit einzelnen HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren gestört (Abb. 4.22). Darüber hinaus war die T-Zell-Proliferation ebenso effizient durch allogene LPS-DCs, die entweder mit einzeln HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen oder mit ko-exprimierten HERV-Hüllprotein ko-kultiviert worden, gestört (Abb. 4.22).

Um diese eingeschränkte T-Zell-Expansion auf die Ausbildung von Effektorfunktionen zu erweitern, wurde die Aktivierung der T-Zellen mittels der IFN- γ -Produktion im Zellkulturüberstand der MLR anhand eines FlowCytomixTM multiplex bead assays analysiert.

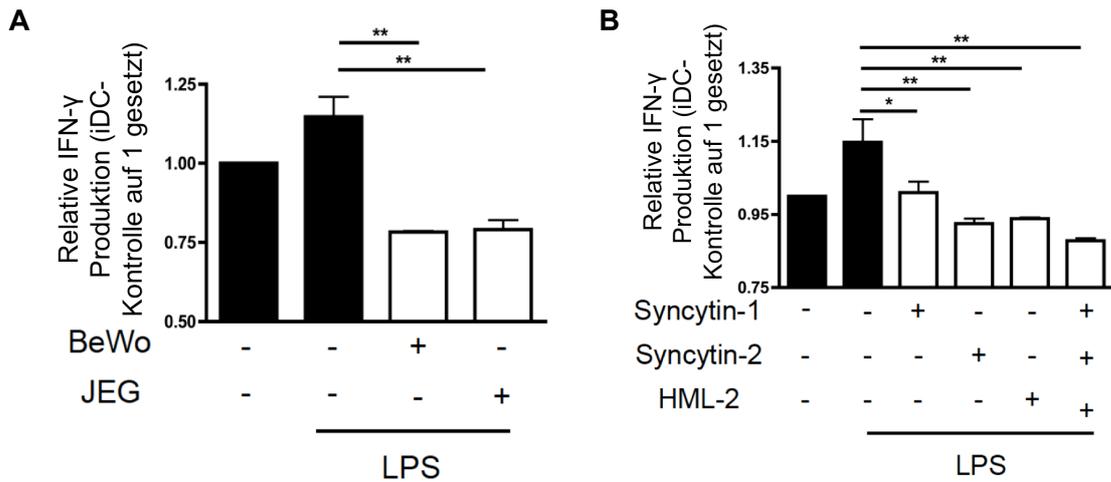


Abbildung 4.23: Einfluss von HERV-Hüllproteinen auf die LPS-DC-induzierte IFN- γ -Produktion von allogeenen T-Zellen.

iDCs wurden unbehandelt, mit BeWo- und JEG-Zellen (A) oder mit CHO-Kontrollen und HERV-exprimierenden Effektorzellen (B) ko-kultiviert. Danach wurden die iDCs mit LPS aktiviert, mit allogeenen T-Zellen im Verhältnis 1:10 ko-kultiviert und die IFN- γ -Produktion im Überstand mittels des FlowCytomix™ multiplex bead assays analysiert. Die Analyse erfolgte mittels der FlowCytomix Pro Software, zur Normalisierung wurden zwei unabhängige Experimente analysiert, die DC-Kontrolle ohne LPS-Aktivierung auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Wie für die MLR gezeigt, stimulierten die LPS-DCs, die unkonditioniert oder mit CHO-Kontrollkulturen ko-kultiviert worden waren, erwartungsgemäß die IFN- γ -Produktion allogener T-Zellen. Dies wurde durch prä-Konditionierung der DCs durch alle getesteten Effektorzellen (Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen) signifikant gehemmt. (Abb. 4.23). Die IFN- γ -Produktion wurde jedoch durch Syncytin-2- und HML-2-exprimierende Effektorzellen effektiver inhibiert als durch Syncytin-1-exprimierende Effektorzellen. Ein additiver Effekt ko-exprimierter HERV-Hüllproteine war nicht zu beobachten (Abb. 4.23).

4.4.5. Blockierung der HERV-Hüllproteinexpression auf den Chorionkarzinom-Zelllinien

Um nachzuweisen, ob die eingeschränkte T-Zell-Expansion von LPS-DCs durch die HERV-Hüllproteine induziert worden war, sollte die HERV-Hüllproteinexpression auf den Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG zu blockiert werden.

Da blockierende HERV-Hüllprotein-Antikörper kommerziell nicht erhältlich sind, wurde eine siRNA-vermittelte Ablationsstrategie gewählt.

Es wurden siRNAs gegen Syncytin-1, -2 und HML-2 mittels des BLOCK-iT™ RNAi Designers gewählt und in BeWo- und JEG-Zellen mittels DharmaFECT ko-transfiziert. Die

Reduktion der Oberflächenexpression auf BeWo- und JEG-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie 96 Stunden nach der Transfektion überprüft. Als Negativkontrolle wurden die Chorionkarzinom-Zelllinien mit MISSION® siRNA Universalkontrolle transfiziert, welche keine Homologie zu bekannten Genen hat und damit einen Hintergrund der mRNA-Knockdown-Effizienz gibt. Die durchflusszytometrische Analyse der Syncytin-1, -2- und HML-2-Oberflächenexpression nach siRNA-Transfektion von BeWo-Zellen 96 Stunden nach Transfektion ist exemplarisch in Abbildung 4.24 dargestellt.

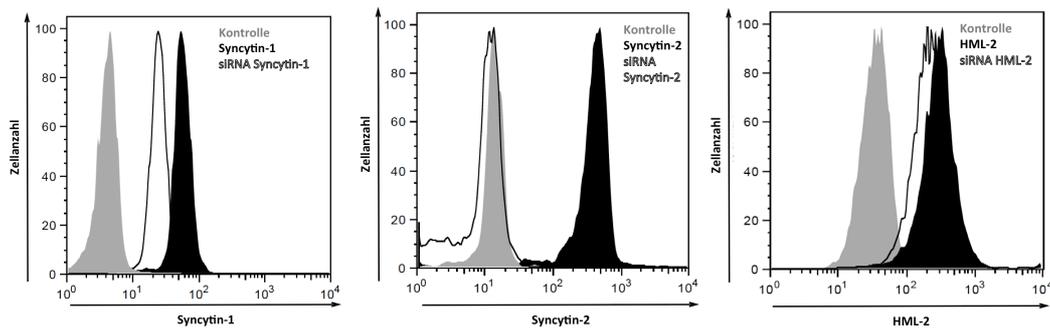


Abbildung 4.24: Exemplarische Darstellung der Oberflächenexpression von HERV-Hüllproteinen auf BeWo-Zellen nach siRNA-Transfektion.

Ko-Expression von Syncytin-1 (links), -2 (Mitte) und HML-2 (rechts) 96 Stunden nach siRNA-Transfektion auf BeWo-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Die Oberflächenexpression von Syncytin-1 und HML-2 konnte nur partiell reduziert werden, für Syncytin-2 konnte eine komplette Hemmung erreicht werden (Abb. 4.24). Jedoch war die Reduktion der HERV-Hüllproteinexpression auf BeWo-Zellen 96 Stunden nach siRNA-Transfektion nur über einen Zeitraum von weniger als 24 Stunden stabil.

Der Einfluss der Herunterregulation der HERV-Hüllproteine in BeWo-Zellen wurde auf die Funktionalität der LPS-DCs mittels MLR getestet. Wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben, wurden DCs mit BeWo-Zellen oder siRNA-transfizierten BeWo-Zellen für 24 Stunden konditioniert sowie unbehandelt gelassen und anschließend mit allogenen T-Zellen in einer MLR eingesetzt.

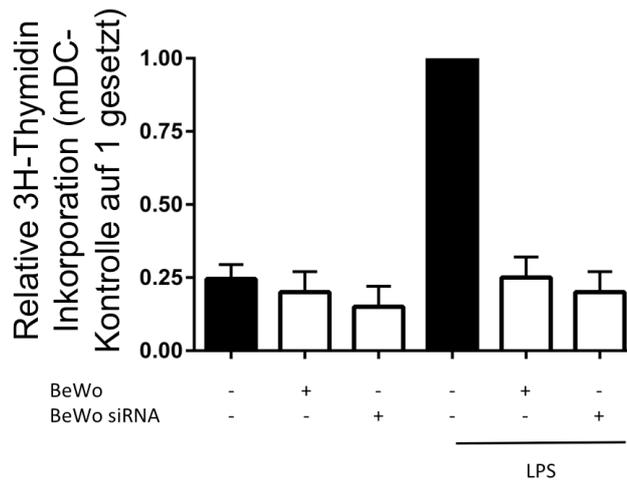


Abbildung 4.25: Einfluss von HERV-Hüllprotein-siRNA-transfizierten BeWo-Zellen auf die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation.

BeWo-Zellen wurden 96 Stunden nach Transfektion von Syncytin-1, -2 und HML-2-kodierender siRNA 24 Stunden mit DCs ko-kultiviert und mit LPS aktiviert (oder nicht) und SEB beladen. Danach wurden DCs mit allogegenen T-Zellen (1:10) kultiviert und in einer MLR proliferierende T-Zellen mit ³H-Thymidin markiert und gemessen. Zur Normalisierung wurden zwei unabhängige Experimente analysiert, die LPS-DC-Kontrolle auf 1 gesetzt.

Trotz einer partiellen Reduktion der HERV-Hüllproteinexpression auf BeWo-Zellen durch die siRNA-Transfektion war die stimulatorische Aktivität durch BeWo-konditionierte LPS-DCs auf die allogene T-Zell-Proliferation gestört (Abb. 4.25). Dies war nicht überraschend und wurde erwartet, da die Reduktion nur für die Syncytin-2-Expression effektiv war und nicht für die Syncytin-1- und HML-2-Expression. Außerdem konnte keine Reduktion über den Zeitraum eines Experimentes erreicht werden, da die siRNA-transfizierten BeWo-Zellen 48 Stunden mit DCs ko-kultiviert wurden, bevor die stimulatorische Aktivität von DCs auf die allogene T-Zell-Proliferation analysiert wurde.

4.4.6. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen hemmen die DC/T-Zell-Konjugatbildung

Die Rekrutierung von T-Zellen und deren stabile Konjugatbildung mit DCs ist ein essentieller Schritt in der T-Zell-Aktivierung.

Um den Einfluss von HERV-Hüllprotein-exprimierenden Chorionkarzinom-Zelllinien auf die DC/T-Zell-Konjugatbildung zu untersuchen, wurden iDCs mit BeWo- und JEG-Zellen 24 Stunden kontaktiert. Anschließend wurden $2,5 \times 10^4$ iDCs mit LPS aktiviert sowie mit SEB beladen und mit CFSE-gefärbten allogegenen T-Zellen im Verhältnis 1:10 ko-kultiviert. Danach wurde im Durchflusszytometer die DC-Population anhand der FSC/SSC-

Einstellungen (Größe und Granularität) identifiziert. Somit wurden nur CFSE-positive T-Zellen analysiert, welche an eine DC gebunden waren (Abb. 4.26).

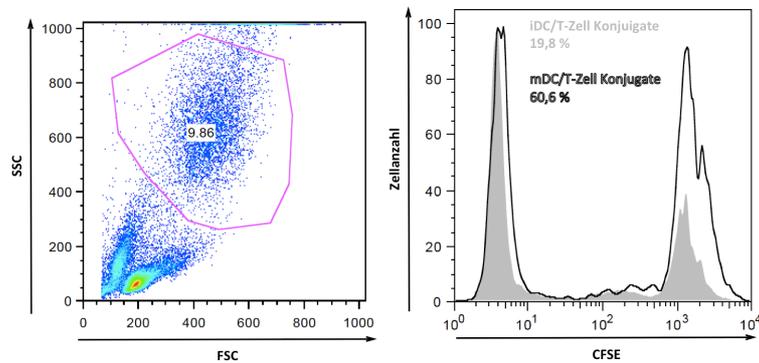


Abbildung 4.26: Exemplarische Darstellung der DC/T-Zell-Konjugate mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden im Durchflusszytometer mittels FSC/SSC-Einstellungen die CFSE-positiven T-Zellen in der iDC- bzw. mDC-Population ausgewertet.

In unkontingierten LPS-DCs wurde eine signifikante Zunahme der DC/T-Zell-Konjugate gefunden, die durch Vorbehandlung der iDCs mit BeWo- oder JEG-Zellen nicht zu beobachten war (Abb. 4.27). Dabei war die Rekrutierung von T-Zellen in stabile DC/T-Zell-Konjugate gleichermaßen durch BeWo- und JEG-Zellen gehemmt.

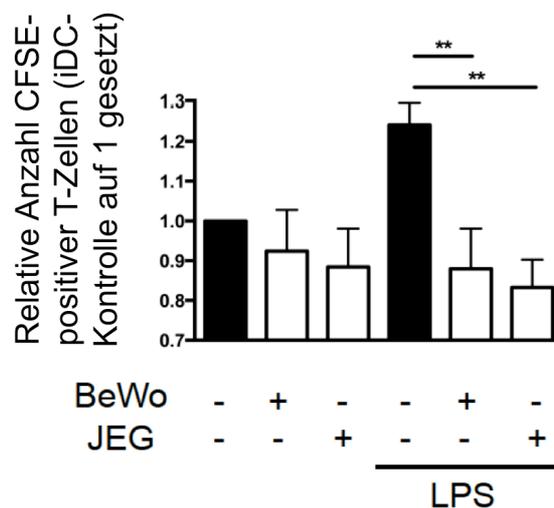


Abbildung 4.27: DC/T-Zell-Konjugatbildung nach Vorbehandlung der DCs mit Chorionkarzinom-Zelllinien.

iDCs wurden 24 Stunden mit Chorionkarzinom-Zelllinien ko-kultiviert, mit LPS aktiviert oder nicht sowie mit SEB beladen und mit allogenen CFSE-gefärbten T-Zellen im Verhältnis 1:10 ko-kultiviert. Anschließend wurden im Durchflusszytometer die CFSE-positiven T-Zellen in der DC-Population durch die FSC/SSC-Einstellungen analysiert. Zur Normalisierung wurden drei unabhängige Experimente analysiert, die iDC-Kontrolle ohne LPS-Aktivierung auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Ob die verminderte Rekrutierung von T-Zellen in DC/T-Zell-Konjugate durch die HERV-Hüllproteine verursacht wird oder durch andere Faktoren der Chorionkarzinom-Zelllinien, wurde im Folgenden untersucht. Dafür wurden CHO-Zellen mit leerem Vektor, Syncytin-1, -2 und/oder HML-2-kodierenden Plasmiden transfiziert, nach 48 Stunden nach oben beschriebener Ko-Kultur mit DCs eingesetzt und mit CFSE-gefärbten allogenen T-Zellen ko-kultiviert. Die CFSE-positiven T-Zellen wurden ebenfalls im Durchflusszytometer in der DC-Population durch FSC/SSC-Einstellungen der DCs analysiert (Abb. 4.28).

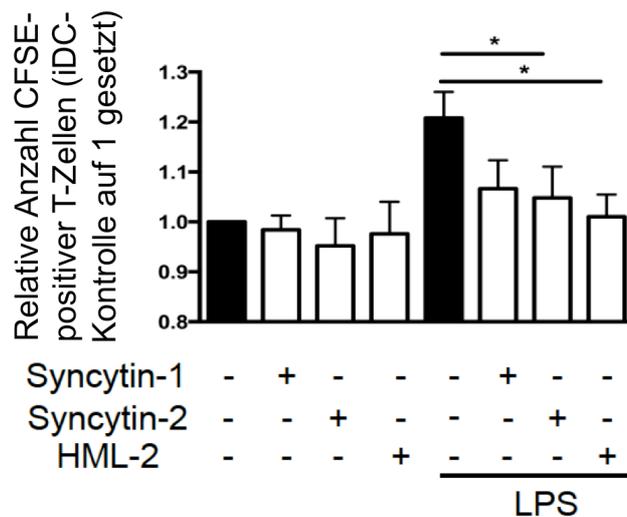


Abbildung 4.28: DC/T-Zell-Konjugatbildung nach Vorbehandlung der DCs mit HERV-Hüllproteinen. iDCs wurden 24 Stunden mit CHO-Zellen 48 nach Transfektion mit leerem Vektor, Syncytin-1, -2 oder HML-2-transfizierten Effektorzellen ko-kultiviert, mit LPS aktiviert oder nicht, mit SEB beladen und mit allogenen CFSE-gefärbten T-Zellen im Verhältnis 1:10 ko-kultiviert. Danach wurden im Durchflusszytometer die CFSE-positiven T-Zellen in der DC-Population durch die FSC/SSC-Einstellungen analysiert. Zur Normalisierung wurden drei unabhängige Experimente analysiert, die iDC-Kontrolle ohne LPS-Aktivierung auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Die Ko-Kultur von LPS-DCs mit der CHO-Kontrollkultur zeigte eine signifikante Zunahme der Rekrutierung von T-Zellen in stabile DC/T-Zell-Konjugate (Abb. 4.28). LPS-DCs, die mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren, zeigten eine verminderte Rekrutierung von T-Zellen in Konjugate, die jedoch nur für Syncytin-2- und HML-2-exprimierende Effektorzellen signifikant war (Abb. 4.28). Die Rekrutierung von T-Zellen in Konjugate durch LPS-DCs war durch die HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen schwächer gehemmt als durch die Chorionkarzinom-Zelllinien, da keine Zunahme in der Konjugatbildung durch Ko-Kultur der LPS-DCs mit Chorionkarzinom-Zelllinien zu sehen war (Abb. 4.27). Dagegen wurde die Konjugatbildung durch Ko-Kultur der LPS-DCs mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen signifikant, jedoch nicht komplett, gehemmt (Abb. 4.28).

Ob die verminderte DC/T-Zell-Konjugatbildung mit einer reduzierten ICAM- und LFA-1-Expression der LPS-DCs einhergeht, wurde im Folgenden analysiert. Dafür wurden iDCs mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen oder CHO-Leervektor-Kontrollen 24 Stunden ko-kultiviert, mit LPS aktiviert und nach weiteren 24 Stunden die Oberflächenexpression von LFA-1 und ICAM anhand von Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 4.29).

