

**Modulation der Expression des Rec-Proteins von
HERV-K(HML-2) in primären Zellen**

Bachelorarbeit

im Bachelor-Studiengang Biotechnologie/

Biotechnology

der Beuth Hochschule für Technik

- University of Applied Science -

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Bachelor of Science (B.Sc.)

vorgelegt von

Annika Treppschuh

Berlin, März 2014

Danksagung

Die Praxisphase wurde am Robert Koch-Institut am Nordufer 20 in 13353 Berlin durchgeführt. Speziell wurde die Arbeit in der Abteilung für Infektionskrankheiten im Fachgebiet „HIV und andere Retroviren“ absolviert.

Ich möchte mich bei dem Leiter unserer Arbeitsgruppe Herr Dr. Bannert für die Möglichkeit bedanken, in dieser Einrichtung gearbeitet haben zu dürfen.

Auch möchte ich Dr. Oliver Hohn und Dr. Stephen Norley danken, die immer für alle Fragen und Hilfestellungen offen waren.

Zusätzlich danke ich Katharina Fiddeke und Benjamin Gabriel für ihre Unterstützung und die gute Zeit, sowie auch unseren guten Feen Sabina Reichert und Kornelia Gericke für die liebevolle Bewirtung.

Abkürzungsverzeichnis

GOI	Gene Of Interest
HEK 293	humane embryonalen Nierenzellen
HERV	humane endogene Retroviren
HIV	Humanen Immundefizienz-Virus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
NHEM	Normal human epidermal melanocyten
OSEC	Ovarian surface epithelial cell
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Reverse Transkriptase
shRNA	Short hairpin RNA
Tera-1	humane embryonalen Teratokarzinom
VLP	Virus-like-particle

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Theoretischer Hintergrund	1
1.1.1	Viren	1
1.1.2	Retroviren	2
1.1.3	Humane endogenen Retroviren	3
1.1.4	Die Familie HERV-K(HML-2) und ihr Vertreter HERV-K113	4
1.1.5	Rec-Protein	5
1.1.6	Rec-Protein und Krebsentstehung	6
1.1.7	Prinzip der Pseudotypisierung	6
1.1.8	Regulation der Genexpression	7
1.2	Zielsetzung	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Geräte	9
2.1.2	Chemikalien und Puffer	9
2.1.3	Enzyme und Kits	11
2.1.4	Konstrukte, Vektoren und Plasmide	11
2.1.5	Antikörper	12
2.1.6	Eukaryotische Zelllinien und Primärzellen	12
2.2	Methoden	12
2.2.1	Transformation chemisch kompetenter Zellen	12
2.2.2	Plasmidisolierung	12
2.2.3	Restriktionsverdau	13

2.2.4	DNA-Agarosegelelektrophorese	13
2.2.5	DNA- und RNA Konzentrationsbestimmung	13
2.2.6	DNA-Sequenzierung	13
2.2.7	Zellkultivierung	13
2.2.8	Transfektion.....	14
2.2.9	Ultrazentrifugation	14
2.2.10	Infektion	14
2.2.11	p24-ELISA	15
2.2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	15
2.2.13	Durchflusszytometrie (FACS)	16
2.2.14	Immunfluoreszenz.....	16
2.2.15	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM).....	16
2.2.16	Rec-Silencing und Duplex real time RT-PCR	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Rec-Überexpression	18
3.1.1	VLP-Produktion und Quantifizierung	18
3.1.2	Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie von Rec-überexprimierenden Zellen.....	20
3.1.3	Detektion von überexprimierten Recs mittels FACS-Analyse.....	22
3.2	Rec-Silencing	24
3.2.1	VLP-Produktion und Quantifizierung	24
3.2.2	Detektion des Rec-Silencing mittels Duplex real time RT-PCR.....	27
4	Diskussion.....	30
4.1	Rec-Überexpression	30
4.2	Rec-Silencing	32
5	Zusammenfassung	34
6	Abstract	35
7	Literaturverzeichnis	36

1 Einleitung

1.1 Theoretischer Hintergrund

1.1.1 Viren

Gift. Unsichtbare Mikroben. Parasiten. Viren haben viele Namen noch bevor sie überhaupt als Krankheitserreger identifiziert werden konnten. Trotzdem gab es frühzeitig Bemühungen dem unbekanntem Pathogen Einheit zu gebieten. 1796 erkannte Edward Jenner, dass Infektionen mit dem Kuhpocken-Virus schützende Wirkung gegen das humanpathogene Pockenvirus erbrachten, noch bevor eine Impfung als solche erfunden worden war. Erste Identifikationen von Viren erfolgten 1892 von Dimitri I. Iwanowski mit dem Tabakmosaikvirus als erstes Pflanzenpathogen, 1898 von Friedrich Löffler mit dem Maul-und-Klauenseuche-Virus als erstes Tierpathogen und 1900 von Walter Reed mit dem Gelbfiebervirus als erstes humanpathogenes Virus. Erstmals 1940 wurden die zum größten Teil nicht im Lichtmikroskop sichtbaren Mikroben durch die Erfindung des Elektronenmikroskops von Helmut und Ernst Ruska bildliche Realität. Für die weitere Entwicklung spielten besonders Forschungen mit Bakteriophagen eine Rolle. Später folgten Tierexperimente bis hin zum heutigen Forschungsschwerpunkt Zellkultur. Dabei gehen moderne Erkenntnisse in der Molekularbiologie sowie Virologie Hand in Hand. Nachdem 1952 Alfred D. Hershey und Martha Chase entdeckten, dass Viren auf Nukleinsäuren basieren, können heute Viren *in vitro* gezüchtet werden um auf Morphologie, Replikationszyklus und Pathogenese hin untersucht werden zu können. 1911 erkannte Francis Peyton Rous erstmals mit dem nach ihm benannten Rous-Sarkom-Virus, dass Viren Tumorerkrankung auslösen können (Coffin 1997). Heute werden mehrheitlich onkogene Retroviren im Prozess der Tumorentstehung untersucht. Antivirale wirkende Substanzen sind jedoch aufgrund der zelltoxischen Nebenwirkungen, Selektivität und der ständigen Varianz des Virus schwer zu entwickeln. Neueste Methoden beruhen auf Designer-Medikamente, welche als Substrat-Analoga speziell die aktiven Zentren von viralen Enzymen hemmen (Modrow 2010). Erfolge wurden durch die Impfung gegen das onkogene humane Papillomavirus erzielt, weswegen Harald zur Hausen aus der deutschen Krebsforschung 2008 mit dem Nobelpreis in Medizin geehrt wurde. Neuartige Virostatika nehmen an Bedeutung zu, da sich insbesondere in einer globalen Welt Viren rasant verbreiten und den auf Viren basierende Zoonosen, wie die „Schweinegrippe“, Vogelgrippe-

Virus H5N1 oder auch HIV muss Einheit geboten werden. Eine Vakzinierung und Heilung bei zum Beispiel bei dem Humanen Immundefizienz-Virus HIV wurden bisher noch nicht erfolgreich vollzogen (Modrow 2010).

1.1.2 Retroviren

Die wohl bekanntesten Vertreter der *Retroviridae* sind das 1936 von J. Bittner beschriebene Maus-Mammatumor-Virus MMTV (Bittner 1936), das 1982 von Robert C. Gallo beschriebene humane T-Zell-Leukämie-Virus HTVL-1 (Gallo 1982, Gallo 2005) oder die in den 1980er Jahren beschriebenen Erreger HIV-1 und HIV-2 der erworbenen Immunschwäche AIDS (Montagnier 1983). Retroviren gehören zu den RNA Viren und replizieren in lebenden Zellen. Sie besitzen eine Membranhülle mit einem Durchmesser von circa 100 nm und die Kapside, in denen das virale RNA Genom enthalten ist, bilden Ikosaeder oder Konusse.