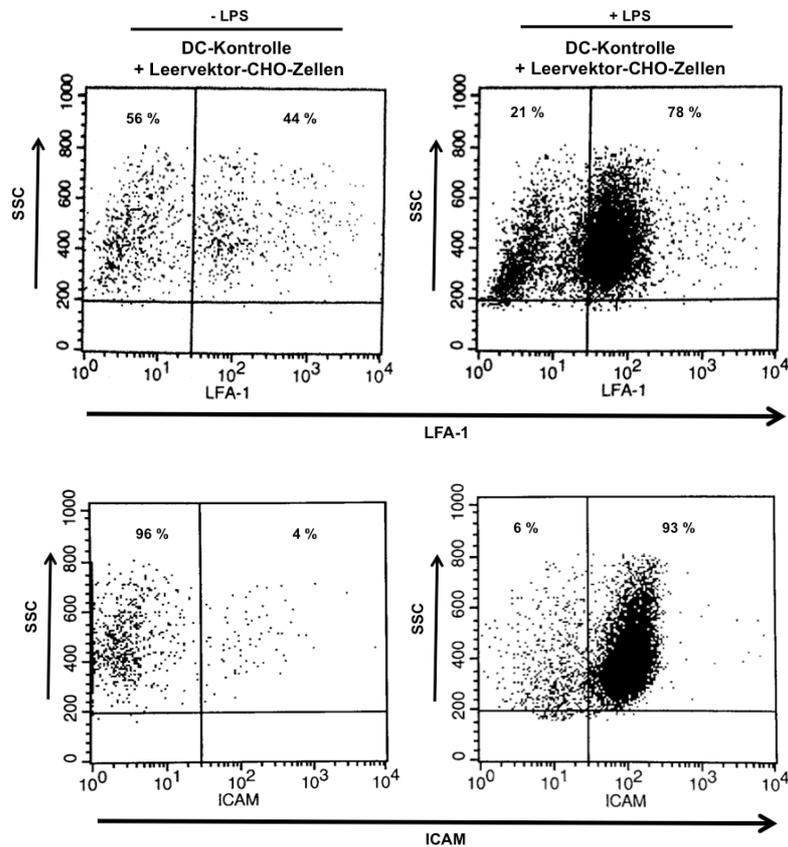


Abbildung 4.29: Exemplarische Darstellung der LFA-1- und ICAM-Expression mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden in der Durchflusszytometrie die LFA-1- (A) und ICAM-positiven (B) Zellen in der DC-Population mit (rechts) und ohne (links) LPS-Aktivierung durch die FSC/SSC-Einstellungen anhand von spezifischen Antikörpern analysiert.

In den LPS-DCs, die mit den CHO-Kontrollkulturen ko-kultiviert worden waren, wurde eine höhere Frequenz von LFA-1- und ICAM-positiven DCs gefunden. Die höhere Frequenz der LFA-1- und ICAM-positiven LPS-DCs wurde aber nicht durch die Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen beeinflusst (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: LFA-1- und ICAM-Expression auf DCs nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen.

	DCs + CHO-Kontrollen	DCs + CHO-Kontrollen	DCs + Syn-1-expr. Effektorzellen	DCs + Syn-2-expr. Effektorzellen	DCs + HML-2-expr. Effektorzellen
	- LPS		+ LPS		
LFA-1 (in %)	43,96 ± 0,44	81,9 ± 3,12	91,86 ± 1,08	86,59 ± 6,44	92,93 ± 0,8
ICAM (in %)	4,13 ± 0,27	91,55 ± 1,34	86,35 ± 1,6	82,93 ± 6,515	86,61 ± 0,425

Die Oberflächenexpression von LFA-1 und ICAM auf DCs nach Ko-Kultur von HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen oder CHO-Kontrollkulturen wurde mit und ohne LPS-Aktivierung von zwei unabhängigen Experimenten analysiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass DCs durch Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen T-Zellen weniger effizient in Konjugate rekrutieren. Die Effizienz der DC/T-Zell-Konjugatbildung war dabei jedoch höher als es die durch Effektorzellen-konditionierten DCs vermittelte stark eingeschränkte Stimulation der allogenen T-Zell-Proliferation vermuten ließ. Deswegen wurde die Funktionalität der DC/T-Zell-Konjugate durch die Ca²⁺- (Kalzium)-Mobilisierung in den T-Zellen analysiert. Kalzium ist ein wichtiges Signalmolekül für die T-Zell-Aktivierung und wird nach TZR-Aktivierung mobilisiert.

Dafür wurden iDCs mit Chorionkarzinom-Zelllinien ko-kultiviert und anschließend mit LPS aktiviert und SEB beladen. Danach wurden die DCs mit den allogenen T-Zellen, die mit dem Ca²⁺-Farbstoff Fluo-4-vormarkiert worden waren, ko-kultiviert. Anschließend wurden Fluo-4-positive T-Zellen innerhalb der DC-Population durch die FSC/SSC-Einstellungen im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 4.30).

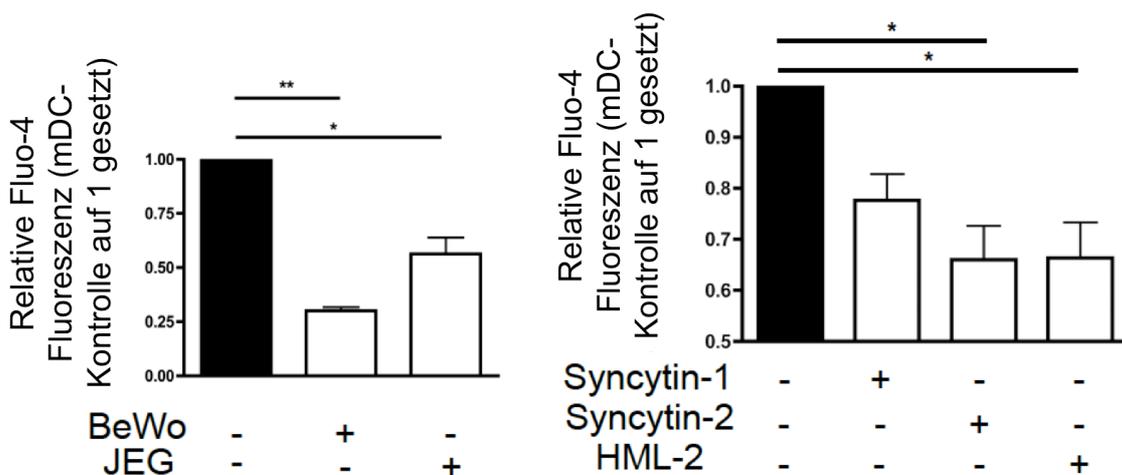


Abbildung 4.30: Ca^{2+} -Mobilisierung in T-Zellen nach Kontaktierung mit allogenen DCs, welche mit Chorionkarzinom-Zelllinien oder HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen vorbehandelt worden waren.

Dafür wurden iDCs mit Chorionkarzinom-Zelllinien (links) oder mit Effektorzellen (rechts) kultiviert und mit LPS aktiviert und SEB beladen. Anschließend wurden diese DCs mit Fluo-4-markierten allogenen T-Zellen kontaktiert und Fluo-4-positive allogene T-Zellen in der DC-Population im Durchflusszytometer durch die FSC/SSC-Einstellungen analysiert. Zur Normalisierung wurden fünf unabhängige Experimente analysiert, die LPS-DC-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Unkonditionierte LPS-DCs führten zu einer Ca^{2+} -Mobilisierung in allogenen T-Zellen (Abb. 4.30). Dagegen hemmte die Ko-Kultur von LPS-DCs mit BeWo- und JEG-Zellen die Rekrutierung von T-Zellen in Konjugate (Abb. 4.29), was mit einer geringeren Ca^{2+} -Mobilisierung in den T-Zellen assoziiert war (Abb. 4.30). Dabei war die Ca^{2+} -Mobilisierung signifikant effektiver durch BeWo-Zellen als durch JEG-Zellen gehemmt (Abb. 4.30).

Um zu untersuchen, inwieweit die HERV-Hüllproteine für den Verlust der Konjugat-Funktionalität verantwortlich sind, wurden iDCs mit Effektorzellen ko-kultiviert. Diese iDCs wurden mit LPS aktiviert und SEB beladen und mit Fluo-4-markierten allogenen T-Zellen kontaktiert, deren Fluoreszenzsignal im Durchflusszytometer analysiert wurde (Abb. 4.30).

Die DCs, die mit CHO-Kontrollkulturen konditioniert worden waren, führten zu einer effektiven Ca^{2+} -Mobilisierung in allogenen T-Zellen. Dagegen vermittelten DCs, die mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren, eine nur sehr eingeschränkte T-Zell-Aktivierung, was jedoch nur für Syncytin-2- und HML-2-exprimierende Effektorzellen signifikant war (Abb. 4.30). Wie für die Konjugatbildung selbst, waren BeWo- und JEG-Zellen auch hinsichtlich ihrer Effizienz, mit der Ausbildung funktioneller Konjugate zwischen konditionierten DCs und T-Zellen zu interferieren, effizienter als die CHO-Effektorzellen (Abb. 4.28 und 4.30).

4.4.7. Chorionkarzinom-Zelllinien und HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen hemmten die Aktivität der immunologischen Synapse

Ob die geringere DC/T-Zell-Konjugatbildung und die Reduktion der T-Zell-Aktivierung in der Bildung einer abnormalen immunologischen Synapse (IS) resultierte, wurde im Folgenden analysiert. Eine stimulatorische IS ist mit einer stabilen DC/T-Zell-Konjugatbildung assoziiert, welche durch einen Ausschluss von F-Aktin aus dem Zentrum der IS gekennzeichnet ist. Zusätzlich ist eine TZR-Aktivierung mit einer Aktivierung von Tyrosinkinasen für die Übertragung des TZR-Signals verbunden.

Im konfokalen Mikroskop wurde die Akkumulation von F-Aktin anhand des Farbstoffes Phalloidin, welches irreversibel an F-Aktin bindet, und die Aktivität von Tyrosinkinasen mittels eines Phospho-Tyrosin (p-tyr) spezifischen Antikörpers in der IS untersucht.

Um den Einfluss HERV-exprimierender Chorionkarzinom-Zelllinien auf die Bildung der IS zu analysieren, wurden iDC mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultiviert und mit LPS aktiviert und SEB beladen. Danach wurden die DCs mit zehnfach mehr allogenen T-Zellen 20 Minuten inkubiert, fixiert und mit Phalloidin-594 (rote Fluoreszenz) und einem p-Tyr-Antikörper (mit Alexa-488 markiertem (grüne Fluoreszenz) Sekundärantikörper) gefärbt. Mindestens 30 verschiedene IS wurden in jeder Ko-Kultur mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet (Abb. 4.31).

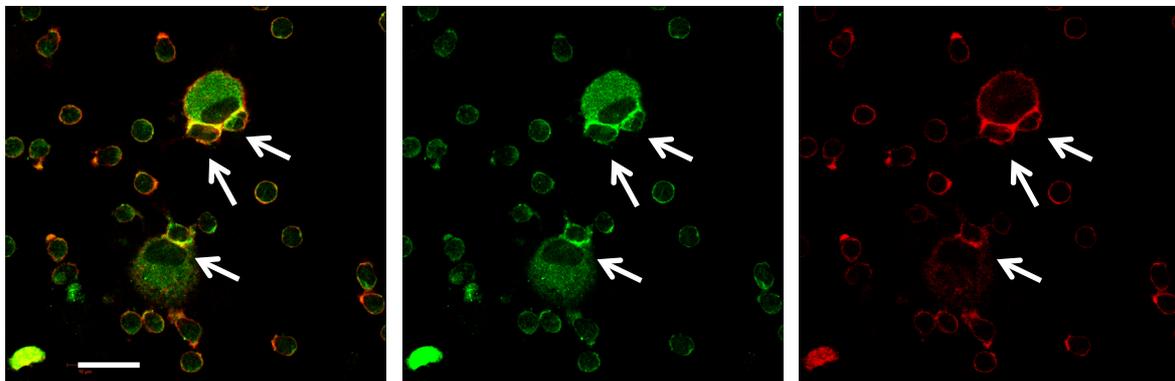


Abbildung 4.31: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der immunologischen Synapse in den Kontrollen.

Dafür wurden die Konjugate mit Phalloidin (rote Fluoreszenz) 594 nm und p-Tyrosin (mit Alexa 488 nm (grüne Fluoreszenz) Sekundärantikörper) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Die IS wurde im konfokalen Mikroskop mit einem 40x-Ölobjektiv und mit einer 2x digitalen Vergrößerung aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen DC/T-Zell-Konjugate und der weiße Balken gibt den Abstand von 20 μm an. Links: Überlagerung von Phalloidin und p-Tyrosin, Mitte: p-Tyrosin und rechts: Phalloidin.

Für unkonditionierte DCs konnten die IS (Kontroll-IS) gut analysiert werden. Sie hatten eine eindeutige F-Aktin- und p-Tyr-Verteilung (Abb. 4.31 weiße Pfeile). So bildeten die meisten DCs funktionelle IS mit T-Zellen, da eine Akkumulation von p-Tyrosin in und ein Ausschluss von F-Aktin aus der zentralen IS erkennbar war (Abb. 4.31 weiße Pfeile).

Dagegen konnten zwar Konjugate zwischen Chorionkarzinom-Zelllinien konditionierten DCs und T-Zellen beobachtet werden (BeWo- bzw. JEG-IS), diese zeigten jedoch keine klassische Umverteilung von F-Aktin, sondern ein diffuses Verteilungsmuster (Abb. 4.32 weiße Pfeile). Ebenfalls war in den BeWo- und JEG-IS keine Akkumulation von p-Tyrosin zu erkennen (Abb. 4.32).

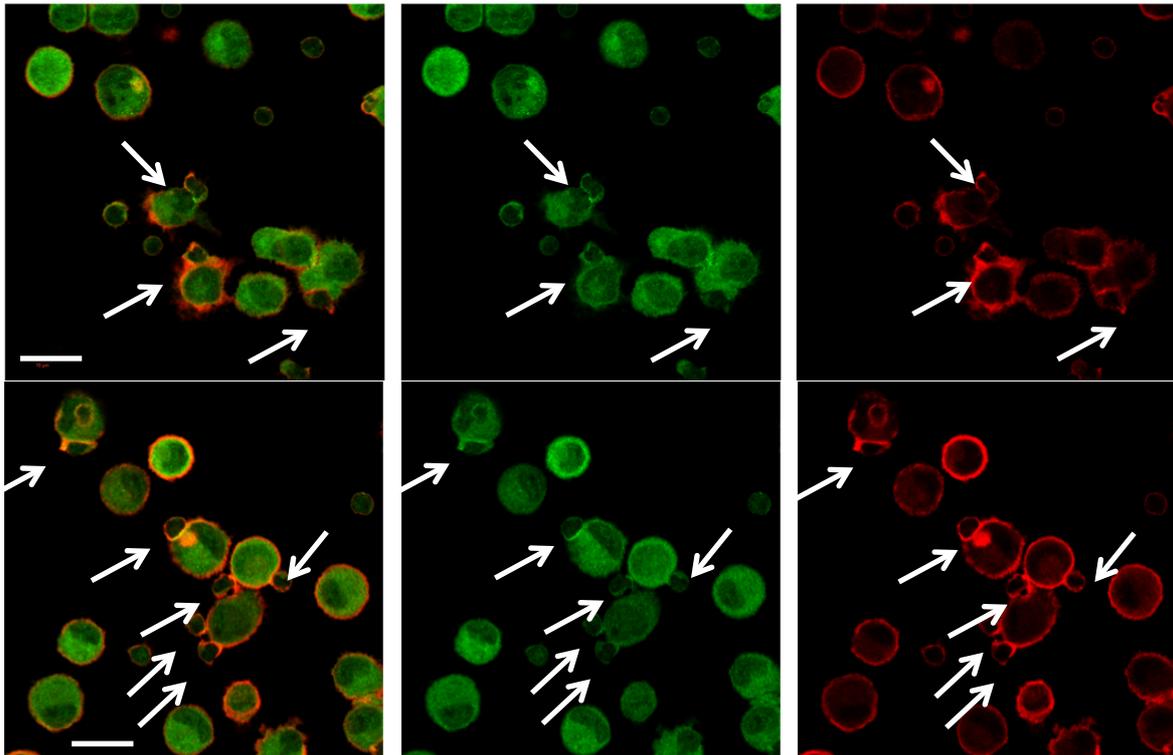


Abbildung 4.32: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der IS, die mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultiviert worden waren.

Dafür wurden die Konjugate mit Phalloidin (rote Fluoreszenz) 594 nm und p-Tyrosin (Alexa-488 nm (grüne Fluoreszenz) Sekundärantikörper gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Die IS wurde im konfokalen Mikroskop mit einem 40x-Ölobjektiv und mit einer 2x digitalen Vergrößerung aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen DC/T-Zell-Konjugate und der weiße Balken gibt den Abstand von 20 µm an. IS sind dargestellt, die mit BeWo- (oben) und JEG-Zellen (unten) konditioniert worden waren. Links: Überlagerung von Phalloidin und p-Tyrosin, Mittel: p-Tyrosin und rechts: Phalloidin.

Die exakte Auswertung der IS war jedoch nicht mit einer 2D-Darstellung in einer 40x-Vergrößerung möglich (Abb. 4.32), da einige der immunologischen Synapsen nicht im Fokusbereich der aufgenommenen Ebene lagen. Deswegen wurde durch ein implementiertes Softwaretool eine 3D-Rekonstruktion der IS hergestellt, welche aus 20 - 30 Z-Stapel mit einem Abstand von 0,15 µm bestand (Abb. 4.33).

Mittels der Z-Stapel-Analyse war die Darstellung einzelner IS im Detail und damit eine exakte Aussage über die Signalverteilung möglich.

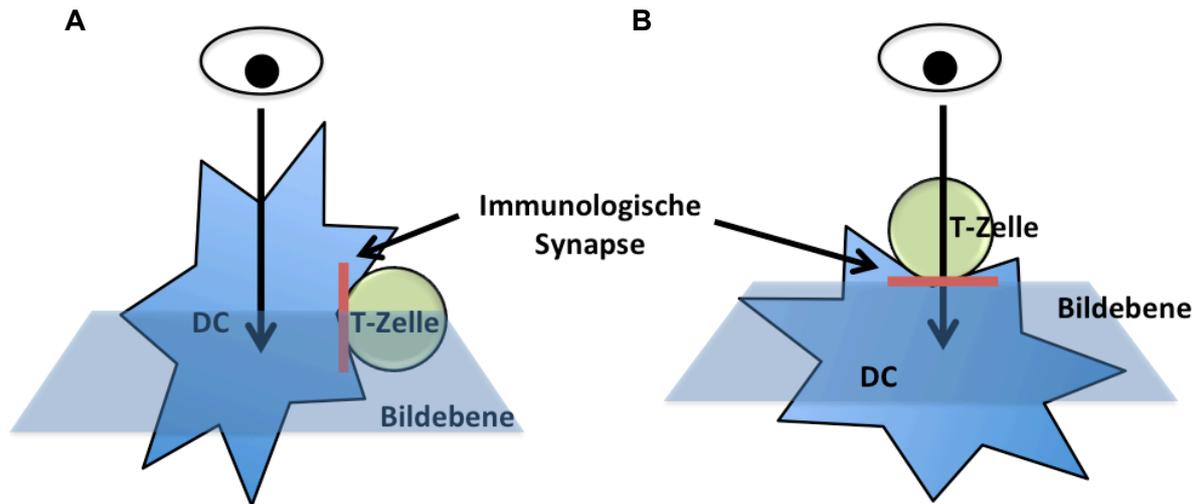


Abbildung 4.33: Schematische Darstellung der IS-Bildebene durch die 3D-Rekonstruktion. Im Abstand von $0,15\ \mu\text{m}$ wurden 20 - 30 Bilder entlang der IS gemacht (A), somit kann die Signalverteilung in der kompletten IS rekonstruiert und visualisiert werden (B) (modifiziert nach (Biggs, *et al.*, 2011)).

Anhand der 3D-Rekonstruktion war eine Signalverteilung von F-Aktin und p-Tyrosin in den Kontroll-IS darstellbar (Abb. 4.34 oben). Dabei war ein Ausschluss von F-Aktin aus dem Zentrum der IS zu sehen, jedoch eine Anreicherung des F-Aktin-Signals an den Zell-Zell-Kontaktstellen der IS. In der Mitte der IS war eine Akkumulation von p-Tyrosin deutlich zu erkennen (Abb. 4.34 oben).

Die BeWo- und JEG-IS zeigten dagegen eine andere Signalverteilung (Abb. 4.34 Mitte und unten). Hierbei war ein Ausschluss der p-Tyr-Akkumulation im Zentrum der IS zu erkennen. Darüber hinaus war eine starke F-Aktin-Akkumulation in der gesamten IS sichtbar und nicht nur an den Zell-Zell-Kontaktstellen.

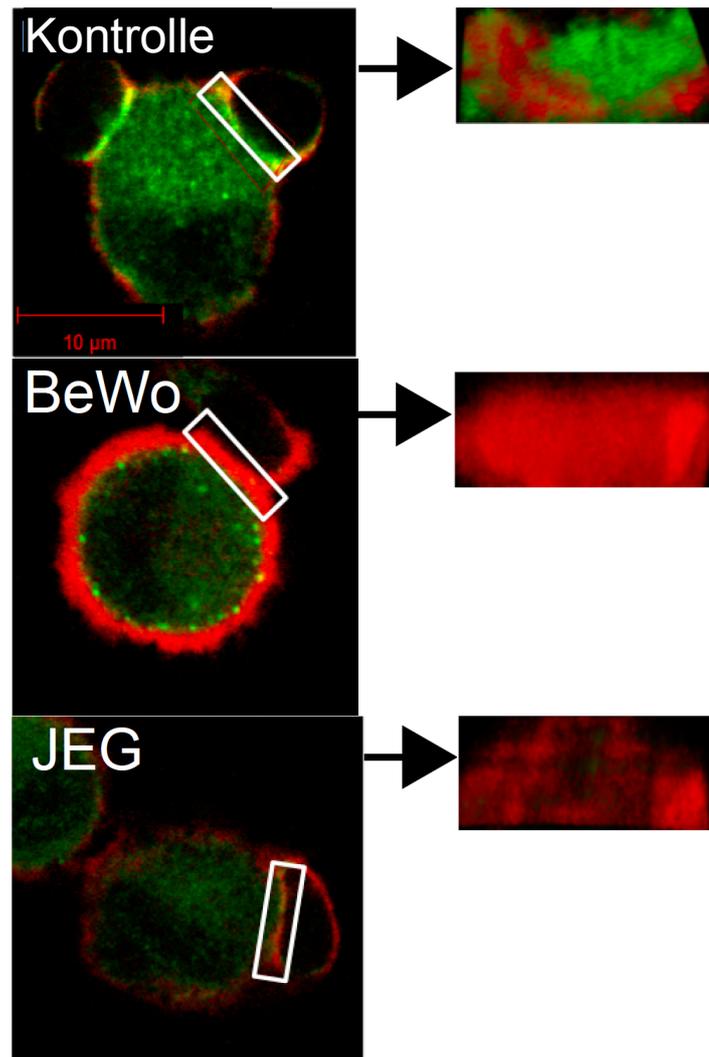


Abbildung 4.34: 3D-Rekonstruktion der IS von DC/T-Zell-Konjugaten, die mit Chorionkarzinom-Zelllinien ko-kultiviert worden waren.

Die analysierte IS ist im linken Bild mit einer weißen Box markiert und im rechten Bild aus Blickrichtung der T-Zellen in Richtung der IS aus dem 3D-Konstrukt dargestellt. Unbehandelte DCs (oben), BeWo- (Mitte) und JEG- (unten) vorbehandelte DCs wurden mit T-Zellen ko-kultiviert und mit p-Tyrosin (Sekundärantikörper α -Maus Alexa 488 nm – grüne Fluoreszenz) und Phalloidin (Alexa 594 nm – rote Fluoreszenz) gefärbt. Die Aufnahmen wurden aus 20 - 30 Z-Stapel im Abstand von 0,15 μ m mittels eines konfokales Mikroskops gemacht. Die IS wurden mittels konfokaler Mikroskopie mit einem 40x-Ölobjektiv und mit einer 4x digitalen Vergrößerung aufgenommen (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Um den Effekt von HERV-Hüllproteinen auf die IS-Konjugatbildung und -Signalverteilung zu untersuchen, wurden DC/T-Zell-Konjugate, die mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren, analysiert. Dafür wurden iDCs mit Effektorzellen ko-kultiviert und mit LPS aktiviert und SEB beladen. Diese DCs wurden mit allogenen T-Zellen im Verhältnis 1:10 inkubiert, fixiert und mit Phalloidin und einem p-Tyr-Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet.

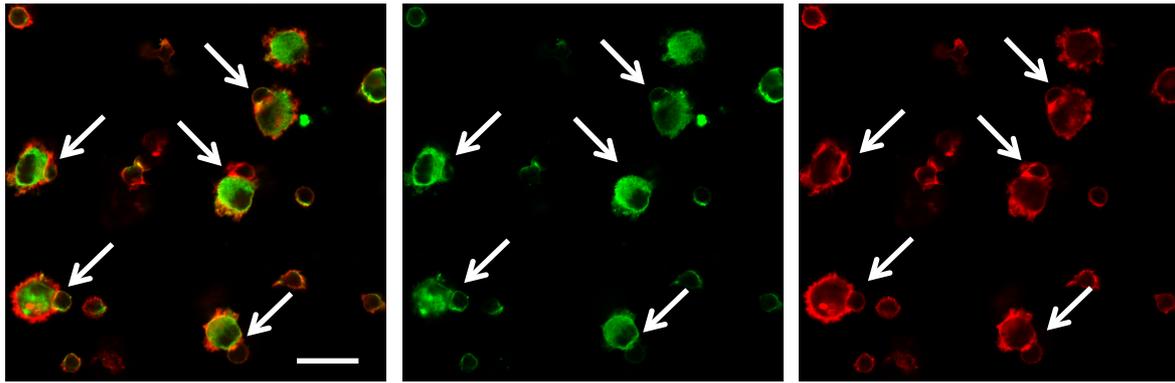


Abbildung 4.35: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der IS, die mit CHO-Kontrollkulturen ko-kultiviert worden waren.

Dafür wurden die Konjugate mit Phalloidin (rote Fluoreszenz) 594 nm und p-Tyrosin (mit Alexa 488 nm (grüne Fluoreszenz) Sekundärantikörper) gefärbt und mit konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Die IS wurde im konfokalen Mikroskop mit einem 40x-Ölobjektiv und mit einer 2x digitalen Vergrößerung aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen DC/T-Zell-Konjugate und der weiße Balken gibt den Abstand von 20 µm an. Links: Überlagerung von Phalloidin und p-Tyrosin, Mitte: p-Tyrosin und rechts: Phalloidin.

Dabei zeigten die IS von DCs, die mit CHO-Kontrollkulturen (CHO-Kontroll-IS) vorbehandelt worden waren (Abb. 4.35), oftmals einen eindeutigen Ausschluss von F-Aktin aus der zentralen IS und eine Akkumulation von p-Tyrosin. Dagegen war in den IS von DCs, die die mit Syncytin-1, -2 oder HML-2-exprimierenden Effektorzellen (Syncytin-1-, -2-, HML-2-IS) vorbehandelten worden waren, ein diffuses Bild erkennbar und es konnte keine eindeutige Signalverteilung beobachtet werden (Abb. 4.36).

Eine genaue Auswertung der IS war mit der 40x-Vergrößerung ebenfalls wie schon mit den IS aus Abb. 4.31 und 4.32 nicht möglich, da keine eindeutige Signalverteilung in der gesamten IS zu erkennen war (Abb. 4.35 und 4.36) und darüber hinaus waren viele IS nicht im Fokusbereich, was eine Auswertung einzelner IS notwendig machte.

Deswegen wurde für eine exakte Analyse der einzelnen IS ebenfalls, wie in Abbildung 4.34, eine 3D-Rekonstruktion aus 20 - 30 Z-Stapeln im Abstand von 0,15 µm mittels konfokaler Mikroskopie gemacht (Abb. 4.37).

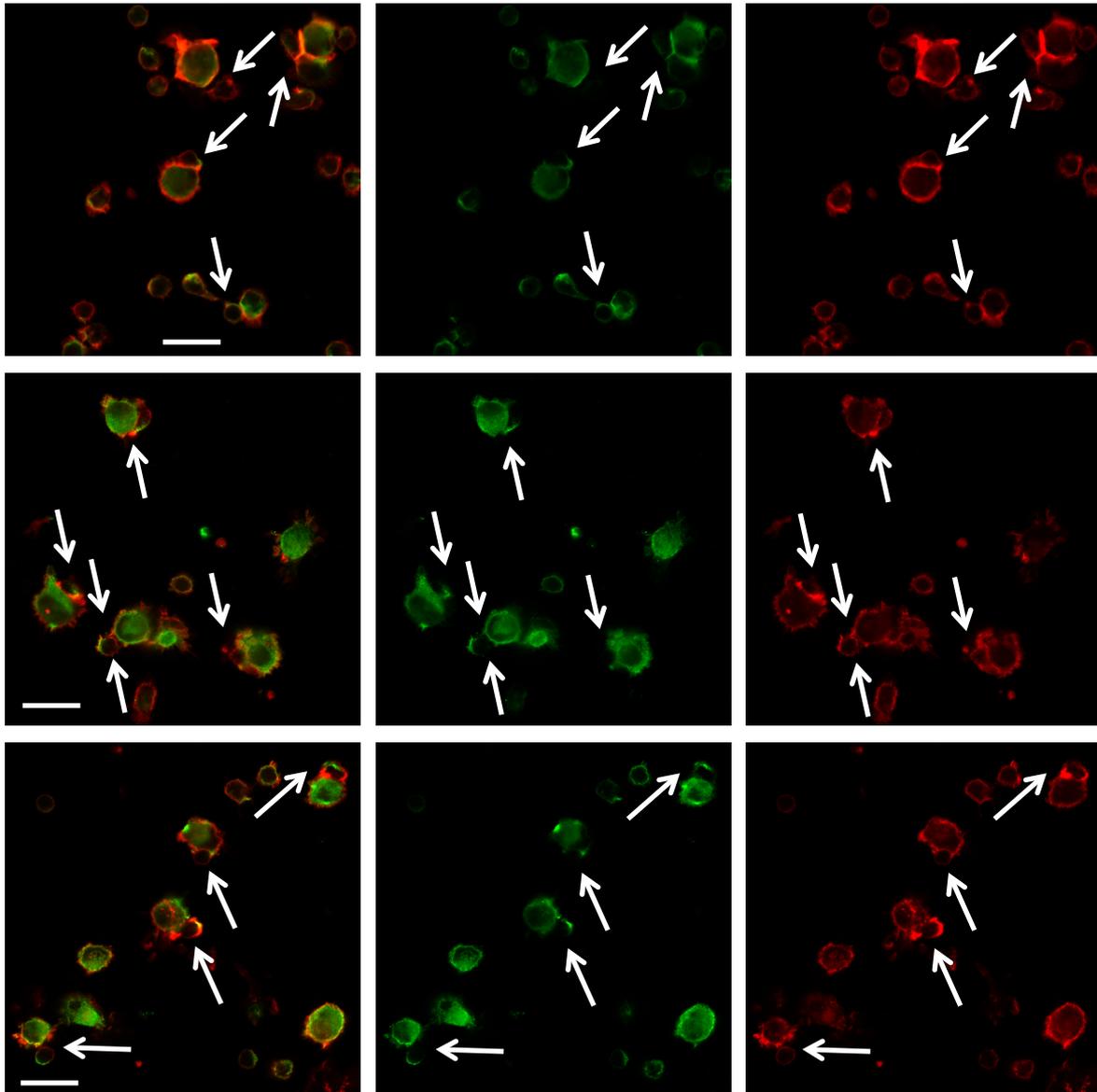


Abbildung 4.36: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der IS, die mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren.

Syncytin-1-IS (oben), Syncytin-2-IS (Mitte) und HML-2-IS (unten) wurden mit Phalloidin (rote Fluoreszenz) 594 nm und p-Tyrosin (mit Alexa-488 nm (grüne Fluoreszenz) Sekundärantikörper) gefärbt und mit konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Die IS wurde im konfokalen Mikroskop mit einem 40x-Öbektiv und mit einer 2x digitalen Vergrößerung aufgenommen. Die weißen Pfeile zeigen DC/T-Zell-Konjugate und der weiße Balken gibt den Abstand von 20 μm an. Links: Überlagerung von Phalloidin und p-Tyrosin, Mitte: p-Tyrosin und rechts: Phalloidin.

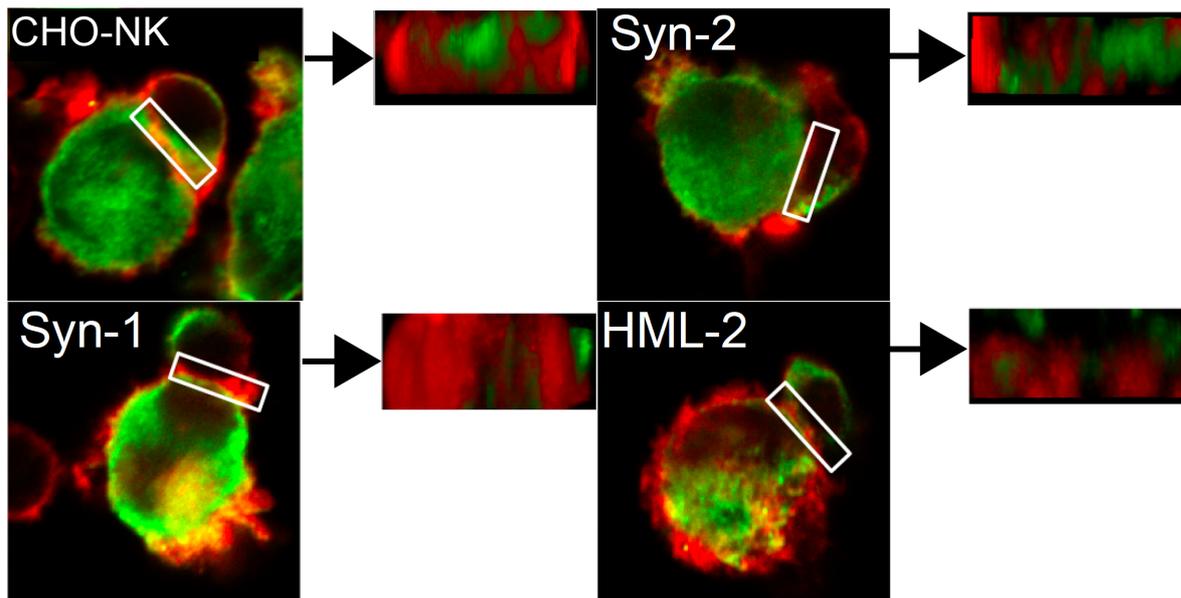


Abbildung 4.37: 3D-Rekonstruktion der IS von DC/T-Zell-Konjugaten, die mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren.

Die analysierte IS ist im linken Bild mit einer weißen Box markiert und im rechten Bild aus Blickrichtung der T-Zellen in Richtung der IS aus dem 3D-Konstrukt dargestellt. CHO-Kontroll-IS (oben links), Syncytin-1- (unten links), Syncytin-2- (oben rechts) und HML-2-IS (unten rechts) wurden mit p-Tyrosin (Sekundärantikörper Alexa 488 nm – grüne Fluoreszenz) und Phalloidin (Alexa 594 nm – rote Fluoreszenz) gefärbt. Die Aufnahmen wurden aus 20 - 30 Z-Stapel im Abstand von 0,15 μm mittels konfokaler Mikroskopie gemacht. Die IS wurde im konfokalen Mikroskop mit einem 40x-Ölobjektiv und mit einer 4x digitalen Vergrößerung aufgenommen (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

In den CHO-Kontroll-IS wurde eine normale Signalverteilung von F-Aktin und p-Tyrosin anhand der 3D-Rekonstruktion gefunden (Abb. 4.37). Dabei war ein Ausschluss des F-Aktin-Signals in der Mitte der IS, eine Anreicherung des F-Aktin-Signals an den Rändern der IS und in der Mitte ist eine Akkumulation von p-Tyrosin zu erkennen (Abb. 4.37).

Die Syncytin-1-, -2- und HML-2-IS dagegen zeigten eine unterschiedliche Signalverteilung. Bei den Syncytin-1-IS war keine p-Tyr-Akkumulation in der zentralen IS zu erkennen, aber eine starke Anreicherung von F-Aktin in der gesamten IS. Im Gegensatz dazu waren in den Syncytin-2- und HML-2-IS weder eine Akkumulation von F-Aktin noch von p-Tyr zu erkennen (Abb. 4.37). Jedoch war in den Syncytin-1-, -2- und/oder HML-2-IS eine p-Tyr-Akkumulation in den T-Zellen außerhalb der IS zu erkennen (Abb. 4.33). Die IS-Analysen wurden mittels konfokaler Mikroskopie quantifiziert (Abb. 4.38). Dabei wurde die Frequenz an gebildeten DC/T-Zell-Konjugaten mit der Frequenz an stimulatorischen IS in Kontroll-IS bzw. CHO-Kontroll-IS mit den BeWo- und JEG-IS bzw. Syncytin-1-, -2- und HML-2-IS verglichen.