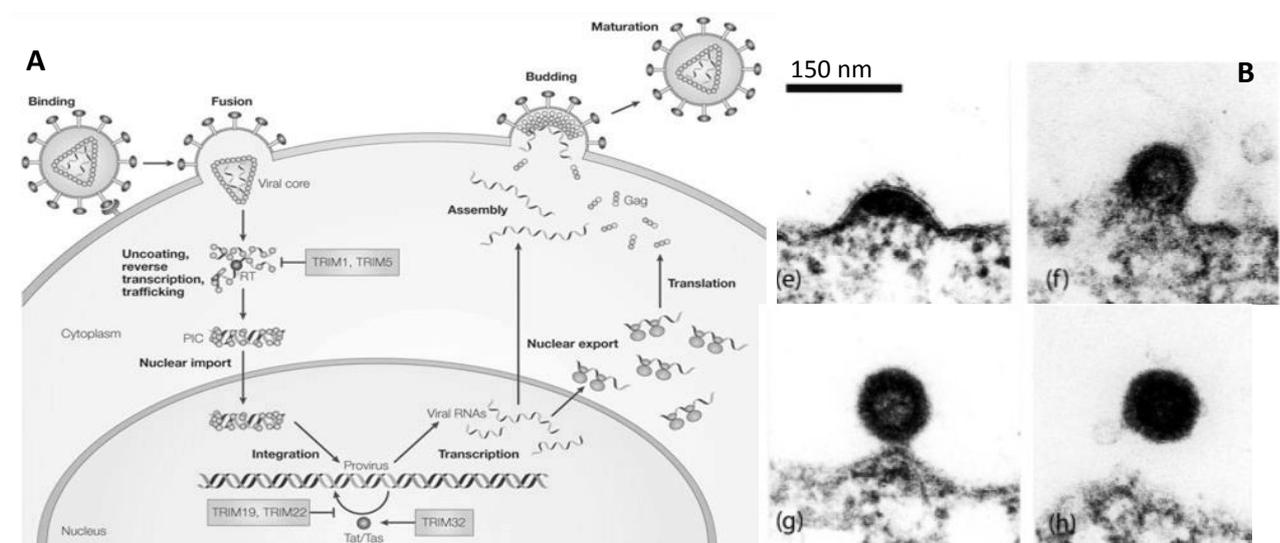


Abb. 1 **A Schema des Replikationszyklus von Retroviren:** Nach der spezifischen Anheftung des Viruspartikel an die Zellmembran und Injektion der viralen RNA und Enzyme, wird mithilfe der RT die ssRNA in dsDNA umgeschrieben. Durch die Integrase kann diese dann im Wirtsgenom integriert werden (Nisole et al. 2005, Nature Reviews Microbiology). **B Elektronenmikroskopische Aufnahme eines retroviralen Buddings von HERV-K113:** Partikel mit retroviraler Morphologie, aber ohne kondensierten Corekapsid (Boller 2008, Journal of General Virology)

Die Besonderheit der Retroviren ist die reverse Transkriptase (RT), welche 1970 Howard Temin und David Baltimore entdeckt wurde (Baltimore D. 1985). Dieses Enzym schreibt die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA um, nachdem die virale Nucleinsäure durch Adsorption, Injektion und Entpackung (Uncoating) in die Zelle gelangt ist (siehe Abb. 1 A). Die virale Erbinformation wird mithilfe der Integrase in das Wirtsgenom integriert und liegt dort als Provirus vor. Dort wird sie wie ein Wirtsgenom-Abschnitt behandelt und horizontal weiterver-

erbt. Zur weiteren Produktion von regulatorischen Proteinen, Enzymen oder zur Vermehrung viralen Erbguts wird der Proteinbiosyntheseapparat des Wirts genutzt. Zur Replikation werden gespleißte und ungespleißte mRNA in Strukturproteine und Enzyme umgeschrieben und mit Vollängen-RNA-Moleküle als virales Genom für das spätere Budding und die Maturation im Self-assembly zusammengesetzt und verpackt. Das Budding, die Bildung einer Virushülle und Austreten des reifen viralen Partikels aus der Zellmembran, wird in Abb. 1 B ersichtlich. Durch die Einbringung von Proviren kann es zu veränderten Ableseraster, Neukombination und durch virale Promotoren zu veränderten Genaktivierungen kommen (Integrationsmutagenese). Dabei kann der Tod der Zelle erfolgen sowie auch maligne Transformationen, vor allem durch Proonkogenen ähnlichen transformationsaktiven Proteinen (z.B. Tax-Protein bei HTLV). Etwa 15 - 20 % aller Krebserkrankungen werden schätzungsweise durch Viren ausgelöst. Dabei spielen eher DNA-Viren wie Papillomaviren, Hepatitis-B-Viren oder das Epstein-Barr-Virus eine entscheidende Rolle. Aber auch Vertreter der Retroviren wie HTLV, das bei 1 – 3 % der Infizierten die Krebserkrankungen T-Zell-Leukämie auslöst, stehen im Focus (Klug 2007, Holtman 2008, Modrow 2010). Zudem werden Retroviren nicht nur als Modellsystem für Krankheiten erforscht, sondern auch insbesondere für virale Transduktionen als Vektorsystemen eingesetzt, um Fremdgene in Zellen zu schleusen und somit mögliche gentherapeutische Verfahren zu entwickeln (Wink 2004).

1.1.3 Humane endogenen Retroviren

Für das MMTV konnte als erstes nicht nur eine Infektiösität innerhalb der horizontalen Verbreitung, sondern auch eine vertikale Verbreitung von der Keimzellbahn auf die Folgegeneration gezeigt werden (Modrow 2010). Auch bei dem Menschen sind die sogenannten humanen endogene Retroviren (HERV) seit den 1980ern beschrieben worden. Seit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms 2001 (Lander et al 2001) konnte gezeigt werden, dass circa 45 % der menschlichen DNA aus transponierbaren Elementen bestehen (siehe Abb. 2 A). Nur ein kleiner Anteil von 2,8 % bilden die Transposomen der Klasse „selfish DNA“ oder „junk DNA“, welche in der mobilen Phase ein DNA-Intermediat bilden (Griffiths 2001, Bannert 2004). Der größte Teil hingegen gehört zur Klasse der Retroelemente, der als Zwischenstufe das RNA-Intermediat bildet. Dazu gehören auch die HERV ehemals exogene Retroviren, die vor langer Zeit in die menschliche Keimbahn integrierten und nun 8 % unseres Genoms ausmachen (Hughes et al 2001).

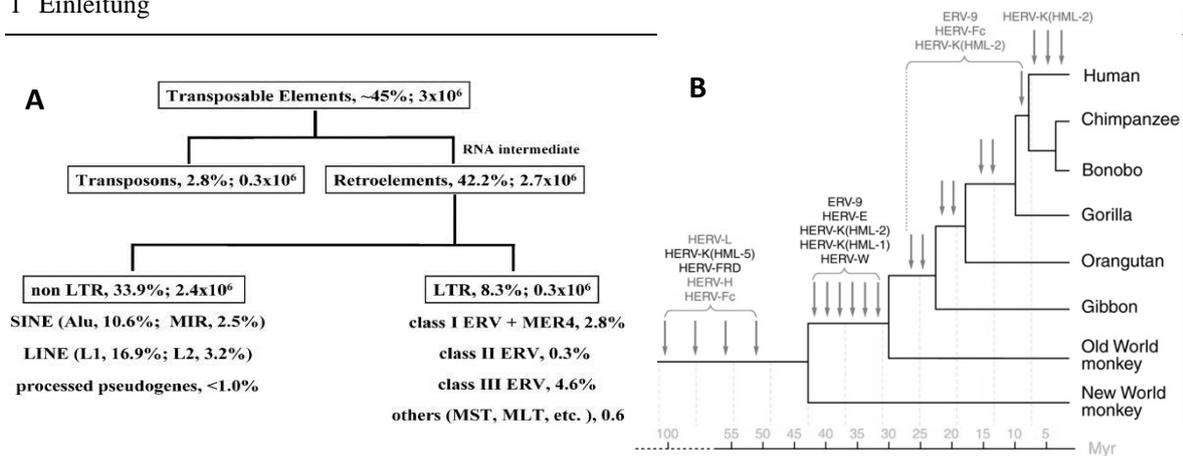


Abb. 2 **A** Aufteilung, der im menschlichen Genom enthaltenen transponierbaren Elementen (Bannert et al. 2004, PNAS) **B** Ausschnitt phylogenetischer Stammbaum von Primaten mit jeweiliger Eintrittsphase/ Erstkolonisation von bestimmten HERV-Familien: Zeitachse in Millionen Jahren der Primatenevolution nach Enard & Pääbo 2004 (Bannert und Kurth 2006, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet)