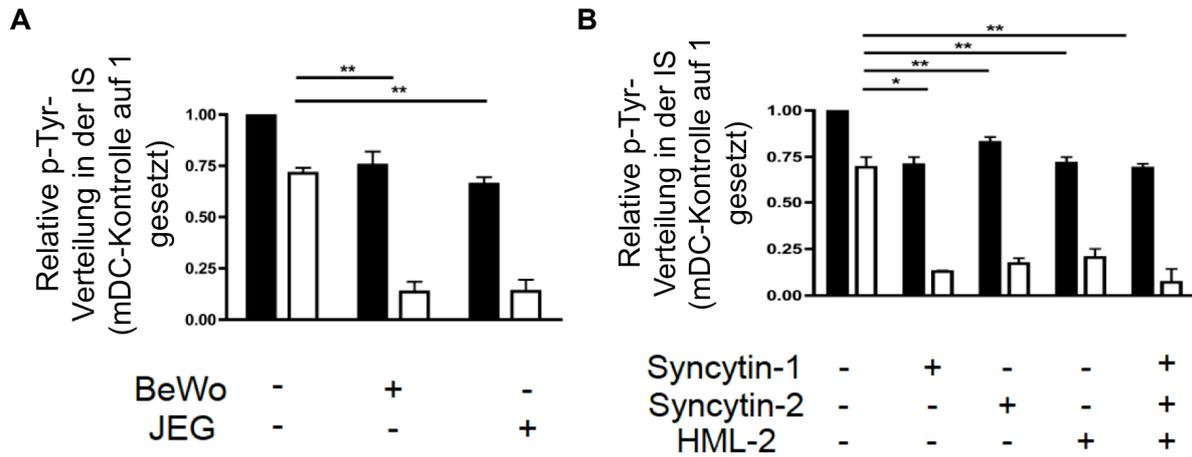


Abbildung 4.38: Quantifizierung der DC/T-Zell-Konjugate.

A. Quantifizierung der BeWo- und JEG-IS sowie B. Syncytin-1-, -2- und HML-2-IS. Die schwarzen Balken zeigen die gesamten DC/T-Zell-Konjugate und die weißen Balken zeigen die geformten IS. Zur Normalisierung wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils 20-30 Z-Stapeln analysiert und die LPS-DC-Kontrolle auf 1 gesetzt (modifiziert nach (Hummel, *et al.*, 2015)).

Ebenso wie mit der Durchflusszytometrie-basierten Quantifizierung der DC/T-Zell-Konjugate gezeigt (Abb. 4.28 und 4.29), bildeten Kontroll-DCs (unbehandelt- oder CHO-Kontrollen) effiziente DC/T-Zell-Konjugate (Abb. 4.38). Darüber hinaus wurden nicht nur weniger DC/T-Zell-Konjugate in den BeWo- oder JEG-IS bzw. HERV-Hüllprotein-IS gebildet, sondern auch signifikant weniger stimulatorische IS gefunden. Dabei wurde kein Unterschied in der IS-Signalverteilung von BeWo- und JEG-IS gefunden und nur schwache Unterschiede mit den HERV-Hüllprotein-IS.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines transgenen Expressionssystems in CHO-Zellen gezeigt, dass von den HERV-Hüllproteinen Syncytin-1, -2 und HML-2 keine direkte Inhibition auf die Proliferation von T-Zellen ausgeübt wurde. Diese HERV-Hüllproteine konditionierten vielmehr DCs, welche dadurch sehr eingeschränkt in der Lage waren, T-Zellen in stabile DC/T-Zell-Konjugate zu rekrutieren, sowie in T-Zellen effizient Ca^{2+} zu mobilisieren (Syncytin-2 und HML-2). Ebenfalls wurde die Signalverteilung von p-Tyrosin und F-Aktin in der immunologischen Synapse, sowie die T-Zell-Proliferation durch diese konditionierten allogenen DCs verändert (durch alle drei HERV-Hüllproteine).

Die HERV-Rezeptoren ASCT-1, -2 und MFSD2A sind eine essentielle Voraussetzung für eine Fusion von Trophoblasten während der Plazentation (Blond, *et al.*, 2000, Esnault, *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde eine Oberflächenexpression dieser Rezeptoren auf T-Zellen sowie DCs zum ersten Mal nachgewiesen (Abb. 4.1). Dies lässt eine mögliche Bindung der HERV-Hüllproteine an diese Immunzellen vermuten. Es ist unklar, ob diese Bindung eine Voraussetzung für eine funktionelle Interaktion und/oder eine Konditionierung dieser Immunzellen ist, dies wird später detaillierter diskutiert.

Die Konditionierung von T-Zellen mit den Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG führte zu einer Hemmung der PMA/Ionomycin-stimulierten Proliferation, dagegen konnte dies nicht für die HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen gezeigt werden (Abb. 4.10 & 4.11). Dagegen zeigte die Konditionierung von T-Zellen durch Syncytin-1- und -2-exprimierende Effektorzellen nur einen marginalen inhibitorischen Effekt auf die PMA/Ionomycin-stimulierte Proliferation, die jedoch nicht signifikant war. Ebenfalls hatte die Konditionierung von T-Zellen durch HML-2-exprimierende Effektorzellen keinen Einfluss auf die PMA/Ionomycin-stimulierte Proliferation zur Folge (Abb. 4.11). Zusätzlich konnten bei einer Ko-Expression der HERV-Hüllproteine keine Auswirkungen auf die PMA/Ionomycin-stimulierte T-Zell-Proliferation gefunden werden (Abb. 4.12), sodass eine additive Wirkung dieser Proteine ausgeschlossen werden kann. Eine Studie von Morozov zeigte jedoch, dass eine Inhibition der PBMC- sowie Splenozyten-Expansion nach ConA- bzw. Phytohaemagglutinin-Stimulation durch die Transmembran-Domäne des rekombinanten HML-2-Proteins oder dessen ISD-Peptid hervorgerufen werden konnte (Morozov, *et al.*, 2013). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen dieser Studie,

in der HML-2-exprimierende Effektorzellen die PMA/Ionomycin-stimulierte T-Zell-Proliferation nicht hemmten (Abb. 4.11). Diese Diskrepanz kann mehrere Ursachen haben. Zum einen war die Zielpopulation in dieser Arbeit angereicherte T-Zellen aus PBLs und von Morozov und Mitarbeitern wurden PBMCs bzw. Splenozyten verwendet. Des Weiteren wurden unterschiedliche Stimulationsprotokolle verwendet, so wurden in dieser Arbeit die aufgereinigten T-Zellen sehr effizient mit PMA/Ionomycin stimuliert, in der Morozov-Studie wurde dagegen eine ConA- und Phytohaemagglutinin-Stimulation verwendet. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, ob eine TZR-stimulierte T-Zell-Proliferation durch die HERV-Hüllproteine gehemmt wird, da die Konditionierung von T-Zellen mit CHO-Kontrollkulturen bereits zu einer Hemmung der α -CD3⁺- und α -CD28⁺-Antikörper-stimulierten Proliferation führte (Tabelle 4.1). Da Hamster- (CHO-) Zellen keinen Effekt auf die Proliferation von humanen T-Zellen haben dürften und keine Hinweise dazu in Literatur zu finden sind, kann die Ursache der Hemmung der α -CD3⁺- und α -CD28⁺-Antikörper-vermittelten T-Zell-Stimulation durch CHO-Kontrollkulturen an dieser Stelle nicht geklärt werden. Schließlich fallen auch methodische Unterschiede zu der Arbeit von Morozov auf, da in der vorliegenden Arbeit ein Zell-Zell-Kontakt-System mit Oberflächenexpression der HERV-Proteine verwendet wurde (Abb. 4.7), diesem steht ein System gegenüber, in dem aufgereinigte Proteine oder BSA-gebundene Peptide verwendet wurden. Diese aufgereinigten Proteine oder BSA-gebundenen Peptide zeigten erst in höheren Konzentrationen einen wirkungsvollen hemmenden Effekt, welche wahrscheinlich die HERV-Protein-Konzentration überstiegen, die mit dem transienten Transfektionssystem in CHO-Zellen dieser Arbeit erreicht wurden (Morozov, *et al.*, 2013). Dazu kommt, dass in der vorliegenden Arbeit die HERV-Hüllproteine durch die Expression auf der Oberfläche von Effektorzellen durch das transiente Transfektionssystem als membranständige Proteine exprimiert werden, welche durch die rekombinante Herstellung von Proteinen verloren geht. Durch den Verlust der Membranständigkeit ist es nicht auszuschließen, dass sich die rekombinanten Proteine funktionell unterscheiden.

Dagegen ist in der vorliegenden Arbeit mehrfach gezeigt worden, dass die transiente Expression der HERV-Hüllproteine funktionell ist und dies daher nicht die Unterschiede zu den Chorionkarzinom-Zelllinien erklären würde (Abb. 4.4). Die Funktionalität des Fusionsproteins Syncytin-1 wurde mittels eines Fusionsexperimentes gezeigt, indem 48 Stunden nach Ko-kultur von Syncytin-1-exprimierenden CHO-Zellen mit ASCT-2-exprimierenden CHO-Zellen riesenkernige Zellen („*giant nuclei*“) gefunden wurden (Abb. 4.8). Außerdem zeigten weitere Experimente, dass alle drei HERV-Hüllproteine

(Syncytin-1, -2 und HML-2) DCs modulierten und deren Aktivität, T-Zellen in stabile DC/T-Zell-Konjugate zu rekrutieren (Abb. 4.27 & 4.28) sowie die allogene T-Zell-Proliferation zu stimulieren, stark einschränkten (Abb. 4.21 & 4.22).

Es wurde zusätzlich die HERV-Hüllprotein-Oberflächenexpression von BeWo- und JEG-Zellen mit der im transienten CHO-Expressionssystem verglichen, um Unterschiede in der T-Zell-Proliferation zu erklären. Jedoch war die Oberflächenexpression zwischen den Chorionkarzinom-Zelllinien und dem transienten CHO-Expressionssystem sehr vergleichbar oder sogar teilweise etwas stärker in den CHO-Effektorzellen. Die Oberflächenexpression der HERV-Hüllproteine in dem transienten CHO-Expressionssystem konnte ebenfalls über den gesamten Zeitraum des Experimentes gewährleistet werden (Abb. 4.4 & 4.7).

Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Inhibition der T-Zell-Proliferation von Chorionkarzinom-Zelllinien durch HERV-Hüllproteine ausgeübt wird, somit sind vermutlich andere Faktoren dafür verantwortlich (Hummel, *et al.*, 2015).

Neben T-Zellen sind APCs eine wichtige Immunzellpopulation und dort insbesondere DCs, welche eine regulatorische Funktion auf verschiedene Immunzellpopulationen in der Plazenta haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Effekt von der Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG auf die LPS-vermittelte Reifung von DCs festgestellt werden (Abb. 4.14). Lediglich das CD86⁺-Expressionsniveau auf DCs, die mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultiviert worden waren, war vor LPS-Aktivierung erhöht, jedoch war keiner der analysierten DC-Reifungsmarker (CD86⁺, CD40⁺ und HLA-DR⁺) nach LPS-Aktivierung durch Ko-Kultur mit BeWo- oder JEG-Zellen signifikant verändert.

Genau wie die Chorionkarzinom-Zelllinien hatten die HERV-Hüllproteine keine oder nur geringe Auswirkungen auf die phänotypische Reifung von LPS-aktivierten DCs (LPS-DCs) (Abb. 4.17). Jedoch hemmten Syncytin-1- und -2-exprimierende Effektorzellen die LPS-vermittelte CD86⁺-Expression auf DCs, zusätzlich schwächten Syncytin-1-exprimierende Effektorzellen die HLA-DR-Expression der LPS-DCs. HML-2-exprimierende Effektorzellen hatten dagegen keinen Effekt auf die phänotypische Reifung von LPS-DCs. Kein Effekt wurde auch auf den Reifungsmarker CD40⁺ von LPS-DCs durch HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen gefunden. Die Hemmung der CD86⁺- bzw. HLA-DR⁺-Expression auf LPS-DCs durch Syncytin-1- bzw. -2-exprimierende Effektorzellen und deren biologische Konsequenz ist unklar. Jedoch kann hier nicht von einer Suppression der phänotypischen DC-Reifung gesprochen werden, da ein deutlicher LPS-vermittelter Anstieg

aller Reifungsmarker erfolgte, trotz geringfügiger Unterschiede in den Expressionsniveaus der LPS-DC-Oberflächenmoleküle nach Ko-Kultur.

Ähnliche Ergebnisse ergaben bereits, dass periphere DCs nach Ko-Kultur mit primären *ex vivo* Trophoblasten eine normale LPS-vermittelte phänotypische Reifung anhand von CD40- und CD86-Molekülen zeigten (Salamone, *et al.*, 2012). Andere Arbeiten zeigten ebenfalls, dass Trophoblasten oder rekombinantes Syncytin-1 keinen Effekt auf die phänotypische Reifung von DCs und Monozyten hatten (Grasso, *et al.*, 2014, Salamone, *et al.*, 2012, Tolosa, *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu steht eine Arbeit, in der rekombinantes Syncytin-1 bereits zu einer Hochregulierung der Expression von CD80⁺ und CD86⁺ auf Monozyten, sowie CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺ und HLA-DR⁺ auf DCs in der Abwesenheit von LPS oder anderer Aktivierungen führte (Rolland, *et al.*, 2006). Diese Unterschiede sind aber wahrscheinlich auf eine direkte Interaktion der Effektoren mit den Zielzellen zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein transientes Transfektionssystem mit membranständigen Effektorproteinen verwendet und nicht in die Zellkultur zugefügtes rekombinantes Protein, welches die Membranständigkeit verloren hat und höhere Proteinkonzentrationen benötigt um effektive Wirkungen zu erzielen.

Die TNF- α - und auch IL-12-Produktion von LPS-DCs wurde durch Ko-Kultur mit BeWo- und JEG-Zellen gehemmt, jedoch die IL-10-Produktion induziert (Abb. 4.18).

Diese Daten sind in Einklang mit früheren Befunden, in welchen die Induktion eines anti-inflammatorischen Zytokin-Profiles durch mit Trophoblasten ko-kultivierte DCs beschrieben wurde, die mit einer verminderten Produktion von pro-inflammatorischem IL-12 und TNF- α und einer erhöhten Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 einhergingen (Du, *et al.*, 2014, Grasso, *et al.*, 2014, Guo, *et al.*, 2010, Salamone, *et al.*, 2012, Tolosa, *et al.*, 2012). Außerdem konnte in gesunden Schwangerschaften eine erhöhte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokines IL-10 in dezidualen T-Zellen (Piccinni, *et al.*, 1998) und peripheren NK-Zellen (Fukui, *et al.*, 2008) gegenüber nicht schwangeren Frauen gezeigt werden (Chatterjee, *et al.*, 2014). Hohe Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und auch IL-12 wurden z.B. mit Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie assoziiert (Chaouat, *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass gesunde Schwangerschaften vorwiegend mit einem anti-inflammatorischen Zytokin-Profil einhergehen, zu dessen Etablierung eine DC-Konditionierung durch Trophoblasten *in vivo* und die Chorionkarzinom-Zelllinien *in vitro* beitragen könnten.

Da BeWo-Zellen - aber nicht JEG-Zellen - IL-10 produzieren können (Bennett, *et al.*, 1997), lässt diese Studie für diese Ko-Kulturen keinen Aufschluss über die Quelle der gemessenen

IL-10-Produktion zu (durch BeWo-Zellen oder die konditionierten DCs) (Abb. 4.18). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die IL-10-Produktion von BeWo-Zellen durch die Zugabe von GM-CSF gesteigert werden kann (Bennett, *et al.*, 1997), was auch in unserer Zellkultur zu einer erhöhten IL-10-Produktion geführt haben könnte, da GM-CSF in unserem DC-Zellkulturmedium ebenfalls als Zusatz vorhanden war (Abb. 4.18). Im Gegensatz zu BeWo-Zellen konnte für JEG-Zellen kein direkter Einfluss auf die IL-10-Produktion gezeigt werden, jedoch führte die LPS-Aktivierung in der vorliegenden Arbeit zu einer IL-10-Produktion in der DC-Ko-Kultur mit JEG-Zellen. Bennett zeigte bereits, dass LPS-Aktivierung in JEG-Zellen zu einer Aktivierung von NF- κ B, einer veränderten Zytokinproduktion (nicht IL-10) und zu einer Expression TLR-4-spezifischer Transkripte führte (Bennett, *et al.*, 1997, Komine-Aizawa, *et al.*, 2008, Tangerang, *et al.*, 2014). Dies lässt vermuten, dass - in der vorliegenden Arbeit - die IL-10-Produktion in der JEG-Ko-Kultur durch DCs erfolgte.

Interessant wäre es daher zu analysieren, welche Gen-Expressionen und daraus folgenden Signalwege in den Immunzellen durch die Konditionierung durch HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen verändert werden. So haben Morozov und Kollegen (Morozov, *et al.*, 2013) gezeigt, dass rekombinantes HML-2-Protein die Expression von Genen der angeborenen Immunität (SEPP1, FCN-1, -2 und TREM2) in PBMCs herunterreguliert.

Im Unterschied zu den Chorionkarzinom-Zelllinien hatte keines der transgenen HERV-Hüllproteine einen suppressiven Effekt auf die DC-Zytokinproduktion. Die Ko-Kultur von DCs mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen zeigte keinen Anstieg der IL-10-Produktion (Abb. 4.19). Vielmehr wurde ein Anstieg der LPS-abhängigen Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α durch Syncytin-1- und -2-exprimierende Effektorzellen ermittelt (Abb. 4.19). Es ist unwahrscheinlich, dass der Unterschied zu den Chorionkarzinom-Zelllinien auf methodische Ursachen zurückzuführen ist, da Ko-Kultur- und LPS-Aktivierungsprotokolle sowie Oberflächenexpressionsniveaus der Effektorproteine für CHO-Effektorzellen und Chorionkarzinom-Zelllinien identisch bzw. vergleichbar waren (Abb. 4.4 & Abb. 4.7). Die für die transient-transfizierten HERV-Hüllproteine erhobenen Daten stehen vielmehr in Einklang mit früheren Beobachtungen für Monozyten, die nach Zugabe des rekombinanten Syncytin-1-Proteins stimulationsunabhängig eine Steigerung der IL-12- und TNF- α -Produktion zeigten (Rolland, *et al.*, 2006). Jedoch wurden auch suppressive Eigenschaften von Syncytin-1 gezeigt, wobei in Monozyten und PBMCs eine Hemmung des anti-inflammatorischen Zytokines TNF- α gefunden wurde, was durch Syncytin-1-exprimierende Plazenta-Mikrovesikel induziert worden war (Holder, *et al.*, 2012, Rolland, *et al.*, 2006). Eine Diskrepanz in der Zytokinproduktion von Immunzellen durch

HERV-Hüllproteine ist ein stark diskutiertes Thema. Es wurde beschrieben, dass während der frühen Plazenta-Entstehung pro-inflammatorische Zytokine eine erhebliche Rolle spielen und in der Angiogenese, der Entstehung neuer Blutgefäße, notwendig sind, die für eine ausreichende Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen zum Fetus erforderlich sind (Gude, *et al.*, 2004). So wurden in den verschiedenen Stadien der Schwangerschaft sowohl pro-inflammatorische, aber auch anti-inflammatorische Zytokine gefunden, die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt (Mor, 2008, Mor, *et al.*, 2011). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten lassen vermuten, dass die HERV-Hüllproteine wohl keinen direkten Beitrag zur Produktion anti-inflammatorischer Zytokine durch DCs leisten (Hummel, *et al.*, 2015). Dies wird durch andere bekannte Faktoren auf Trophoblasten unterstützt, welche die Zytokinproduktion modulieren, aber nicht von der HERV-Hüllproteinexpression abhängig sind. So exprimieren Trophoblasten HLA-G und -E, welche zu einer Zytokinmodulation von DCs und zu einer geringeren TNF- α -Produktion führte, aber nicht zu einer geringeren IL-12-Produktion (Steck, *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist bekannt, dass BeWo- (Risk and Johnson, 1990) und JEG-Zellen (Burt, *et al.*, 1991) ebenfalls HLA-G exprimieren, jedoch wurde für die Chorionkarzinom-Zelllinien der Effekt auf die Zytokinproduktion von DCs bisher nicht analysiert.

Obwohl HERV-Hüllproteine aufgrund der gemessenen Oberflächenmarker und Zytokinproduktion zu einer weitgehend normalen Reifung von LPS-DCs führten (Abb. 4.17 & 4.19), waren diese DCs nicht in der Lage, T-Zellen in stabile DC/T-Zell-Konjugate zu rekrutieren (Abb. 4.28). Dabei wurden LPS-DCs durch Syncytin-2- und HML-2-exprimierende Effektorzellen effektiver in der Rekrutierung von T-Zellen gehemmt als durch Syncytin-1-exprimierende Effektorzellen. LPS-DCs, die mit Chorionkarzinom-Zelllinien konditioniert worden waren, waren ebenfalls nicht in der Lage, T-Zellen in stabile DC/T-Zell-Konjugate zu rekrutieren (Abb. 4.27). Die reduzierte DC/T-Zell-Konjugatbildung war jedoch nicht mit einer geringeren Expression von LFA-1 und ICAM auf LPS-DCs assoziiert (Abb. 4.29 & Tabelle 4.3). Jedoch existieren inaktive und aktive Formen des LFA-1 α/β -Heterodimers (CD11a⁺/CD18⁺) (Evans, *et al.*, 2006, Shamri, *et al.*, 2005), in dieser Arbeit wurde LFA-1 nicht hinsichtlich der vorliegenden Form analysiert. Ebenfalls wurden in dieser Arbeit keine weiteren Adhäsionsmoleküle getestet, welche für eine Hemmung der DC/T-Zell-Konjugatbildung oder deren Stabilität verantwortlich sein könnten. Die eingeschränkte Effizienz der DC/T-Zell-Konjugatbildung von LPS-DCs konditioniert mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen und Chorionkarzinom-Zelllinien ging mit einer

geringeren T-Zell-Aktivierung in Form einer verminderten Ca^{2+} -Mobilisierung und $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion einher (Abb. 4.23 & 4.30). Dabei war die Ca^{2+} -Mobilisierung und $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion durch Syncytin-2- und HML-2-exprimierende Effektorzellen effektiver als durch Syncytin-1-exprimierende Effektorzellen gehemmt.

Zusätzlich zu der Reduktion der DC/-T-Zell-Konjugate wurde eine fehlerhafte immunologische Synapsen-Architektur gefunden, welche in einer inkompletten T-Zell-Aktivierung resultierte. Die fehlerhafte IS-Bildung war durch einen fehlerhaften Ausschluss von F-Aktin aus dem Zentrum der IS sowie eine reduzierte p-Tyrosin-Akkumulation in der T-Zelle gekennzeichnet (Abb. 4.34, 4.37 & 4.38). Diese Signalveränderungen in der IS implizierten eine nicht stimulierende IS, wie sie anhand der Beeinträchtigung von Signalmolekülen wie *ZAP-70* und *LAT* sowie verminderter IL-2 Produktion gezeigt wurde (Choi and Schwartz, 2011).

Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob die TZR-Verteilung in der IS durch die DCs beeinflusst wird und diese einen Effekt auf die verminderte T-Zell-Aktivierung haben könnte. Ebenfalls wäre die Analyse von weiteren Adhäsionsmolekülen notwendig, um eventuell die verminderte Bildung von DC/T-Zell-Konjugaten erklären könnte.

Ein modulierender Effekt von Trophoblasten auf Immunzellen wurde bereits in früheren Studien gezeigt. So wurde gezeigt, dass mit primären Trophoblasten konditionierte DCs die klonale T-Zell-Expansion nicht stimulieren konnten (Salamone, *et al.*, 2012, Segerer, *et al.*, 2012) und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen (Tregs) hemmten (Du, *et al.*, 2014). Der Verlust der allostimulatorischen DC-Aktivität auf die allogene T-Zell-Proliferation konnte jedoch bislang nur für die von Trophoblasten sezernierten löslichen Mediatoren wie IDO (Ban, *et al.*, 2013, Salamone, *et al.*, 2012), TSLP (Du, *et al.*, 2014) oder MIC-1 (Segerer, *et al.*, 2012) gezeigt werden. In unserem Ko-Kultur-System ist der Verlust der allostimulatorischen DC-Aktivität auf die T-Zell-Proliferation aber vermutlich nicht auf lösliche Mediatoren zurückzuführen, da die HERV-Hüllproteine auf Hamster-(CHO-) Zellen exprimiert wurden. Jedoch kann es nicht ausgeschlossen werden, dass infolge der HERV-Hüllprotein Konditionierung Faktoren von DCs freigesetzt wurden, welche die T-Zell-Aktivierung hemmten.

Der Effekt der allostimulatorischen Aktivität von DCs, der durch die HERV-Hüllproteine verursacht wurde, war etwas stärker als durch die Chorionkarzinom-Zelllinien (Abb. 4.21 & 4.22). Jedoch war die Reduzierung der DC/T-Zell-Konjugatbildung (Abb. 4.27 & 4.28) und Ca^{2+} -Mobilisierung (Abb. 4.30) durch die Chorionkarzinom-Zelllinien verglichen mit den HERV-Hüllproteinen-exprimierenden Effektorzellen effektiver. Dies kann als mögliche

Ursache haben, dass die Chorionkarzinom-Zelllinien neben HERV-Hüllproteinen zusätzliche Effektor-Proteine exprimieren, wie z.B. HLA-G und HLA-E, welche zu einer Hemmung der TNF- α -Zytokinproduktion von DCs führten (Steck, *et al.*, 2002).

Ob die HERV-Hüllproteinexpression auf den Chorionkarzinom-Zelllinien einen Beitrag zur mangelnden Ausprägung der allostimulatorischen Aktivität der konditionierten DCs leisten, sollte mittels Blockierung der HERV-Hüllproteinexpression auf diesen Zellen untersucht werden.

Da keine blockierenden Antikörper für HERV-Hüllprotein bekannt sind, sollte die Expression der HERV-Hüllproteine auf Chorionkarzinom-Zelllinien durch spezifische siRNAs herunterreguliert werden (Abb. 4.24). Die mangelnde allostimulatorische Aktivität von DCs durch die Chorionkarzinom-Zelllinien konnte durch Ko-Transfektion der BeWo-Zellen mit siRNAs gegen Syncytin-1, -2 und HML-2 nicht wieder hergestellt werden. So konnten die durch Chorionkarzinom-Zelllinien-konditionierten DCs ebenso ineffizient die allogene T-Zell-Expansion stimulieren, wie auch ohne blockierende siRNAs (Abb. 4.25). Dies ist vermutlich auf methodische Gründe zurückzuführen, da die Reduktion der Proteinexpression durch die siRNA-Transfektion nur teilweise für Syncytin-1 und HML-2 effizient war. So war die Oberflächenexpression dieser Proteine nur partiell reduziert und nicht komplett gehemmt, wodurch die potentiellen Effektormoleküle noch für DC-Interaktionen verfügbar waren (Abb. 4.24). Neben der nur partiellen Reduktion der Oberflächenexpression war diese Reduktion für alle drei HERV-Hüllproteine nur über einen kurzen Zeitraum gewährleistet und nicht über die gesamte Dauer des Experiments. Ebenfalls ist wenig über die Konzentrationen bekannt, bei denen die HERV-Hüllproteine noch wirkungsvoll funktionieren.

Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass die Chorionkarzinom-Zelllinien andere Mechanismen aufweisen, welche die Reduktion der HERV-Hüllproteine kompensieren könnten. So ist bekannt, dass Trophoblasten HLA-G und -E exprimieren und dadurch DCs modulieren können die pro-inflammatorische TNF- α -Zytokinproduktion zu hemmen (Steck, *et al.*, 2002). Eine zentrale Rolle spielt auch das humane Choriongonadotropin (hCG), welches von Trophoblasten ausgeschüttet wird und die anti-inflammatorische IL-10-Zytokinproduktion von Tregs fördert (Schumacher, *et al.*, 2013) sowie zu einem tolerogenen DC-Phänotyp führt (Segerer, *et al.*, 2009, Wan, *et al.*, 2008). Diese tolerogenen LPS-aktivierten DCs zeigten eine erhöhte IL-10-Produktion und geringere IL-12- und TNF- α -Produktion und führt zu einer verringerten Stimulation der Antigen-spezifischen T-Zell-Proliferation. Darüber hinaus exprimieren Trophoblasten CD200, für das eine modulierende Aktivität von DCs, Tregs, aber auch Makrophagen vermutet wird (Yu, *et al.*, 2008).

Außerdem haben Bjercke und Kollegen (Bjercke, *et al.*, 1989) eine erhöhte Anzahl suppressiver Monozyten in der Peripherie von Schwangeren gefunden und vermuten, dass diese Monozyten und Monozyten-differenzierte DCs zu einer geringeren Anzahl von T-Zellen in der Schwangerschaft führten.

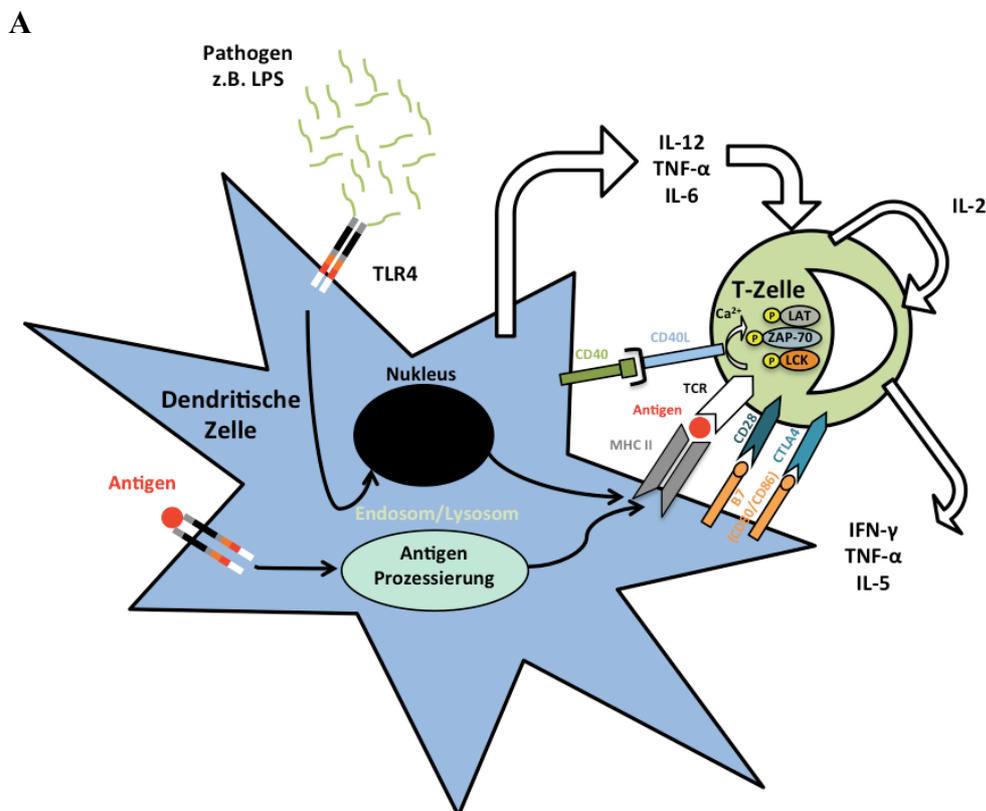
Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Immuntoleranz in der Plazenta alleine von den in dieser Arbeit untersuchten HERV-Hüllproteinen abhängig ist. Für das ebenfalls in der Plazenta exprimierte HERV-H sind bislang keine immunmodulierenden Eigenschaften in der Plazenta bekannt, jedoch erwies es sich bereits, wie auch HERV-FRD (Mangeney, *et al.*, 2007), in einem *tumor rejection assay* als potentiell immunsuppressiv (Mangeney, *et al.*, 2001).

Über die DC-Population in der Plazenta ist sehr wenig bekannt. Die als uterine DCs (uDCs) bezeichneten Zellen zirkulieren im Gegensatz zu peripheren DCs nicht in die Lymphknoten, wobei Faktoren dieser Geweberesidenz weitgehend unbekannt sind. uDCs sind phänotypisch unreif und weisen somit eine (niedrige) CD86⁺- und CD83⁺-Expression auf, und *ex vivo* uDCs führen nach LPS-Aktivierung zu einer geringeren IL-12-Produktion im Vergleich zu peripheren DCs (Gardner and Moffett, 2003, Kammerer, *et al.*, 2003, Kammerer, *et al.*, 2000, Miyazaki, *et al.*, 2003). uDCs in der Plazenta zeigten in Studien bereits einen ähnlichen Phänotyp wie die mit Chorionkarzinom-Zelllinien-konditionierten DCs. So exprimierten uDCs Reifungsmarker wie CD83⁺, CD40⁺ und HLA-DR⁺ (Kammerer, *et al.*, 2000), aber induzierten trotzdem einen Th2-Status (Miyazaki, *et al.*, 2003). Jedoch konnte gezeigt werden, dass uDCs für die Plazentaentwicklung wichtig sind, da sie vermutlich eine Rolle in der Immuntoleranz der Plazenta spielen (Bartmann, *et al.*, 2014, Laskarin, *et al.*, 2007, Miyazaki, *et al.*, 2003, Plaks, *et al.*, 2008).

Zusammenfassend wirken die HERV-Hüllproteine modulierend auf DCs und hemmen die Bildung einer stimulierenden IS (Abb. 7.1 A), indem sie die Rekrutierung von T-Zellen in stabile DC/T-Zell-Konjugate vermindern (Abb. 7.1 B). Dadurch wird die allostimulatorische Aktivität von DCs, die allogene T-Zell-Proliferation zu stimulieren, gestört (Abb. 7.1 B). Darüber hinaus üben die Chorionkarzinom-Zelllinien weitere modulierende Effekte auf DCs aus, welche vermutlich nicht durch HERV-Hüllproteine induziert werden, wie z.B. die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 und die Hemmung von pro-inflammatorischem IL-12 und TNF- α (Abb. 7.1 C). Ob die Modulation der DCs durch die HERV-Hüllproteine und die damit verbundene gestörte T-Zell-Stimulation zu einer Immuntoleranz in der Plazenta

führt und dies essentiell in dem Schutz des semi-allogenen Fetus ist, müsste mit weiteren Experimenten bestätigt werden. Jedoch ist es denkbar, dass die durch HERV-Hüllproteine modulierten DCs weitere suppressive Funktionen haben. So wird vermutet, dass NK-Zellen ebenfalls durch DCs in der Plazenta gehemmt werden und dies eine zusätzliche Immuntoleranz in einer gesunden Schwangerschaft hervorruft. Ebenfalls wurde eine 100-fache Expansion von Tregs durch fetale Antigene in der Maus gezeigt (Rowe, *et al.*, 2012). Ein direkter Zell-Zell-Kontakt von Trophoblasten mit Tregs und Makrophagen konnte als Ursache für einen suppressiven Phänotyp dieser Zellen gezeigt werden (Svensson-Arvelund, *et al.*, 2015). So wurde nach Ko-Kultur mit Trophoblasten eine erhöhte anti-inflammatorische IL-10-Zytokinproduktion und eine reduzierte pro-inflammatorische IL-12-Produktion von suppressiven M2-Makrophagen, sowie eine erhöhte IL-10-Produktion und keine pro-inflammatorische IFN- γ -Zytokinproduktion von Tregs induziert (Svensson-Arvelund, *et al.*, 2015).

Ein interessanter Ansatz wäre es, den Einfluss der HERV-Hüllprotein-modulierten DCs auf weitere Immunzellen wie Tregs und NK-Zellen oder auch den direkten Einfluss von HERV-Hüllproteinen auf Makrophagen zu analysieren.