Die meisten HERV gelangten vor 40 bis zwei Millionen Jahre in das humane Genom. Durch Deletion, Rekombination und Mutation sind die meisten viralen Gene so stark verändert worden, das sie nicht mehr exogene, infektiöse Partikel bilden können (Bannert 2004). Auch mit Helferviren könnten die stark reduzierten HERV Genome, von welchen manchmal nur eine LTR-Region geblieben ist, keine infektiösen Viren mehr bilden. Jedoch gibt es unter den humanspezifischen Viren noch gut konservierte Familien, wobei die verschiedenen Altersgruppen von HERV durch Sequenzanalysen in den regulatorischen Bereichen bestimmt wurden (Stoye 2000, Subramanian 2011, Morzow 2010).

1.1.4 Die Familie *HERV-K(HML-2)* und ihr Vertreter *HERV-K113*

Zu den bestens erhaltenen Familien gehört die *HERV-K(HML-2)*-Familie (siehe Abb. 2 B), welche vor rund 35 Millionen Jahren ihren Weg in die DNA der Altweltaffen fand (Hughes 2001). Die Viren besitzen sogar offene Leserahmen für codierende Gene und können nicht infektiöse Partikel bilden (Mayer 2004). Einer der jüngsten Vertreter der *HERV-K(HML-2)*-Familie ist das *HERV-K113*, welcher vor rund 200.000 - 450.000 Jahren in das Chromosom 19p13.11 integrierte (Turner 2001, Sternberg 2012). Zum Beispiel tragen statistisch 11,8 % der polnischen Bevölkerung den Provirus in sich (Zwolinska 2013). Aufgrund der noch niedrigen Infektionsraten könnte davon ausgegangen werden, dass sich der Virus sogar noch in der Endogenisierungsphase befindet und eine Infektion von Mensch zu Mensch nicht ausgeschlossen werden kann (Bannert 2004, Beimforde 2007, Hohn 2013).

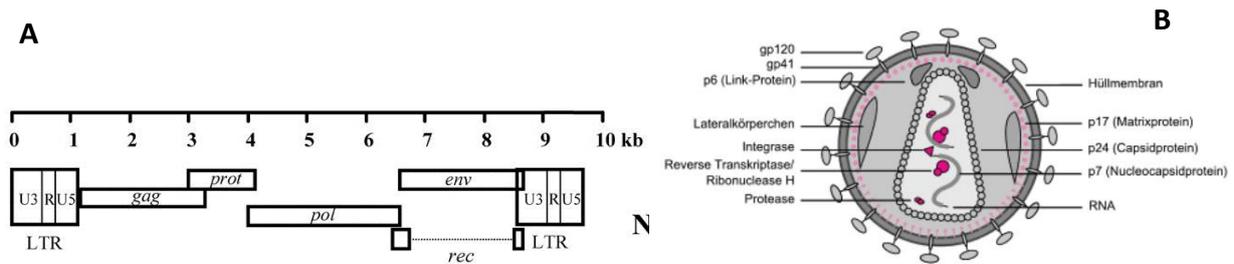


Abb. 3 **A Proviralear Aufbau von HERV-K113:** das Provirus wird von den regulatorischen Enden 5'LTR und 3'LTR begrenzt. HERV-K113 besitzt offene Leseraster für *gag*, *pro*, *pol*, *env* und für das akzessorische Rec-Protein (Bannert et al. 2004, PNAS). **B Schematischer Aufbau des retroviralen Partikels HIV:** die ssRNA und die Enzyme werden umgeben von der Capsidmembran, welche aus p24 Capsidproteinen besteht. Das Core wird von einer Membranhülle mit integrierten Hüllproteinen umschlossen (Modrow et al. 2010).

Wie in Abb. 3 A zu erkennen ist, besitzt HERV-K113 wie alle Retroviren Gene für Struktur- und Capsidproteine (*gag*), für Hüllproteine (*env*), für die Reverse Transkriptase und Integrase (*pol*) und die Protease (*pro*). An den flankierenden Enden des Provirus liegen die regulatorischen Enden long terminal repeats (LTR). Diese dienen als Promotoren und exprimieren sogar um ein Vielfaches mehr als normale Promotoren im menschlichen Genom (Coffin 1997, Modrow 2010). Beispielshalber wird in Abb. 3 B anhand eines HIV-1 Partikels der Aufbau eines Retrovirus und die ikosaedrische Kapsidform verdeutlicht.

1.1.5 Rec-Protein

Im HERV-K113, als komplexeres β -Retrovirus, existieren akzessorische Gene wie Rec und Np9. Ähnlich wie das Rev-Protein bei HIV oder das Rex-Protein bei HTLV dient Rec dazu, gespleißte und unvollständig gespleißte virale RNA vom Zellkern in das Zytoplasma zu transportieren. Das Rec-Protein besteht aus 105 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14,7 kDa. HERV-K Typ II Proviren exprimieren das Rec-Protein, wohingegen Typ I Proviren durch einen 292 bp Deletion im *env* das Np9-Protein bilden (Löwer 1995, Bannert 2004, Bücher 2006). Da die Wildtyp-Rec (wtRec) Expression in Säugerzellen nur schwach ist, wurde durch Codonoptimierung ein expressionsstärkeres oricoRec synthetisiert, welches aus Detektionsgründen noch mit einem V5-Tag versehen wurde (Hanke 2010, Hanke 2012). Zudem wurde mit dem bereits vorliegenden Vollängen-Moleklarklon von HERV K113, in dem die postinsertionalen Mutationen revertiert wurden, gearbeitet um eine Expression des Rec sicherzustellen. Der sogenannte oriHERV-K113 Provirus war in einem pBSK- Vektor kloniert und sequenziert (Chudak et al 2013).

1.1.6 Rec-Protein und Krebsentstehung

Obwohl HERV Proviren zum größten Teil inaktiv sind, kommt es in Tumorgewebe zu einer erhöhten Proteinexpression bis hin zu unreifen Partikeln der HERV-K(HML-2)-Familie, insbesondere sind dabei Ovarialkarzinome oder Melanome auffällig geworden (Büscher 2005, Büscher 2006, Wang-Johanning 2006). Neuerdings konnte auch eine Korrelation zwischen HIV Infektionen und erhöhter Expressionsmuster von HERV gezeigt werden (Gonzalez-Hernandez 2012, Kyul 2012). Insbesondere das akzessorische Rec-Protein steht im Verdacht onkogen zu sein. Bei Rec-transgenen Nacktmäusen, kam es zur Tumorbildungen (Galli 2005). Das Rec-Protein ist unter anderem als Interaktionspartner vom Promyelozytischen Leukämie Zinkfinger Protein (Denne 2007), von Staufen-1 und dem human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein (hSGT) identifiziert worden (Hanke 2012). hSGT ist beschrieben als ein negativer Regulator des Androgenrezeptor, einem Steroidhormonrezeptor. Falls dieser durch die Interaktion der beiden Proteine indirekt aktiviert wird, kommt es zur erhöhten Zellproliferation. Dies soll zusätzlich zur einer weiteren Erhöhung der Rec-Proteinmenge führen (Hanke 2012). Interessanterweise sind HERV-K(HML-2) RNA- und Proteinexpression ein Marker für maligne und nicht maligne humanen pluripotente Stammzellen sowie induziert pluripotente Stammzellen. Die Rec-Expression kann durch Zelldifferentiation herunter reguliert werden, wird jedoch nach der Rückentwicklung zu Stammzellen wieder induziert (Fuchs 2013a). Es bleibt also abzuklären ob eine HERV-Aktivierung in der Zelle Ursache oder Wirkung im mehrschichtigen Mechanismus der Tumorentstehung bedeutet und ob das Schaden oder auch Nutzen mit sich bringt. Es könnte sogar möglich sein, dass maligne Zellen durch eine Einflussnahme auf die HERV-K RNA zum Beispiel mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi) wieder in den nicht malignen Zustand geführt werden (Kurth 2011).

1.1.7 Prinzip der Pseudotypisierung

Eine Möglichkeit das *gene of interest* (GOI) in die Zelle zu transduzieren ist ein lentivirales Vektorsystem. Dabei werden im viralen Genom codierende Bereiche durch das Fremdgen und einer Promotor-Sequenz ersetzt. Um trotzdem infektiöse Viruspartikel bilden zu können, werden, die für die nötigen Strukturproteine und viralen Enzyme, Gene auf mehrere Plasmide verteilt und die Zellen co-transfiziert. Die Vektoren sind HIV-1 basierend und beinhalten zum einem das zu verpackende virale Genom, das aus den LTR mit Verpackungssignalen und der Expressionskassette besteht, sowie ein *gag* und *pol* enthaltene Verpackungsplasmid. Auf dem

Verpackungsplasmid ist auch das akzessorische Rev, welches zum mRNA Transport benötigt wird, untergebracht. Da kein retrovirales *env*-Gen enthalten ist, wird das im Vesicular Stomatitis Virus (VSV)-Hüllprotein in einem dritten Plasmid, pMD2.G, bereitgestellt. In der Zelle können dann Viruspartikel produziert werden, welche nur noch einmal infektiös sind, sogenannte single-round-Partikel (Modrow 2010, ©EPFL 2010). Dadurch kann das GOI in das Wirtsgenom integrieren und das Gen-kodierende Protein kann exprimiert werden.

1.1.8 Regulation der Genexpression

Es gibt viele Mechanismen der Genregulation wie die RNA-gesteuerte CpG Methylierung. Durch die Methylierung kann ein Gen-Silencing erfolgen, wobei dies ursprünglich ein Selbstverteidigungsmechanismus zur Stilllegung von Retroviren und anderen transponierbaren Elementen sein könnte. Durch RNA-Interferenz kann die Genexpression posttranskriptionell reguliert werden. Ein Weg besteht darin, dass die Translation der mRNA durch Basenpaarung mit einer Antisense-RNA, wie einer short hairpin RNA (shRNA) verhindert wird (Fletcher 2013). Durch diese Blockade und durch die Degradation von RISC steht die virale mRNA nicht mehr der Proteinsynthese zur Verfügung und/oder wird von der dsRNA-spezifischen RNasen abgebaut. Dieses Gen-Silencing kann durch Einführen von siRNA oder durch shRNA-exprimierende Vektoren induziert werden. Womöglich kann dieser Prozess über mehrere Zellteilungen hinweg aufrecht erhalten werden und mit Vektorsystemen auch persistent existieren (Graw 2006). Bekannte RNAi-Medikamente sind zum Beispiel Vivatren zur Behandlung von AIDS Patienten gegen Cytomegalieviren (CMV) oder ICAM-1 gegen Entzündungsreaktionen (Klug 2007). Erfolgreiches Silencing konnte schon *in situ* bei Gag- und Pol-Proteinen der porcinen endogenen Retroviren (PERV) erzielt werden (Chung 2013, Li 2013). Die Relevanz zur Untersuchung von PERV besteht insbesondere darin die Virussicherheit für Xenotransplantationen zu erforschen (Dieckhoff 2009). Auch wurden GC-Boxen von HERV-K(HML-2) mutiert und die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 durch RNAi herunter reguliert um somit Promotoraktivitäten zu senken (Fuchs 2013b).

1.2 Zielsetzung

In der Arbeitsgruppe wird das retrovirale RNA-Transportprotein Rec des endogenen humanen Retrovirus HERV-K113 auf seine Eigenschaften und Auswirkungen auf den Zellmetabolismus sowie Schritte bis hin zur malignen Transformation untersucht. Dazu wurde die Sequenz von dem Rec-Gen durch wenige postinsertionale Mutationen rekonstruiert. Da besonders in Teratokarzinome, Ovarialkarzinome und Melanome eine Expression von dem akzessorischen Rec-Protein verzeichnet wurde, sollen nun Schritte eingeleitet werden, um die Expression des Rec-Proteins in Primärzellen als Modellsystem zu etablieren.

Innerhalb dieser Bachelorarbeit sollte nun eine Methode etabliert werden, HERV-K113 Rec in eukaryotischen Zelllinien und Primärzellen zu überexprimieren und endogen exprimiertes Rec zu inhibieren. Dazu sollten bereits vorliegende Konstrukte benutzt werden, um nach dem Prinzip der Pseudotypisierung Virus-Like-Particle (VLP) zu produzieren und damit eukaryotischen Zelllinien und Primärzellen zu transduzieren. Die resultierende Überexpression des Rec-Proteins gegenüber naiven Zellen wurde dann mithilfe von Immunfluoreszenzanfärbungen im konfokalen Lasermikroskop, in der Durchflusszytometrie (FACS) und im Western Blot nachgewiesen. Zusätzlich sollte die Überexpression des endogen exprimierten Recs per shRNA-Vektoren inhibiert werden. Das Gen-Silencing sollte durch Transfektion von shRNA exprimierenden Plasmiden als auch durch Transduktion von VLP zur Expression von shRNA induziert und mittels real time RT-PCR gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Beckman Coulter Optima TM L-100K Ultracentrifuge	Beckman Coulter
CO ₂ Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific
Beckman Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter
Personal Thermo Cycler MJMini TM	BioRad
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss
FACS Calibur	BD Biosciences
Odyssey Infrared Imager	LI-COR

2.1.2 Chemikalien und Puffer

2×HBS Puffer	50 mM Hepes, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 280 mM NaCl, pH 7,0
BigDye	ABI Terminator Chemie
Marvel	1 % (w/v) Magermilchpulver in PBS
Blockingpuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS, 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
CaCl ₂ -Lösung	2,5 M in H ₂ O dest.
Zellkulturmedium	89,5 % (v/v) Dulbecco's modified Eagles medium "low glucose", 10 % (v/v) Fetales Kälberserum, 0,5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (je 10 mg/mL), 2 mM Glutamin

DNA Loading Dye	QIAGEN
dNTP's	Fermentas
Ethidiumbromid	Carl Roth
Fixierpuffer	4 % (w/v) Formaldehyd in PBS
GelRed™ 10.000× Stock	Biotium
GeneRuler DNA Ladder	Fermentas
Gold Universal Agarose	PeqLab
Kryomedium	50 % (v/v) LB-Medium, 50 % (v/v) Glycerin
Laemmli-Puffer (4x)	200 mM Tris-HCl pH 8,8, 8 % (w/v) SDS, 0,002 % (v/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Laufpuffer	2,5 mM Tris pH 8,3, 19,2 mM Glycerin, 0,01 % (w/v) SDS
LB-Agar	2 % (w/v) Agar in LB-Medium
LB-Medium	1 % (w/v) Bactohefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl in H ₂ O dest. pH 7,0
Lysispuffer	1 % (v/v) Triton X-100, 20 mM Tris pH 7,7, 150 mM NaCl
Melanocytes Growth Medium M2	Serumfrei, SupplementMix, PromoCell
Mowiol	24 g Glycerin, 9,6 g Mowiol 4-88, 24 mL H ₂ O bidest., 48 mL Tris-HCl 0,2 M pH 8,5
PAGERuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PBS	173 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ in H ₂ O dest. pH7,0
Peramibilisierungspuffer	0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS
Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM

	MgCl, 10 mM MgS, 20 mM Glucose
TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA in H ₂ O dest. pH 7,2
Transferpuffer	2,5 mM Tris pH 8,3, 19,2 mM Glycerin
Trypsin/EDTA	0,25 % (w/v) Trypsin, 0,2 % EDTA in H ₂ O dest.
Waschpuffer	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS

2.1.3 Enzyme und Kits

Alle Restriktionsenzyme wurden ausschließlich von New England Biolabs (NEB) oder Fermentas verwendet.