B

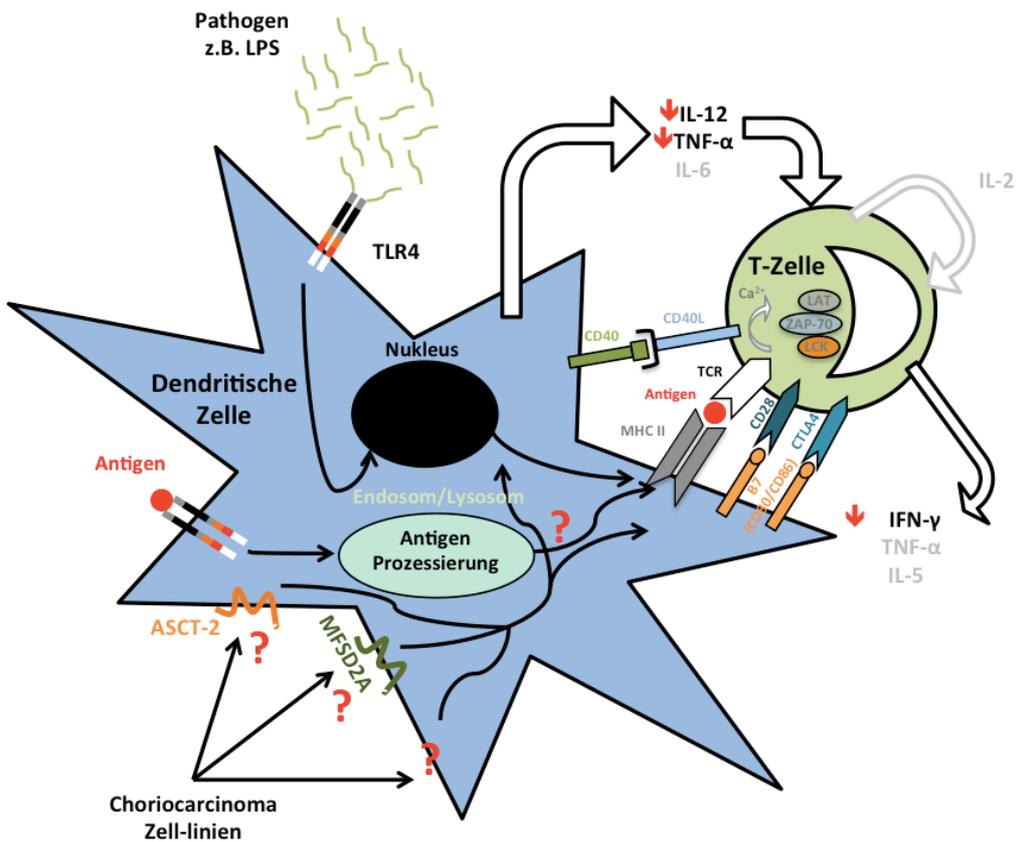
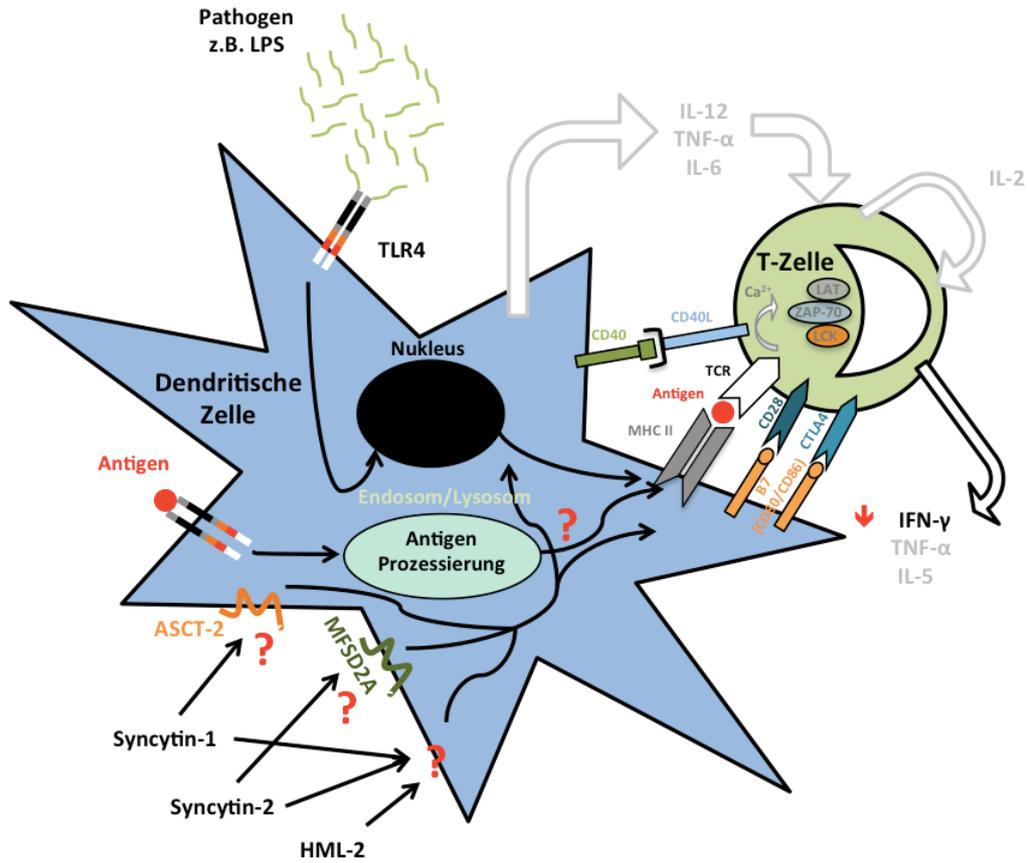


Abbildung 7.1: Schematische Modelle von allostimulatorischen DCs oder HERV-Hüllproteinen- bzw. durch Chorionkarzinom-Zelllinien-modulierte DCs auf die allogene T-Zell-Aktivierung.

Übersicht der DC/T-Zell-Konjugatbildung. Es sind DC/T-Zell-Bindungen in der mDC-Kontroll-immunologischen Synapse dargestellt (A) und der immunologischen Synapse, die durch HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen moduliert wurden (B) bzw. durch die Chorionkarzinom-Zelllinien (C). Die Antigenpräsentation erfolgt über MHC-II und die Bindung des TZR sowie anderer ko-stimulatorischer Moleküle. Die DC wird durch die Bindung von Pathogenen (z.B. LPS) an TLR4 an der Zellmembran aktiviert. Die ko-stimulatorischen Moleküle sind $CD80^+/CD86^+$ bzw. $CD40^+$ auf der DC, die an $CD28^+$ oder $CTLA-4^+$ bzw. $CD40L^+$ der T-Zellen binden. Dabei werden ebenfalls T-Zell-stimulierende Zytokine wie z.B. IL-6, IL-12 und TNF- α von der DC sezerniert. Zielmoleküle in der T-Zelle wie *LAT*, *ZAP-70* und *Lck* werden durch TZR-Aktivierung phosphoryliert und führen zur T-Zell-Aktivierung, welche durch IL-2, IL-5, IFN- γ und TNF- α Zytokinproduktion gekennzeichnet ist (modifiziert nach (Huppa and Davis, 2003))

Da die Rezeptoren für Syncytin-1 und -2 (ASCT-1, -2 und MFSD2A) auf der Oberfläche von DCs exprimiert werden (Abb. 4.1), könnten diese als Bindungsrezeptoren für eine HERV-Hüllprotein-abhängige Immunmodulation fungieren. Die Expression von den Rezeptoren konnte in der Plazenta gezeigt werden, jedoch wurde bislang keine Expression auf uDCs untersucht. Die Funktion dieser Rezeptoren, welche Na^{2+} -abhängige Transporter für neutrale Aminosäuren (Cheynet, *et al.*, 2006) oder Kohlenhydrate (Esnault, *et al.*, 2008) sind, wurde vielmehr für den Tumor-Metabolismus gezeigt (Fuchs and Bode, 2005, Fuchs, *et al.*, 2004). So ist eine Herunterregulierung dieser Rezeptoren vermutlich ursächlich für den Zelltod von Tumorzellen, jedoch ist bislang kein Einfluss dieser Rezeptoren auf die immunologischen Eigenschaften von DCs oder T-Zellen gezeigt worden (Blond, *et al.*, 2000, Esnault, *et al.*, 2008, Fuchs and Bode, 2005, Green, *et al.*, 2004, Hayward, *et al.*, 2007, Lee, *et al.*, 2001). Daher ist es auch möglich und sogar wahrscheinlich, dass andere Rezeptoren zusätzlich neben ASCT-1, -2 und MFSD2A für den modulatorischen Effekt der HERV-Hüllproteine verantwortlich sind (Hummel, *et al.*, 2015). Darüber hinaus ist die Rezeptor-bindende Domäne (RBD) von Syncytin-1 nicht innerhalb der immunsuppressiven Domäne (ISD) (Cheynet, *et al.*, 2006) und für Syncytin-2 gibt es ebenfalls keine Beweise für eine direkte Bindung der Fusionsrezeptoren mit der ISD (Esnault, *et al.*, 2008). Ebenfalls kann die fusogene Eigenschaft der HERV-Hüllproteine von ihrer immunsuppressiven Eigenschaft getrennt werden, was einen Einfluss von anderen Rezeptoren sehr wahrscheinlich macht (Mangenev, *et al.*, 2007). Möglicherweise ist aber auch eine Bindung von den HERV-Hüllproteinen an ihren jeweiligen Rezeptor nötig, um eine Stabilität oder strukturelle Änderung zu induzieren, welche es ermöglicht, an ihre unbekannt immunmodulierenden Rezeptoren mit einer geringeren Affinität binden zu können (Hummel, *et al.*, 2015). So wurde für die durch Masern-Virus hervorgerufene Immunsuppression eine nötige Bindung des F/H-Komplex gezeigt, aber nicht für das Rezeptor-bindende H-Protein alleine (Schneider-

Schaulies and Schneider-Schaulies, 2008). Ob die Rezeptoren, die für einen HERV-Hüllprotein-vermittelten Einfluss auf DCs und T-Zellen dieselben sind, bleibt ungeklärt. Darüber hinaus ist weder ein fusogener noch ein immunregulatorischer Rezeptor für HML-2 bekannt.

Zusammenfassend hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass die HERV-Hüllproteine Syncytin-1, -2 und HML-2 DCs in ihrer Funktion, T-Zellen zu stimulieren, modulieren. Die als Trophoblasten-Modell parallel untersuchten Chorionkarzinom-Zelllinien erwiesen sich hinsichtlich der Hemmung der PMA/Ionomycin-stimulierten T-Zell-Proliferation, sowie der suppressiven DC-Zytokinproduktion als modulatorisch für T-Zellen und DCs, sodass andere Moleküle neben den HERV-Hüllproteinen an der Modulation der T-Zell-Aktivierung in der Plazenta beteiligt sind.

6. Zusammenfassung

Das humane Genom besteht zu ungefähr 8 % aus humanen endogenen Retroviren (HERVs), jedoch sind viele aufgrund von Mutationen oder Deletionen nicht mehr funktionell. Trotzdem wurden funktionelle HERV-Proteine gefunden, welche offene Leserahmen (ORFs) besitzen und für funktionelle Hüll-Glykoproteine wie z.B. Syncytin-1, Syncytin-2 und HML-2 kodieren. Diese HERV-Hüllproteine beinhalten eine suppressive Domäne (SU) und induzieren möglicherweise eine Immunsuppression diverser Immunzellen während einer gesunden Schwangerschaft.

In dieser Arbeit wurden spezifisch die modulatorischen Eigenschaften verschiedener HERV-Hüllproteine (Syncytin-1, -2 und HML-2) auf Immunzellen untersucht.

Wir konnten zeigen, dass die HERV-Bindungsrezeptoren ASCT-1, -2 und MFSD2A auf der Oberfläche von T-Zellen und DCs exprimiert werden. Für funktionelle Experimente wurden HERV-Hüllproteine transgen in CHO-Zellen exprimiert, die als Effektorzellen in Ko-Kultur-Systemen verwendet wurden. Es konnte keine Hemmung der PMA/Ionomycin-stimulierten T-Zell-Proliferation durch die Effektorzellen gefunden werden. Darüber hinaus beeinträchtigten die Effektorzellen nicht die Expression von Reifungsmarkern auf DCs nach LPS-Aktivierung, induzierten jedoch die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α . Dagegen inhibierten die konstitutiv HERV-Hüllprotein-exprimierenden Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG die PMA/Ionomycin-stimulierte T-Zell-Proliferation sehr effektiv. Die Chorionkarzinom-Zelllinien hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die phänotypische LPS-DC-Reifung, modulierten aber die LPS-DC-Zytokin-Antwort sehr effektiv zu einem suppressiven Profil durch eine Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α sowie einen Anstieg von anti-inflammatorischem IL-10. BeWo- und JEG-Zellen, aber auch HERV-Hüllprotein-exprimierende Effektorzellen verändern die durch LPS-DC-stimulierte allogene T-Zell-Proliferation. Dies war mit einer verringerten Bildung von DC/T-Zell-Konjugaten sowie mit einer Hemmung der IFN- γ -Sekretion und der Ca²⁺-Mobilisation dieser T-Zellen assoziiert. Des Weiteren wurden eine reduzierte p-Tyrosin-Akkumulation und kein Ausschluss des F-Aktin-Signals in der immunologischen Synapse, der Kontaktstelle dieser DC/T-Zell-Konjugate, gefunden.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass HERV-Hüllproteine die T-Zell-Proliferation nicht direkt beeinflussen, sich aber modulierend auf DCs auswirken und dadurch mit deren allogene T-Zell-Proliferation interferieren.

7. Summary

Human endogenous retroviruses (HERVs) comprise about 8 % of the human genome but many are not functional due to mutations or deletions. However, some HERVs have been reported to harbor open reading frames (ORFs) and are coding for functional envelope (env) glycoproteins (Syncytin-1, Syncytin-2 and HML-2). These HERV env glycoproteins have suppressive domains (SU) and may modulate immune cells especially in the placenta where they are highly expressed.

In this work, we investigated the ability of different HERV envs (Syncytin-1, -2 and HML-2) to modulate immune cell function.

We showed that HERV binding receptors ASCT-1, -2 and MFSD2A are expressed by T-cells and DCs. For functional analysis, HERV envs were transiently expressed in CHO-cells which were then used as effector cells for co-culture assays. We demonstrated that HERV env expressing CHO effector cells did not significantly inhibit PMA/Ionomycin stimulated T-cell proliferation, and did not prevent phenotypic maturation of DCs in response to LPS. However, they did strongly augment the release of the pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF- α from LPS-DCs. In contrast, BeWo and JEG choriocarcinoma cell-lines constitutively expressing HERV env proteins reduced the T-cell proliferation very effectively. These cell-lines did not prevent phenotypic maturation of LPS-DCs, but shifted their cytokine response towards an immune suppressive profile by inhibiting the pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF- α and enhancing the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The choriocarcinoma cell-lines and CHO effector cells inhibited the LPS-DC induced allogenic T-cell-proliferation. This was associated with a loss of DC/T-cell conjugate frequency as well as with an impairment of IFN- γ release and Ca²⁺ mobilization in T-cells. In addition, we observed an aberrant pattern of p-tyrosine and F-actin signal in the interface of these DC/T-cell conjugates.

Altogether, these findings suggest that HERV proteins do not target T-cell activation directly, but modulate the DCs' ability to promote T-cell expansion.

8. Literaturverzeichnis

Al-Jameil N., Aziz Khan F., Fareed Khan M., Tabassum H. A brief overview of preeclampsia. *Journal of clinical medicine research*. 2014;6(1):1-7.

Ban Y., Chang Y., Dong B., Kong B., Qu X. Indoleamine 2,3-dioxygenase levels at the normal and recurrent spontaneous abortion fetal-maternal interface. *The Journal of international medical research*. 2013;41(4):1135-49.

Bartmann C., Segerer S. E., Rieger L., Kapp M., Sutterlin M., Kammerer U. Quantification of the predominant immune cell populations in decidua throughout human pregnancy. *American journal of reproductive immunology*. 2014;71(2):109-19.

Beer A. E., Quebbeman J. F. Immunological mechanisms of survival and "rejection" of the fetal allograft. *Mead Johnson Symposium on Perinatal and Developmental Medicine*. 1986(24):20-6.

Benit L., Lallemand J. B., Casella J. F., Philippe H., Heidmann T. ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *Journal of virology*. 1999;73(4):3301-8.

Bennett W. A., Lagoo-Deenadayalan S., Whitworth N. S., Brackin M. N., Hale E., Cowan B. D. Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. *Early pregnancy : biology and medicine : the official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy*. 1997;3(3):190-8.

Biggs M. J., Milone M. C., Santos L. C., Gondarenko A., Wind S. J. High-resolution imaging of the immunological synapse and T-cell receptor microclustering through microfabricated substrates. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2011;8(63):1462-71.

Bischof P., Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(1):1-16.

Bjercke S., Bertheussen K., Maltau J. M. Increased relative frequency of suppressor monocytes in peripheral blood in early pregnancy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1989;97(2):125-30.

Blaise S., de Parseval N., Benit L., Heidmann T. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):13013-8.

Blaise S., Ruggieri A., Dewannieux M., Cosset F. L., Heidmann T. Identification of an envelope protein from the FRD family of human endogenous retroviruses (HERV-FRD) conferring infectivity and functional conservation among simians. *Journal of virology*. 2004;78(2):1050-4.

Blomberg J., Benachenhou F., Blikstad V., Sperber G., Mayer J. Classification and nomenclature of endogenous retroviral sequences (ERVs): problems and recommendations. *Gene*. 2009;448(2):115-23.

Blond J. L., Beseme F., Duret L., Bouton O., Bedin F., Perron H., et al. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *Journal of virology*. 1999;73(2):1175-85.

Blond J. L., Lavillette D., Cheynet V., Bouton O., Oriol G., Chapel-Fernandes S., 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. *Journal of virology*. 2000;74(7):3321-9.

Bock M., Stoye J. P. Endogenous retroviruses and the human germline. *Current opinion in genetics & development*. 2000;10(6):651-5.

Boeke J. D., Stoye J. P. Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY)1997.

Boller K., Schonfeld K., Lischer S., Fischer N., Hoffmann A., Kurth R., et al. Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 2):567-72.

Bromley S. K., Iaboni A., Davis S. J., Whitty A., Green J. M., Shaw A. S., et al. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nature immunology*. 2001;2(12):1159-66.

Burt D., Johnston D., Rinke de Wit T., Van den Elsen P., Stern P. L. Cellular immune recognition of HLA-G-expressing choriocarcinoma cell line Jeg-3. *International journal of cancer Supplement = Journal international du cancer Supplement*. 1991;6:117-22.

Cappelletti M., Giannelli S., Martinelli A., Cetin I., Colombo E., Calcaterra F., et al. Lack of activation of peripheral blood dendritic cells in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2013;34(1):35-41.

Chang M., Mukherjea D., Gobble R. M., Groesch K. A., Torry R. J., Torry D. S. Glial cell missing 1 regulates placental growth factor (PGF) gene transcription in human trophoblast. *Biology of reproduction*. 2008;78(5):841-51.

Chaouat G., Zourbas S., Ostojic S., Lappree-Delage G., Dubanchet S., Ledee N., et al. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Journal of reproductive immunology*. 2002;53(1-2):241-56.

Chatterjee P., Chiasson V. L., Bounds K. R., Mitchell B. M. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Frontiers in immunology*. 2014;5:253.

Chen C. P., Chen L. F., Yang S. R., Chen C. Y., Ko C. C., Chang G. D., et al. Functional characterization of the human placental fusogenic membrane protein syncytin 2. *Biology of reproduction*. 2008;79(5):815-23.

Chen C. P., Wang K. G., Chen C. Y., Yu C., Chuang H. C., Chen H. Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre-eclampsia. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2006;113(2):152-8.

Cheyne V., Oriol G., Mallet F. Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-1 fusogenic glycoprotein. *Retrovirology*. 2006;3:41.

Choi S., Schwartz R. H. Impairment of immunological synapse formation in adaptively tolerant T cells. *Journal of immunology*. 2011;187(2):805-16.