Endo-free Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Qiaprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
PolyFect Transfection Kit	QIAGEN
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN

2.1.4 Konstrukte, Vektoren und Plasmide

pWPXL-oricoRecV5	Dr. Oliver Hohn
pWPXL-GFP	Addgene
psPAX2	Addgene
pMD2.G	Addgene
pLVTHM	Addgene
pLVTHM-shRec 1/ 8/ 10	C. Sünder/ Dr. Oliver Hohn
pcDNA4-coRev-M5 NLS-Mutante	Katharina Fidekke
pcDNA4-coRev-M10 NES-Mutante	Katharina Fidekke

2.1.5 Antikörper

Monoclonal Anti-V5 Cy3 mouse	Sigma-Aldrich
Anti-V5 mouse	Serotec
Anti-mouse IR-Dye 680/ 800	LI-COR Biosciences
Anti-rabbit IR Dye 800	LI-COR Biosciences

2.1.6 Eukaryotische Zelllinien und Primärzellen

HEK-293T Zellen	aus humane embryonalen Nierenzellen, ATCC
Tera-1	aus humane embryonalen Teratokarzinomzellen, ATCC
Melanocyten NHEM	Normal human epidermal melanocyten, PromoCell
Ovarian cells OSEC	Ovarian surface epithelial cell, PromoCell

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Das Einschleusen der Plasmid-DNA erfolgte über Hitzeschock. Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben von Invitrogen. Bei Vektor-Plasmiden erfolgten die Inkubationsschritte bei 30 °C um mögliche Rekombinationen der LTR-*sites* zu vermeiden. Es folgte ein Ausstrich auf selektiven LB-Platten mit Ampicillin und nach ca. 20 Stunden (je nach Wuchs der Bakterienkolonien) wurden die Kolonien gepickt.

2.2.2 Plasmidisolation

Die DNA-Isolation erfolgte zur Gewinnung kleinerer DNA-Mengen mit den QIAprep Spin MiniPrep Kit bzw. größerer Mengen mit dem Endo-free Plasmid Maxi Kit von Invitrogen. Dabei wurde nach Herstellangaben verfahren. Zur Anzucht von Bakterienkulturen wurden 5 mL bzw. 250 mL LB-Medium mit Ampicillin angeimpft.

2.2.3 Restriktionsverdau

Zum Schneiden von Plasmid-DNA wurden Typ II Restriktionsenzyme eingesetzt, die hochspezifisch an den Erkennungssequenzen *sticky* oder *blunt ends* produzierten. Die Enzyme wurden mit den geeigneten Puffern nach Herstellerangabe eingesetzt und der Restriktionsansatz meist für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.2.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle von DNA von Restriktionen aus Plasmidisolationen wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 0,8 – 1 % (w/v) Agarosegele mit 1× TAE-Puffer hergestellt. Die Auftrennung lief bei einer Spannung von 60 – 70 V für 45 bis 75 min.

2.2.5 DNA- und RNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA- und RNA Konzentration wurden mit dem NanoDrop ND-1000 nach den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

DNA-Plasmide wurden mit der Sanger Kettenabbruchmethode im Sequenzierlabor analysiert. Ein typischer Sequenzieransatz wurde mit 150 – 200 ng DNA nach BigDye 3.1 Protokoll ange-
setzt und die Sequenzierung unter folgenden Bedingungen gestartet:

96 °C	2 min	initiale Denaturierung	} 25×
96 °C	10 s	Denaturierung	
50 °C	10 s	Primer-Annealing	
60 °C	4 min	Elongation	

2.2.7 Zellkultivierung

HEK 293T-Zellen und Tera-1 Zellen wurden Zellkulturmedium bei 5 % CO₂, 37 °C und 98 % Luftfeuchtigkeit in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert. Zum Passieren wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 mL

trypsiniert und mit 10 mL frischem Medium abgewaschen und vereinzelt. Je nach Konfluenz wurden die Zellen meist 1 : 10 gesplittet und ad 25 mL frisches Medium aufgefüllt. Die Primärzellen NHEM bzw. OSEC wurden in ihrem speziellen Medium Melanocyte Growth Medium M2 bzw. OEpiCM in 25 cm² Kulturflaschen angezogen. Zum Passagieren wurde das Detach Kit nach Herstellerangaben benutzt.

Eine Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Coulter Counter.

2.2.8 Transfektion

Für die Transfektion in HEK 293T Zellen in 10 mm Platten wurde die Calciumphosphat-Methode angewandt. Eingesetzt wurden 24 µg DNA im Verhältnis 4 : 3 : 1 (Vektor : Verpackung : Hüllprotein), welche auf 450 µL H₂O bidest. aufgefüllt und mit 50 µL 2,5 M Calciumchlorid versetzt wurden. Der DNA/Calciumchlorid Mix wurde gut gemischt und zu 500 µL 2× HBS-Puffer getropft. Innerhalb der Inkubationszeit von 30 min wurde das Medium der Zellen gewechselt. Danach wurde 1 mL des Tranfektionsansatzes zu den Zellen getropft und gut gemischt. Nach circa 10 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen zu einer ausreichenden Proteinkonzentration weiterkultiviert.

Bei einer Transfektion mit Polyfect oder Attractene wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.9 Ultrazentrifugation

Um eine Aufkonzentrierung der pseudotypisierten Viruspartikel zu erhalten, wurden die Zellkulturüberstände ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert und auf ein 20%iges Sucrose-Kissen gegeben. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden in den SW32Ti Ausschwingrotor justiert und die Beckmann Optima™L-100 Ultrazentrifuge lief drei Stunden bei $175.000 \times g$ (r_{\max}) und 4 °C. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet 30 min auf Eis inkubiert und in Zellkulturmedium resuspendiert. Der Virusüberstand wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.10 Infektion

Zur Infektion wurden die Zellen in einem Reaktionsgefäß in Virusüberstand direkt resuspendiert und ausgesäte Zellen mit Virusüberstand beschichtet. Zusätzlich wurde Polybrene, ein

kationisches Polymer, in einer Endkonzentration von 6 µg/mL eingesetzt um die unterschiedlichen Oberflächenladungen zu minimieren. Die Ansätze wurden dann 1 h bei 800 g spinoculiert.

2.2.11 p24-ELISA

Um die pseudotypisierten Viruspartikel quantifizieren zu können, wurde das HIV-1 Gag-Protein mithilfe des p24 ELISA nachgewiesen. Zuerst wurden 96-well Platten mit dem monoklonalen Antikörper AG3.0 α -Gag (HIV-1) beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 µL/well des Blockierungspuffers (2 % Milchpulver in PBS) abgesättigt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden zur Inaktivierung (Lyse) mit 2 % Tween 20 auf eine Endkonzentration von 0,2 % Tween 20 versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden pro well 50 µL PMT vorgelegt, die Proben sowie eine Positivkontrolle (SIV-mac Antigen) und eine Negativkontrolle (Zellkulturmedium) pipettiert und 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Waschung der Platte erfolgte der Auftrag von 50 µL pro well des ersten Antikörpers (HIV-Pool-Plasma aus dem Menschen 1 : 2000 in PMT). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte eine erneute Waschung und dasselbe Auftragschema des zweiten Antikörpers (α -Human-IgG Peroxidase Konjugat von Sigma 1 : 1000 in PMT). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte eine erneute Waschung und schließlich der letzte Reaktionsschritt. Dieser war die Zugabe des Substrates (12,5 mL Citratpuffer pH 5,0, 5 mg Tablette o-phenylenediaminehydrochlorid OPD, 5 µL H₂O₂) mit 50 µL pro well. Nachdem die Positivkontrolle quittengelb geworden ist, wurde die Reaktion mit 25%iger (v/v) Schwefelsäure abgestoppt und die Proben am ELISA Reader EAR 400 AT (SLT-Labinstruments) bei 492 nm gemessen.

2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Es wurden durchgängig 15%ige Polyacrylamidgele verwendet (1,5 mm). Bei einem Probekamm mit 10 Taschen konnten 50 µL aufgetragen werden. Die Proben liefen bei einer Spannung von 100 V für 10 min und dann bei 180 V bis der Probenpuffer aus dem Gel gelaufen war. Das Trenngel wurde für 20 min in Transferpuffer (BioRad) geschwenkt und im Semidry-Blot auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Der Transfer wurde bei 10 V für 70 min oder 20 V für 40 min vollzogen. Danach erfolgte der Blockierschritt mit Blockierpuffer und der Auftrag des ersten Antikörpers verdünnt in Blockierpuffer (über Nacht bei 4 °C). Nach erneuter Waschung mit PBS 0,1 % Tween wurde der zweite Antikörper hinaufge-

geben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschschrift wurde die Membran im Odyssey Reader eingelesen oder mit ECL-Lösung überspült und belichtet.

2.2.13 Durchflusszytometrie (FACS)

Bei dieser Arbeit wurden entweder Zellen mit dem Fluoreszenztag GFP-Tag oder einem V5-Tag quantifiziert. Der V5-Tag benötigte zusätzlich eine antikörpervermittelte Markierung um detektiert werden zu können. Bei der Präparation wurden die Zellen mit 500 μ L 2%igen PFA fixiert. Nach einer Waschung in PBS und Resuspendierung in PBS konnten Zellen mit GFP-Tag sofort vermessen werden. Zellen mit V5-Tag wurden mit einem in 0,5 % Saponin gelösten, direkt Fluoreszenzmarkierten Antikörper für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal in 0,5 % Saponin und einmal in PBS gewaschen und schließlich zur Messung in 100 μ L PBS resuspendiert. Zur stärkeren Permeabilisierung wurde 0,5 % Triton-X verwendet.

2.2.14 Immunfluoreszenz

Bei der Präparation mussten die Zellen in 6-well Platten oder in *chamber slides* zuerst mit PBS gewaschen und dann mit 2%igen Formaldehyd fixiert werden. Nach einer Waschung von zweimal 10 min erfolgte der Permeabilisierungsschritt mit 0,5 % Triton 10-X in PBS und der Blockierschritt mit 1 % (w/v) Milchpulver in PBS (beides 15 min). Danach wurden die durchlässigen Zellen mit dem direkt konjugierten Antikörper für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer Waschung von zweimal 10 min erfolgte die Eindeckelung mit 7 μ L Mounting Medium with DAPI (Vector Labs) und Versiegelung mit Nagellack.

2.2.15 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM)

Bei dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 780 von Carl Zeiss handelt es sich um ein Fluoreszenzmikroskop, welches mit verschiedenen Lasern simultan die Proben anregen und Punkt für Punkt rastern kann. Dadurch sind auch dreidimensionale Bilder möglich sowie die Fokussierung verschiedener Ebenen des Präparates. Übersichtsaufnahmen wurden mit einem 20fachen Objektiv aufgenommen und sollten zur Bestimmung der Infektionsraten dienen. Für präzisere Bildausschnitte wurde ein 63faches Öobjektiv gewählt. Eine besondere Funktion war der Tile Scan, mit dem die Übersichtsaufnahmen von vier nebeneinander gelegenen Bildaus-

schnitten gemacht wurden. Bilder konnten anschließend noch mit dem ZEN 2009 Light Edition Programm z.B. mit Maßstäben versehen werden oder es wurden nur bestimmte aufgenommen Kanäle sichtbar gemacht.

2.2.16 Rec-Silencing und Duplex real time RT-PCR

Für das Silencing wurden shRNA-Vektoren benutzt, die aus vorigen Arbeiten der Arbeitsgruppen mithilfe des Block-iT RNAi Designers von Invitrogen nach der Target-Sequenz von HERV K113 oriRec synthetisiert wurden. Die ds-Oligonukleotide wurden in pLVTHM-Vektoren hinein kloniert (pLVTHM-shRec1/ 8/ 10). Die real time RT-PCR wurde nach dem Silencing zur Verhältnisbetrachtung der gespleißter HERV mRNA und GAPDH-RNA als Housekeeping-Gen benutzt. Dazu werden Farbsonden benutzt, deren Absorption als Funktion zur Zeit aufgenommen werden. Das Signal entspricht dabei der DNA-Menge im Reaktionsgefäß. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Dabei werden eine Target- und eine Referenzprobe (Housekeeping Gen GAPDH) mitgeführt, von denen der normalisierte C_T -Wert ermittelt wird. Nun erfolgt die Normalisierung des C_T -Wertes, indem der C_T -Wert der Referenz-Probe vom dem C_T -Wert der Target-Probe abgezogen wird (ΔC_T). Nun werden alle C_T -Werte vom Kalibrator abgezogen, einschließlich der Kalibrator von sich selbst ($\Delta\Delta C_T$). Der Ratio-Wert ergibt sich dann aus der Zweierpotenz des negativen $\Delta\Delta C_T$ -Wertes, welcher bei mehreren Probenansätzen gemittelt werden kann. Die mRNA wird also nicht direkt quantifiziert, sondern im Verhältnis zum Housekeeping-Gen gesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Rec-Überexpression

3.1.1 VLP-Produktion und Quantifizierung

Die Überexpression des Rec-Gens sollte mittels eines Transduktionssystem realisiert werden, welche auf Lentiviren basiert.

Dabei wurde mit dem pWPXL-Vektor, welcher ein GFP oder das codonoptimierten oricoRec-V5 von HERV-K113 besitzt, gearbeitet. Zur Vervielfältigung wurde das Vektor-Plasmid sowie das Verpackungsplasmid psPAX2 und das Hüllprotein-Plasmid pMD2.G in chemisch kompetente *E. coli* Stbl3 transformiert und wachsende Kolonien von Selektionsplatten gepickt und in Flüssigmedium angeimpft. Um weitere Flüssigkulturen mit demselben Klon animpfen zu können, wurden Glycerolstocks angelegt. Nach einer Maxi-Präparation wurde der DNA-Gehalt gemessen. Um nun die Integrität der erhaltenen Plasmide zu kontrollieren, wurde anhand der bekannten Sequenzen eine Restriktionskontrolle durchgeführt. Dabei wurden durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen *PmeI* und *XmaI* bei pWPXL-oricoRec-V5 sowie dem GFP-Kontrollvektor zwei Banden erwartet. Die Bande des Vektor-backbone sollte in Höhe von 10 kbp, die für das oricoRec-V5 bei 500 bp und das für GFP bei 800 bp laufen. Der psPAX2 (10.703 bp) sollte durch *NheI* linearisiert und der pMD2.G (5824 bp) mit *EcoRI* in ein 1671 bp und ein 4153 bp großes Fragment geschnitten werden.

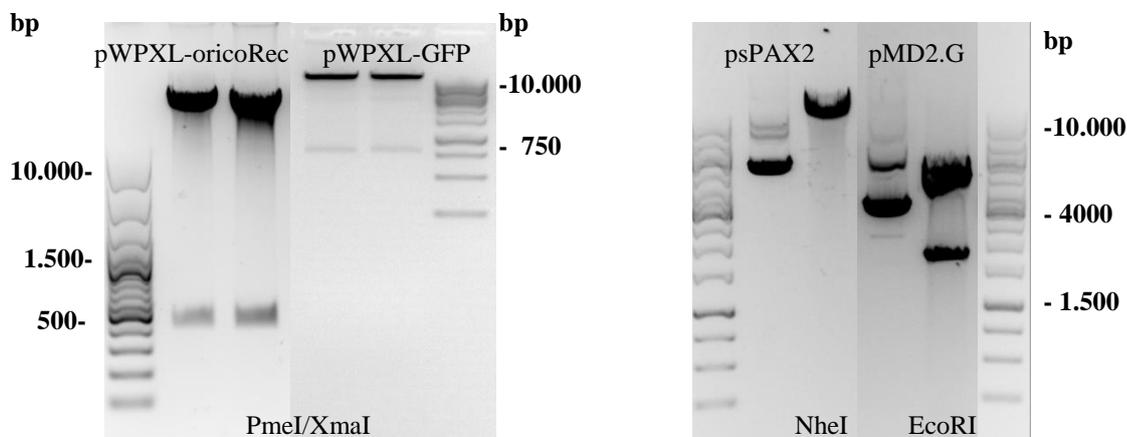


Abb. 4 Elektrophoretische Gelauf trennung der Restriktionskontrollen der Plasmidpräparation von pWPXL-oricoRecV5, pWPXL-GFP, psPAX2 und pMD2.G: jeweils 1 % Agarosegel, Marker ganz links. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, übrige GeneRuler 1 kb, 6× Loading Dye (Fermentas)

Alle, im Agarosegel sichtbaren Banden entsprechen den erwarteten Größen (siehe Abb. 4). Somit konnten die Plasmide für die VLP-Produktion eingesetzt werden.

Die Plasmide wurden für die Herstellung der VLP mit der Calciumphosphat-Methode in HEK 293T Zellen co-transfiziert. Durch eine Anregung im Fluoreszenzlicht bei 488 nm, konnte in dem mit Kontroll-Vektor pWPXL-GFP transfizierte Zellen bereits nach 48 h eine grüne Fluoreszenz wahrgenommen werden. Durch Vorversuche, die darauf schließen ließen, dass sich die meisten infektiösen Partikel nach 72- 96 h im Überstand der Zellkultur befinden, wurde nach 72 h der komplette Überstand geerntet. Durch Ultrazentrifugation wurden die Viruspartikel aufkonzentriert und anschließend im p24-ELISA quantifiziert.

Exemplarisch wird die Vorgehensweise der p24-Assay Auswertung an bestimmten Proben dargestellt. Mehrere Ansätze wurden unter verschiedenen Standardmessungen getestet und werden im Folgenden nur als p24-Proteinmenge in ng/mL dargestellt.

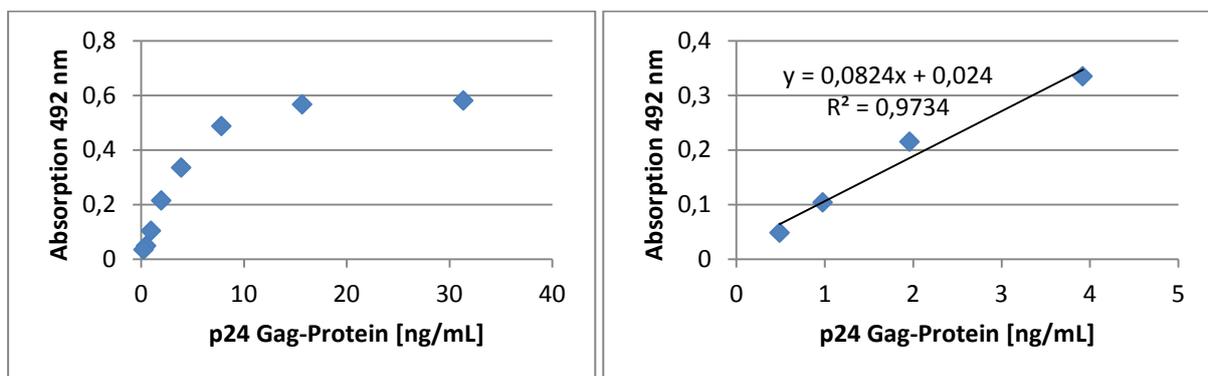


Abb. 5 links Auftragung der Absorption des Standards gegen p24 Gag-Proteinkonzentration rechts Auftragung der Absorption des Standards gegen p24 Gag-Proteinkonzentration im linearen Bereich

Aus der sequentiellen Verdünnung eines Standard mit einer Proteinkonzentration von 251 ng/mL ergab die Auftragung des linearen Bereiches folgende Geradengleichung $y=0,0824x+0,024$ mit einem Regressionskoeffizienten von 0,97 (siehe Abb. 5). Durch Einsetzen des Mittelwertes der Absorption der Proben in die Geradengleichung und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (VD), konnte die vorhandene p24-Gag-Protein Konzentration ermittelt werden (siehe Tab. 1).

Tab. 1 aus der Standardgeraden ermittelte p24 Gag-Proteinkonzentration der Proben bei gegebener VD

	Mittelwert der Absorption bei 492 nm			
VD/Probe	18.11.2013	22.11.2013	26.11.2013	02.12.2013
1:512	0,187	0,3355	0,3005	0,232
	P24-gag-Protein Konzentration [ng/mL]			
1:512	1012,8	1935,5	1718,1	1292,4

Durch die ermittelten Protein-Konzentrationen konnte die Virusmenge für folgende Infektionsversuche auf alle Zelltypen normalisiert werden. Dabei wurden im Folgenden die eukaryotischen Zelllinien mit 30 ng p24 Äquivalent und die Primärzellen NHEM und OSEC mit 100 ng p24 Äquivalent infiziert. Die Zellen wurden mit dem Virusüberstand bei einer Polybrenkonzentration von 6 µg/mL und bei 800 g für 1 h spinoculiert und danach mindestens 48 h im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert.

3.1.2 Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie von Rec-überexprimierenden Zellen

Im Folgenden sind die Bilder der Immunfluoreszenz von der konfokalen Lasermikroskopie von 293T, Tera-1 und den primären Zellen NHEM und OSEC zu sehen. Dabei wurde die exprimierten Rec-V5-Proteine mit dem monoklonalen, fluoreszierenden Antikörper Anti-V5-Tag Cy3 angefärbt. Dieser absorbiert das Laserlicht bei 514 nm und emittiert es bei 566 nm im roten Lichtspektrum. Somit zeigen positive Zellen ein rotes Signal bei exprimierten Rec-Protein.