Coffin J. M. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *The Journal of general virology*. 1979;42(1):1-26.

Collins M. K., Tay C. S., Erlebacher A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(7):2062-73.

Cornelis G., Heidmann O., Bernard-Stoecklin S., Reynaud K., Veron G., Mulot B., et al. Ancestral capture of syncytin-Car1, a fusogenic endogenous retroviral envelope gene involved in placentation and conserved in Carnivora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(7):E432-41.

Darmochwal-Kolarz D., Rolinski J., Tabarkiewicz J., Leszczynska-Gorzela B., Buczkowski J., Wojas K., et al. Myeloid and lymphoid dendritic cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clinical and experimental immunology*. 2003;132(2):339-44.

de Parseval N., Heidmann T. Physiological knockout of the envelope gene of the single-copy ERV-3 human endogenous retrovirus in a fraction of the Caucasian population. *Journal of virology*. 1998;72(4):3442-5.

de Parseval N., Lazar V., Casella J. F., Benit L., Heidmann T. Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *Journal of virology*. 2003;77(19):10414-22.

Du M. R., Guo P. F., Piao H. L., Wang S. C., Sun C., Jin L. P., et al. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. *Journal of immunology*. 2014;192(4):1502-11.

Dupressoir A., Lavialle C., Heidmann T. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta*. 2012;33(9):663-71.

Dupressoir A., Marceau G., Vernochet C., Benit L., Kanellopoulos C., Sapin V., et al. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(3):725-30.

Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(1):23-33.

Esnault C., Priet S., Ribet D., Vernochet C., Bruls T., Lavielle C., et al. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(45):17532-7.

Evans B. J., McDowall A., Taylor P. C., Hogg N., Haskard D. O., Landis R. C. Shedding of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in a human inflammatory response. *Blood*. 2006;107(9):3593-9.

Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(9):690-702.

Fooksman D. R., Vardhana S., Vasiliver-Shamis G., Liese J., Blair D. A., Waite J., et al. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual review of immunology*. 2010;28:79-105.

Friedl P., den Boer A. T., Gunzer M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(7):532-45.

Fuchs B. C., Bode B. P. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Seminars in cancer biology*. 2005;15(4):254-66.

Fuchs B. C., Perez J. C., Suetterlin J. E., Chaudhry S. B., Bode B. P. Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2 elicits apoptosis in human hepatoma cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;286(3):G467-78.

Fukui A., Kwak-Kim J., Ntrivalas E., Gilman-Sachs A., Lee S. K., Beaman K. Intracellular cytokine expression of peripheral blood natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions and implantation failures. *Fertility and sterility*. 2008;89(1):157-65.

Gardner L., Moffett A. Dendritic cells in the human decidua. *Biology of reproduction*. 2003;69(4):1438-46.

Gifford R., Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus genes*. 2003;26(3):291-315.

Gimenez J., Montgiraud C., Oriol G., Pichon J. P., Ruel K., Tsatsaris V., et al. Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2009;16(4):195-211.

Grasso E., Papparini D., Hauk V., Salamone G., Leiros C. P., Ramhorst R. Differential migration and activation profile of monocytes after trophoblast interaction. *PloS one*. 2014;9(5):e97147.

Green B. J., Lee C. S., Rasko J. E. Biodistribution of the RD114/mammalian type D retrovirus receptor, RDR. *The journal of gene medicine*. 2004;6(3):249-59.

Gude N. M., Roberts C. T., Kalionis B., King R. G. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research*. 2004;114(5-6):397-407.

Gunzer M., Schafer A., Borgmann S., Grabbe S., Zanker K. S., Brocker E. B., et al. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*. 2000;13(3):323-32.

Guo P. F., Du M. R., Wu H. X., Lin Y., Jin L. P., Li D. J. Thymic stromal lymphopoietin from trophoblasts induces dendritic cell-mediated regulatory TH2 bias in the decidua during early gestation in humans. *Blood*. 2010;116(12):2061-9.

Harris J. R. Placental endogenous retrovirus (ERV): structural, functional, and evolutionary significance. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1998;20(4):307-16.

Harris L. K. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta*. 2010;31 Suppl:S93-8.

Hayward M. D., Potgens A. J., Drewlo S., Kaufmann P., Rasko J. E. Distribution of human endogenous retrovirus type W receptor in normal human villous placenta. *Pathology*. 2007;39(4):406-12.

Hogberg U. The World Health Report 2005: "make every mother and child count" - including Africans. *Scandinavian journal of public health*. 2005;33(6):409-11.

Holder B. S., Tower C. L., Forbes K., Mulla M. J., Aplin J. D., Abrahams V. M. Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology*. 2012;136(2):184-91.

Huang G., Li Z., Wan X., Wang Y., Dong J. Human endogenous retroviral K element encodes fusogenic activity in melanoma cells. *Journal of carcinogenesis*. 2013;12:5.

Huang S. J., Chen C. P., Schatz F., Rahman M., Abrahams V. M., Lockwood C. J. Pre-eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. *The Journal of pathology*. 2008;214(3):328-36.

Hummel J., Kammerer U., Muller N., Avota E., Schneider-Schaulies S. Human endogenous retrovirus envelope proteins target dendritic cells to suppress T-cell activation. *European journal of immunology*. 2015.

Huppa J. B., Davis M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(12):973-83.

Johnson W. E., Coffin J. M. Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(18):10254-60.

Jurka J. Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends in genetics : TIG*. 2000;16(9):418-20.

Kalkunte S., Chichester C. O., Gotsch F., Sentman C. L., Romero R., Sharma S. Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. *American journal of reproductive immunology*. 2008;59(5):425-32.

Kammerer U., Eggert A. O., Kapp M., McLellan A. D., Geijtenbeek T. B., Dietl J., et al. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *The American journal of pathology*. 2003;162(3):887-96.

Kammerer U., Germeyer A., Stengel S., Kapp M., Denner J. Human endogenous retrovirus K (HERV-K) is expressed in villous and extravillous cytotrophoblast cells of the human placenta. *Journal of reproductive immunology*. 2011;91(1-2):1-8.

Kammerer U., Schoppet M., McLellan A. D., Kapp M., Huppertz H. I., Kampgen E., et al. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *The American journal of pathology*. 2000;157(1):159-69.

Kassiotis G. Endogenous retroviruses and the development of cancer. *Journal of immunology*. 2014;192(4):1343-9.

Kato N., Pfeifer-Ohlsson S., Kato M., Larsson E., Rydnert J., Ohlsson R., et al. Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences. *Journal of virology*. 1987;61(7):2182-91.

King A., Balendran N., Wooding P., Carter N. P., Loke Y. W. CD3- leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56++ population. *Developmental immunology*. 1991;1(3):169-90.

King A. E., Critchley H. O., Kelly R. W. Presence of secretory leukocyte protease inhibitor in human endometrium and first trimester decidua suggests an antibacterial protective role. *Molecular human reproduction*. 2000;6(2):191-6.

Knerr I., Huppertz B., Weigel C., Dotsch J., Wich C., Schild R. L., et al. Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis. *Molecular human reproduction*. 2004;10(8):581-8.

Komine-Aizawa S., Majima H., Yoshida-Noro C., Hayakawa S. Stimuli through Toll-like receptor (TLR) 3 and 9 affect human chorionic gonadotropin (hCG) production in a choriocarcinoma cell line. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2008;34(2):144-51.

Kshirsagar S. K., Alam S. M., Jasti S., Hodes H., Nauser T., Gilliam M., et al. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta*. 2012;33(12):982-90.

Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.

Larsson E., Andersson G. Beneficial role of human endogenous retroviruses: facts and hypotheses. *Scandinavian journal of immunology*. 1998;48(4):329-38.

Larsson E., Kato N., Cohen M. Human endogenous proviruses. *Current topics in microbiology and immunology*. 1989;148:115-32.

Laskarin G., Kammerer U., Rukavina D., Thomson A. W., Fernandez N., Blois S. M. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *American journal of reproductive immunology*. 2007;58(3):255-67.

Lavie L., Kitova M., Maldener E., Meese E., Mayer J. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *Journal of virology*. 2005;79(2):876-83.

Lavillette D., Marin M., Ruggieri A., Mallet F., Cosset F. L., Kabat D. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *Journal of virology*. 2002;76(13):6442-52.

Lee X., Keith J. C., Jr., Stumm N., Moutsatsos I., McCoy J. M., Crum C. P., et al. Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta*. 2001;22(10):808-12.

Liang C. Y., Wang L. J., Chen C. P., Chen L. F., Chen Y. H., Chen H. GCM1 regulation of the expression of syncytin 2 and its cognate receptor MFSD2A in human placenta. *Biology of reproduction*. 2010;83(3):387-95.

Lokossou A. G., Toudic C., Barbeau B. Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions. *Viruses*. 2014;6(11):4609-27.

Malassine A., Handschuh K., Tsatsaris V., Gerbaud P., Cheynet V., Oriol G., et al. Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta*. 2005;26(7):556-62.

Mangeney M., de Parseval N., Thomas G., Heidmann T. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 10):2515-8.

Mangeney M., Renard M., Schlecht-Louf G., Bouallaga I., Heidmann O., Letzelter C., et al. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(51):20534-9.

Marin M., Lavillette D., Kelly S. M., Kabat D. N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions. *Journal of virology*. 2003;77(5):2936-45.

Martin J., Herniou E., Cook J., Waugh O'Neill R., Tristem M. Human endogenous retrovirus type I-related viruses have an apparently widespread distribution within vertebrates. *Journal of virology*. 1997;71(1):437-43.

Maruyama T., Makino T., Sugi T., Matsubayashi H., Ozawa N., Nozawa S. Flow-cytometric analysis of immune cell populations in human decidua from various types of first-trimester pregnancy. *Human immunology*. 1992;34(3):212-8.

Matouskova M., Blazkova J., Pajer P., Pavlicek A., Hejnar J. CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. *Experimental cell research*. 2006;312(7):1011-20.

Medstrand P., Blomberg J. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *Journal of virology*. 1993;67(11):6778-87.

Medstrand P., Mager D. L. Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *Journal of virology*. 1998;72(12):9782-7.

Mi S., Lee X., Li X., Veldman G. M., Finnerty H., Racie L., et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 2000;403(6771):785-9.

Miller M. J., Safrina O., Parker I., Cahalan M. D. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(7):847-56.

Mincheva-Nilsson L., Nagaeva O., Chen T., Stendahl U., Antsiferova J., Mogren I., et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *Journal of immunology*. 2006;176(6):3585-92.

Miyazaki S., Tsuda H., Sakai M., Hori S., Sasaki Y., Futatani T., et al. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(4):514-22.

Mjosberg J., Berg G., Jenmalm M. C., Ernerudh J. FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biology of reproduction*. 2010;82(4):698-705.

Monks C. R., Freiberg B. A., Kupfer H., Sciaky N., Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998;395(6697):82-6.

Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1127:121-8.

Mor G., Cardenas I., Abrahams V., Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1221:80-7.

Morozov V. A., Dao Thi V. L., Denner J. The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. *PLoS one*. 2013;8(8):e70399.

Muir A., Lever A. M., Moffett A. Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 7):2067-71.

Oh-hora M., Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Current opinion in immunology*. 2008;20(3):250-8.

Ohshima K., Nakashima M., Sonoda K., Kikuchi M., Watanabe T. Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. *Clinical and experimental immunology*. 2001;123(3):481-6.

Panda B., Panda A., Ueda I., Abrahams V. M., Norwitz E. R., Stanic A. K., et al. Dendritic cells in the circulation of women with preeclampsia demonstrate a pro-inflammatory bias secondary to dysregulation of TLR receptors. *Journal of reproductive immunology*. 2012;94(2):210-5.

Pedroza-Pacheco I., Madrigal A., Saudemont A. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cellular & molecular immunology*. 2013;10(3):222-9.

Perron H., Garson J. A., Bedin F., Beseme F., Paranhos-Baccala G., Komurian-Pradel F., et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(14):7583-8.

Piccinni M. P., Beloni L., Livi C., Maggi E., Scarselli G., Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature medicine*. 1998;4(9):1020-4.

Plaks V., Birnberg T., Berkutski T., Sela S., BenYashar A., Kalchenko V., et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):3954-65.

Record M. Intercellular communication by exosomes in placenta: a possible role in cell fusion? *Placenta*. 2014;35(5):297-302.

Rieger L., Honig A., Sutterlin M., Kapp M., Dietl J., Ruck P., et al. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2004;11(7):488-93.

Risk J. M., Johnson P. M. Northern blot analysis of HLA-G expression by BeWo human choriocarcinoma cells. *Journal of reproductive immunology*. 1990;18(2):199-203.

Rolland A., Jouvin-Marche E., Viret C., Faure M., Perron H., Marche P. N. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *Journal of immunology*. 2006;176(12):7636-44.

Rowe J. H., Ertelt J. M., Xin L., Way S. S. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*. 2012;490(7418):102-6.

Ruebner M., Strissel P. L., Ekici A. B., Stiegler E., Dammer U., Goecke T. W., et al. Reduced syncytin-1 expression levels in placental syndromes correlates with epigenetic hypermethylation of the ERVW-1 promoter region. *PloS one*. 2013;8(2):e56145.

Salamone G., Fraccaroli L., Gori S., Grasso E., Papparini D., Geffner J., et al. Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells. *Human reproduction*. 2012;27(9):2598-606.

Sastry B. V. Placental toxicology: tobacco smoke, abused drugs, multiple chemical interactions, and placental function. *Reproduction, fertility, and development*. 1991;3(4):355-72.

Schiavetti F., Thonnard J., Colau D., Boon T., Coulie P. G. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer research*. 2002;62(19):5510-6.

Schneider-Schaulies J., Schneider-Schaulies S. Receptor interactions, tropism, and mechanisms involved in morbillivirus-induced immunomodulation. *Advances in virus research*. 2008;71:173-205.

Schumacher A., Heinze K., Witte J., Poloski E., Linzke N., Woidacki K., et al. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *Journal of immunology*. 2013;190(6):2650-8.

Schwede S., Alfer J., von Rango U. Differences in regulatory T-cell and dendritic cell pattern in decidual tissue of placenta accreta/increta cases. *Placenta*. 2014;35(6):378-85.

Segerer S. E., Muller N., van den Brandt J., Kapp M., Dietl J., Reichardt H. M., et al. Impact of female sex hormones on the maturation and function of human dendritic cells. *American journal of reproductive immunology*. 2009;62(3):165-73.

Segerer S. E., Rieger L., Kapp M., Dombrowski Y., Muller N., Dietl J., et al. MIC-1 (a multifunctional modulator of dendritic cell phenotype and function) is produced by decidual stromal cells and trophoblasts. *Human reproduction*. 2012;27(1):200-9.

Shamri R., Grabovsky V., Gauguet J. M., Feigelson S., Manevich E., Kolanus W., et al. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nature immunology*. 2005;6(5):497-506.

Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., Jordan M. S. T cell activation. *Annual review of immunology*. 2009;27:591-619.

Srinivas S. K., Ma Y., Sammel M. D., Chou D., McGrath C., Parry S., et al. Placental inflammation and viral infection are implicated in second trimester pregnancy loss. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;195(3):797-802.

Starkey P. M., Sargent I. L., Redman C. W. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology*. 1988;65(1):129-34.

Steck T., Rieger L., Rodel E., Dietl J., Kammerer U. [Expression of the molecules HLA-G and HLA-E modulates cytokine production of monocyte generated dendritic cells]. *Zentralblatt für Gynäkologie*. 2002;124(5):304-9.

Svensson-Arvelund J., Mehta R. B., Lindau R., Mirrasekhian E., Rodriguez-Martinez H., Berg G., et al. The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. *Journal of immunology*. 2015;194(4):1534-44.

Szekeres-Bartho J., Wegmann T. G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Journal of reproductive immunology*. 1996;31(1-2):81-95.

Tangeras L. H., Stodle G. S., Olsen G. D., Leknes A. H., Gundersen A. S., Skei B., et al. Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. *Journal of reproductive immunology*. 2014.

Tolosa J. M., Schjenken J. E., Clifton V. L., Vargas A., Barbeau B., Lowry P., et al. The endogenous retroviral envelope protein syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes. *Placenta*. 2012;33(11):933-41.

Toufaily C., Vargas A., Lemire M., Lafond J., Rassart E., Barbeau B. MFSD2a, the Syncytin-2 receptor, is important for trophoblast fusion. *Placenta*. 2013;34(1):85-8.

Trundley A., Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue antigens*. 2004;63(1):1-12.

Tsuji H., Kawaguchi S., Wada T., Nagoya S., Inobe M., Yagita H., et al. Concurrent induction of T-cell activation and apoptosis of osteosarcoma cells by adenovirus-mediated B7-1/Fas chimeric gene transfer. *Cancer gene therapy*. 2003;10(9):717-25.

van der Kuyl A. C. HIV infection and HERV expression: a review. *Retrovirology*. 2012;9:6.

Vargas A., Moreau J., Landry S., LeBellego F., Toufaily C., Rassart E., et al. Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *Journal of molecular biology*. 2009;392(2):301-18.

Vargas A., Toufaily C., LeBellego F., Rassart E., Lafond J., Barbeau B. Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. *Reproductive sciences*. 2011;18(11):1085-91.

Vargas A., Zhou S., Ethier-Chiasson M., Flipo D., Lafond J., Gilbert C., et al. Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(8):3703-19.

Vasquez A. M., Segura C., Blair S. Induction of pro-inflammatory response of the placental trophoblast by Plasmodium falciparum infected erythrocytes and TNF. *Malaria journal*. 2013;12:421.

Vernochet C., Heidmann O., Dupressoir A., Cornelis G., Dessen P., Catzeflis F., et al. A syncytin-like endogenous retrovirus envelope gene of the guinea pig specifically expressed in the placenta junctional zone and conserved in Caviomorpha. *Placenta*. 2011;32(11):885-92.

Villesen P., Aagaard L., Wiuf C., Pedersen F. S. Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology*. 2004;1:32.

Wan H., Versnel M. A., Leijten L. M., van Helden-Meeuwssen C. G., Fekkes D., Leenen P. J., et al. Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83(4):894-901.

Wang L. J., Cheong M. L., Lee Y. S., Lee M. T., Chen H. High-temperature requirement protein A4 (HtrA4) suppresses the fusogenic activity of syncytin-1 and promotes trophoblast invasion. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(18):3707-17.

Wegmann T. G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today*. 1993;14(7):353-6.

Wice B., Menton D., Geuze H., Schwartz A. L. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Experimental cell research*. 1990;186(2):306-16.

Yang J. C., Perry-Lalley D. The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *Journal of immunotherapy*. 2000;23(2):177-83.