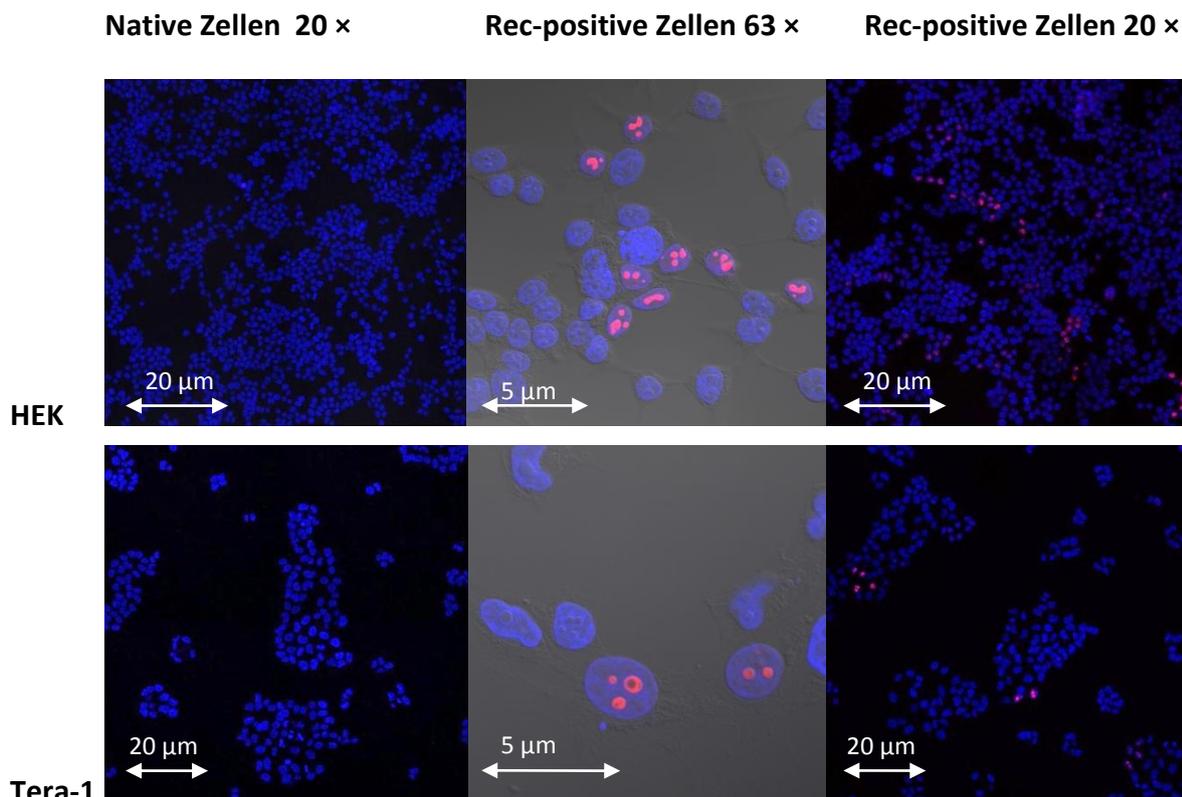


Abb. 6 Immunfluoreszenzaufnahmen der eukaryotischen Zelllinien HEK und Tera-1: Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM780, native und mit pWPXL-oricoRec transduzierte Zellen wurden mit einem Anti-V5-Cy3-Antikörper angefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen. Bei der 63-fachen Vergrößerung wurde zusätzlich der Transmissionskanal aufgenommen um nähere Zellstrukturen erkennen zu können.

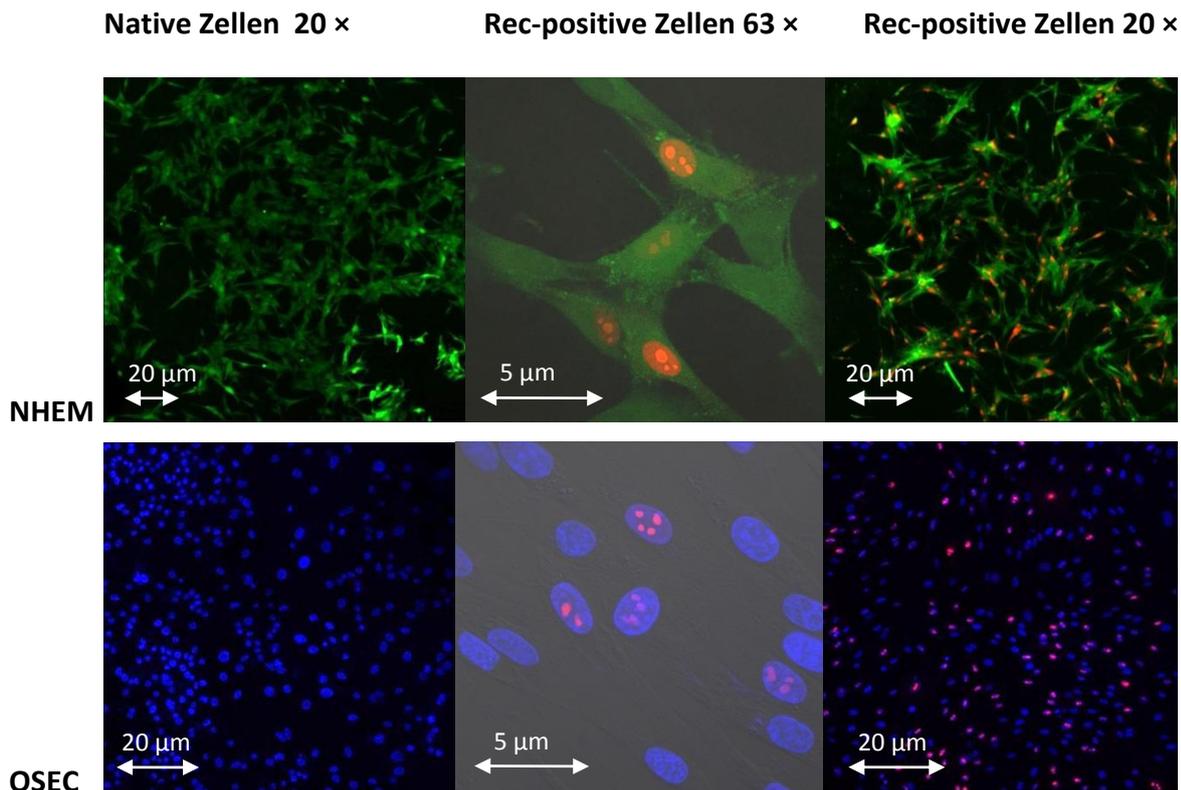


Abb. 7 **Immunfluoreszenzaufnahmen der primären Zellenn NHEM und OSEC:** Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM780, native und mit pWPXL-oricoRec transduzierte Zellen wurden mit einem Anti-V5-Cy3-Antikörper angefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen (ausgenommen NHEM). Bei der 63-fachen Vergrößerung wurde zusätzlich der Transmissionskanal aufgenommen um nähere Zellstrukturen erkennen zu können.

In der Abb. 6 und Abb. 7 sind zu erkennen, dass bei den nativ gefärbten Zellen keine unspezifischen Bindungen bzw. falsch positive Signale detektiert wurden. Bei allen Zelltypen konnten positive Signal entdeckt werden. In den Bildausschnitten mit 63-fachener Objektivvergrößerung werden die aggregierten Rec-Proteine im DAPI angefärbten, blauen Zellkern bzw. in den Nukleoli gut sichtbar. Nach Auszählung von 12 verschiedenen Bildausschnitten bei 20-facher Vergrößerung jedes einzelnen Präparats, konnten folgende Infektionsraten pro Zelltyp bei angegebener Infektionsmenge erlangt werden. Für die HEK-Zellen wurde eine Infektionsrate von 6,7 %, für die Terat-1-Zellen 7,3 %, für die Melanocyten 45,4 % und die Ovarien-Zellen 35,2 % ermittelt.

Bei einer weiteren Immunfluoreszenzpräparation wurden die HEK- und Tera-1-Zellen nicht im Virusüberstand resuspendiert, sondern adhärente Zellen damit überschichtet. Außerdem wurde mit 900 ng Virusäquivalent inkubiert. Somit sollten die Rec-infizierten Zellen wesentlich mehr Rec-positive Zellen aufweisen können. Die Ergebnisse werden in nachfolgender Abb. 8 dargestellt.