York D. F., Vigne R., Verwoerd D. W., Querat G. Nucleotide sequence of the jaagsiekte retrovirus, an exogenous and endogenous type D and B retrovirus of sheep and goats. *Journal of virology*. 1992;66(8):4930-9.

Yu G., Sun Y., Foerster K., Manuel J., Molina H., Levy G. A., et al. LPS-induced murine abortions require C5 but not C3, and are prevented by upregulating expression of the CD200 tolerance signaling molecule. *American journal of reproductive immunology*. 2008;60(2):135-40.

9. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
APC	Antigen-präsentierende Zellen (engl. <i>antigen presenting cell</i>)
As	engl. <i>antisense</i>
ASCT-1	siehe SLC1A4
ASCT-2	siehe SLC1A5
ATV	Versen (engl. <i>adjusted trypsin versene</i>)
BD	Becton Dickinson (Firma)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium (engl. <i>calcium</i>)
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CDS	engl. <i>coding sequence</i>
CFSE	engl. <i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (engl. <i>carbon dioxide</i>)
cpm	engl. <i>counts per minute</i>
CRAC	engl. <i>calcium releasing-activated channel</i>
CT	Cytotrophoblasten
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCs	dendritische Zellen (engl. <i>dendritic cells</i>)
DMEM	engl. <i>dulbecco's modified eagle's media</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dt	Desoxythymidin
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
env	Hüllprotein (engl. <i>envelope</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	engl. <i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ERV	endogene Retroviren

EVT	extravillöse Cytotrophoblasten
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
F-Aktin	Aktinfilamente
FCN	ficolin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FK	Forskolin
FKS	fetales Kälberserum
FSC	engl. <i>forward scatter</i>
fw	engl. <i>forward</i>
GCM-1	engl. <i>glia cell missing factor-1</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp	Glykoproteine (engl. <i>glycoprotein</i>)
³ H	Tritium
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
hCG	Humanes Choriongonadotropin (engl. <i>human chorionic gonadotropin</i>)
HEK	menschliche embryonale Nierenepithelzellen (engl. <i>human embryonic kidney cells</i>)
HERV	Humane Endogene Retroviren (engl. <i>human endogenous retrovirus</i>)
HERV-FRD	HERV-Phenylalanin-Arginin-Asparaginsäure
HERV-K	HERV-Lysin
HERV-L	HERV-Leucin
HERV-S	HERV-Serin
HERV-W	HERV-Tryptophan
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HML	engl. <i>human MMTV-like Virus</i>
HtrA4	engl. <i>high-temperature requirement protein A4</i>
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül (engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>)
iDCs	unreife DCs (engl. <i>immature DCs</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon

Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IP3	Inositoltrisphosphat
IS	Immunologische Synapse
ISD	immunsuppressive Domäne (engl. <i>immunosuppressive domain</i>)
ITAM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
IUGR	intrauterine Wachstumsretardierung (engl. <i>intrauterine growth restriction</i>)
LAT	engl. <i>linker for activation of T-cells</i>
LCK	engl. <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	engl. <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	engl. <i>long terminal repeat</i>
M	Molar
mDCs	reife DCs (engl. <i>mature DCs</i>)
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MEM	engl. <i>minimum essential medium</i>
MFI	engl. <i>mean fluorescence intensity</i>
MFSD2A	engl. <i>major facilitator superfamily domain-containing protein 2</i>
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MIC-1	engl. <i>macrophage inhibitor cytokine-1</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	engl. <i>mixed lymphocyte reaction</i>
MLV	engl. <i>murine leukemia Virus</i>
MMTV	Maus-Mammatumovirus (engl. <i>mouse mammary tumor virus</i>)
moDCs	Monozyten generierte DCs (engl. <i>monocyte derived DCs</i>)
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
Na ²⁺	Natrium
NFAT	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Oligo	Oligonukleotid
ORF	engl. <i>open reading frames</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBLs	Periphere Blutlymphozyten
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PEI	Polyethylenimin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PMA	engl. <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
p-Tyr	Phosphotyrosine
RBD	Rezeptor-bindende Region (engl. <i>receptor binding domain</i>)
rev	engl. <i>reverse</i>
RT	raum Temperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure (eng. <i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	engl. <i>roswell park memorial institute medium</i>
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
sec	Sekunde (engl. <i>second</i>)
SEPP1	selenoprotein P plasma 1
SCL1A4	engl. <i>solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4</i>
SLC1A5	engl. <i>solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 5</i>
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SU	Oberflächeneinheit (engl. <i>surface unit</i>)
SSC	engl. <i>sideward scatter</i>
ST	Syncytiotrophoblasten
Th	Helfer T-Zellen
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i>

TM	transmembrane Region
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TREM	engl. <i>triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
tRNA	Transfer RNA
TSLP	engl. <i>thymic stromal lymphopietin</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
uDCs	uterine DCs
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
uNK	uterine NK-Zellen
UV	Ultraviolettstrahlung
VLP	Virus-ähnlicher Partikeln (engl. <i>virus-like particles</i>)
ZAP-70	engl. <i>zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
z.B.	zum Beispiel

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Retroelements viralen Ursprungs.	6
Abbildung 1.2: Phylogenetischer Baum der humanen Retroviren.	7
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Endogenisierung der HERVs.	8
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines HERV-Glykoproteins.	9
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der menschlichen Plazenta.	10
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Differenzierung von Cytotrophoblasten zu Syncytiotrophoblasten sowie extravillösen Trophoblasten.	13
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung einer immunologischen Synapse zwischen einer DC als APC und einer T-Zelle.	17
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pCG.	22
Abbildung 3.1: Charakterisierung von iDCs.	32
Abbildung 3.2: Charakterisierung von mDC.	32
Abbildung 3.3: Charakterisierung primärer T-Zellen und deren Subpopulationen nach Aufreinigung.	33
Abbildung 3.4: Exemplarische Darstellung der Messung der T-Zell-Proliferation.	39
Abbildung 3.5: Exemplarische Darstellung der iDC/T-Zell- und mDC/T-Zell-Konjugat-Analyse mittels Durchflusszytometrie.	42
Abbildung 4.1: mRNA-Expression der HERV-Rezeptoren ASCT-1, -2 und MFSD2A.	44
Abbildung 4.2: Proteinexpression der HERV-Rezeptoren ASCT-1, -2 und MFSD2A auf DCs und T-Zellen.	45
Abbildung 4.3: Oberflächenexpression der HERV-Hüllproteine Syncytin-1, -2 und HML-2 auf den Chorionkarzinom-Zelllinien BeWo und JEG.	46
Abbildung 4.4: mRNA-Expression von Syncytin-1, -2 und HML2 in der Chorionkarzinom-Zelllinie BeWo.	47
Abbildung 4.5: Syncytin-1-Expression in HEK-Zellen.	48
Abbildung 4.6: Expression von Syncytin-1 und -2 auf stabil-transfizierten CHO-Zellen.	49
Abbildung 4.7: Oberflächenexpression von Syncytin-1, -2 und HML-2 auf transient-transfizierten CHO-Zellen.	50
Abbildung 4.8: Fusion Syncytin-1-transfizierter CHO-Zellen mit ASCT-2-transfizierten CHO-Zellen.	51
Abbildung 4.9: Fusion von Syncytin-2-transfizierten Effektorzellen mit BeWo-Zellen.	52
Abbildung 4.10: T-Zell-Proliferation nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien mittels CFSE-Inkorporation.	54
Abbildung 4.11: T-Zell-Proliferation nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen mittels CFSE-Inkorporation.	55
Abbildung 4.12: T-Zell-Proliferation nach Ko-Kultur mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-ko-exprimierenden Effektorzellen mittels CFSE-Inkorporation.	56
Abbildung 4.13: Exemplarische Darstellung der CD86 ⁺ -Expression auf DCs nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien.	58
Abbildung 4.14: Oberflächenexpression von DC-Reifungsmarkern nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien.	59

Abbildung 4.15: CD86 ⁺ -Expression von unkonditionierten DCs oder DCs, die mit Leervektor-exprimierenden CHO-Zellen ko-kultiviert worden waren.	60
Abbildung 4.16: Exemplarische Darstellung der CD86 ⁺ -Expression auf DCs nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen.	61
Abbildung 4.17: Oberflächenexpression von DC-Reifungsmarkern nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-transfizierten Effektorzellen.	62
Abbildung 4.18: Zytokinproduktion von DCs nach Ko-Kultur mit Chorionkarzinom-Zelllinien.	63
Abbildung 4.19: Zytokinproduktion von DCs nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen.	64
Abbildung 4.20: IL-12-Produktion von DCs nach Ko-Kultur mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-ko-exprimierenden Effektorzellen.	65
Abbildung 4.21: Effekt von Chorionkarzinom-Zelllinien auf die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation.	67
Abbildung 4.22: Effekt von HERV-Hüllproteinen auf die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation.	68
Abbildung 4.23: Einfluss von HERV-Hüllproteinen auf die LPS-DC-induzierte IFN- γ -Produktion von allo genen T-Zellen.	69
Abbildung 4.24: Exemplarische Darstellung der Oberflächenexpression von HERV-Hüllproteinen auf BeWo-Zellen nach siRNA-Transfektion.	70
Abbildung 4.25: Einfluss von HERV-Hüllprotein-siRNA-transfizierten BeWo-Zellen auf die LPS-DC-induzierte allogene T-Zell-Proliferation.	71
Abbildung 4.26: Exemplarische Darstellung der DC/T-Zell-Konjugate mittels Durchflusszytometrie.	72
Abbildung 4.27: DC/T-Zell-Konjugatbildung nach Vorbehandlung der DCs mit Chorionkarzinom-Zelllinien.	72
Abbildung 4.28: DC/T-Zell-Konjugatbildung nach Vorbehandlung der DCs mit HERV-Hüllproteinen.	73
Abbildung 4.29: Exemplarische Darstellung der LFA-1- und ICAM-Expression mittels Durchflusszytometrie.	74
Abbildung 4.30: Ca ²⁺ -Mobilisierung in T-Zellen nach Kontaktierung mit allo genen DCs, welche mit Chorionkarzinom-Zelllinien oder HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen vorbehandelt worden waren.	76
Abbildung 4.31: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der immunologischen Synapse in den Kontrollen.	77
Abbildung 4.32: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der IS, die mit BeWo- und JEG-Zellen ko-kultiviert worden waren.	78
Abbildung 4.33: Schematische Darstellung der IS-Bildebene durch die 3D-Rekonstruktion.	79
Abbildung 4.34: 3D-Rekonstruktion der IS von DC/T-Zell-Konjugaten, die mit Chorionkarzinom-Zelllinien ko-kultiviert worden waren.	80
Abbildung 4.35: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der IS, die mit CHO-Kontrollkulturen ko-kultiviert worden waren.	81
Abbildung 4.36: Analyse der F-Aktin- und p-Tyrosin-Verteilung in der IS, die mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren.	82

Abbildung 4.37: 3D-Rekonstruktion der IS von DC/T-Zell-Konjugaten, die mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen ko-kultiviert worden waren.	83
Abbildung 4.38: Quantifizierung der DC/T-Zell-Konjugate.	84
Abbildung 7.1: Schematische Modelle von allostimulatorischen DCs oder HERV-Hüllproteinen- bzw. durch Chorionkarzinom-Zelllinien-modulierte DCs auf die allogene T-Zell-Aktivierung.	96

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht der am besten beschriebenen HERV-Hüllproteine mit deren Gen-Namen und (Fusions-) Rezeptoren.	14
Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien.	20
Tabelle 2.2: Verwendete primäre Zellen.	20
Tabelle 2.3: HERV-Hüllprotein-Plasmide.	21
Tabelle 2.4: Primer für die Isolation der CDS aus cDNA.	22
Tabelle 2.5: Primer für die Klonierung in den pCG-Vektor.	22
Tabelle 2.6: HERV-Hüllprotein-spezifische siRNA-Sequenzen.	23
Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Phusion-PCR Reaktion.	35
Tabelle 3.2: PCR-Reaktionsprogramm für den ThemorCycler.	35
Tabelle 3.3: Übersicht des verwendeten Restriktionsverdaus.	36
Tabelle 3.4: Übersicht über die Ligationsreaktion.	36
Tabelle 3.5: PCR-Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR.	37
Tabelle 3.6: PCR-Reaktionsprogramm für die Sequenzierungs-PCR.	37
Tabelle 4.1: α -CD3 ⁺ / α -CD28 ⁺ -Antikörper stimulierte T-Zell-Proliferation mit und ohne Ko-Kultur von CHO-Kontrollkulturen.	57
Tabelle 4.2: IL-12- und IL-10-Produktion von DCs nach Ko-Kultur mit Syncytin-1-, -2- und HML-2-ko-exprimierenden Effektorzellen.	66
Tabelle 4.3: LFA-1- und ICAM-Expression auf DCs nach Ko-Kultur mit HERV-Hüllprotein-exprimierenden Effektorzellen.	75

12. Publikationen und Präsentationen

12.1. Publikationen

- 2015 Human endogenous retrovirus envelope proteins target dendritic cells to suppress T-cell activation. Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Nora Müller, Elita Avota, Sibylle Schneider-Schaulies
Eur J Immunol. 2015 Mar 9. doi: 10.1002/eji.201445366
- 2014 Proteasome Inhibition with Bortezomib Depletes Plasma Cells and Specific Autoantibody Production in Primary Subject Cell Cultures from Early-Onset Myasthenia Gravis Patients. Alejandro M. Gomez, Nick Willcox, Kathleen Vrolix, Jonas Hummel, Gisela Nogales-Gadea, Abhishek Saxena, Hans Duimel, Fons Verheyen, Peter C. Molenaar, Wim A. Burman, Marc H. De Baets, Pilar Martinez Martinez, and Mario Losen
J Immunol; published 2014, doi:10.4049/jimmunol.1301555
- 2009 Pieter Giesbertz, Jonas Hummel, Stan Gaj, Danyel Jennen, Thomas Kelder, Chris Evelo, Joost van Delft, and Jos Kleinjans. Creating and improving detoxification pathways for interpretation of toxicogenomics data. Available from Nature Precedings
- 2009 GeneMapp approved Wikipathway: DNA damage response, Jonas Hummel, 2009
<http://wikipathways.org/index.php/Pathway:WP707>

12.2. Präsentationen

12.2.1. Vorträge

- 2014 Study group “Immunobiology of Viral Infections” 13th Workshop „PATHOGENITÄTSMCHANISMEN UND IMMUNKONTROLLE VIRALER ERREGER“ in Bad Dürkheim, Deutschland
Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Elita Avota, Nora Müller, Sibylle Schneider Schaulies
HERV env proteins act to suppress T-cell activation by interfering with DC allostimulatory activity
- 2013 8th Network Meeting of DFG research training groups GK1660, GK520 and SFB685 in Obertrubach, Deutschland
Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Elita Avota, Sibylle Schneider-Schaulies
Human endogenous retroviruses as immune modulators in healthy and impaired human pregnancy

12.2.2. Poster

- 2014 24. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Alpbach, Österreich
Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Elita Avota, Sibylle Schneider-Schaulies
Human endogenous retroviruses modulate T-cell expansion at the level of DC activity rather than directly
- 2014 9th Annual Meeting Immunology Training Network of Tübingen, Erlangen and Würzburg in Kloster Schöntal, Deutschland
Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Elita Avota, Sibylle Schneider-Schaulies
Human endogenous retroviruses modulate T-cell expansion at the level of DC activity rather than directly
- 2013 23. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Kiel, Deutschland
Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Sibylle Schneider-Schaulies
Human Endogenous Retroviruses as immune modulators in healthy and impaired human pregnancies
- 2013 IZKF Retreat Kloster Banz
Ulrike Kämmerer, Sibylle Schneider Schaulies, Sabine Segerer, Franziska Köhler, Jonas Hummel
Humane Endogene Retroviren (HERV) als Immunmodulatoren in gesunden und gestörten Schwangerschaften
- 2012 7th International Symposium by the Graduate School of Life Sciences EPOS in Würzburg, Deutschland
Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Sibylle Schneider-Schaulies
Human Endogenous Retroviruses as immune modulators in healthy and impaired human pregnancies
- 2012 7th Annual Meeting Immunology Training Network of Tübingen, Erlangen and Würzburg in Kloster Schöntal, Deutschland
Jonas Hummel, Ulrike Kämmerer, Sibylle Schneider-Schaulies
Human Endogenous Retroviruses as immune modulators in healthy and impaired human pregnancies
- 2012 IZKF Retreat Kloster Banz.
Ulrike Kämmerer, Sibylle Schneider Schaulies, Sabine Segerer, Franziska Köhler, Jonas Hummel
Humane Endogene Retroviren (HERV) als Immunmodulatoren in gesunden und gestörten Schwangerschaften

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für das Bereitstellen des interessanten Themas und des damit verbundenen Vertrauens, der guten Betreuung und den hilfreichen Diskussionen, sowie der Aufnahme in ihr tolles Laborteam.

Prof. Dr. Ulrike Kämmerer für die Hilfe und Betreuung sowie Diskussionen während der Doktorarbeit.

Prof. Dr. Manfred Lutz für die Übernahme des Drittgutachtens und die hilfreichen Diskussionen.

Prof. Dr. Thomas Hünig für Unterstützung und Diskussionen während der Seminare des Graduiertenkollegs Immunmodulation.

Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für hilfreiche Diskussionen.

Dr. Elita Avota für die großartige Hilfe im Projekt sowie Diskussionen, immer ein offenes Ohr zu haben, viele gute Ratschläge und eine tolle Zeit im Labor.

Dr. Nora Müller für die Hilfe am konfokalen Mikroskop und viele Diskussionen sowie für die tolle Zeit im Labor.

meinen tollen Freunden/Kollegen im Labor und dort besonders Dr. Alice Rein, Charlene Börtlein, Rebekka Springel, Belinda Aul, Eva Gschmack, Christiane Prifert, Sonja Kern für eine unvergessliche Zeit und viel Spaß bei der Arbeit.

Michaela Kapp für die Hilfe bei der Zytokinmessungen.

dem IZKF Würzburg für die Finanzierung des Projektes.

allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs Immunmodulation und besonders Paula und Bettina für die Organisation.

der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Würzburg für die Bereitstellung der Leukozytendepletionsfiltern.

meinen Eltern, meinem Bruder Matthias und meiner Freundin Anne für die unendlich große Unterstützung und der Hilfe bei der Verwirklichung meiner Ziele.

14. Lebenslauf

15. Eidesstattliche Erklärung

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Human endogenous retrovirus envelope proteins target dendritic cells to modulate T-cell activation" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Hüllproteine endogener Retroviren interferieren mit der allostimulatorischen Aktivität dendritischer Zellen" eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift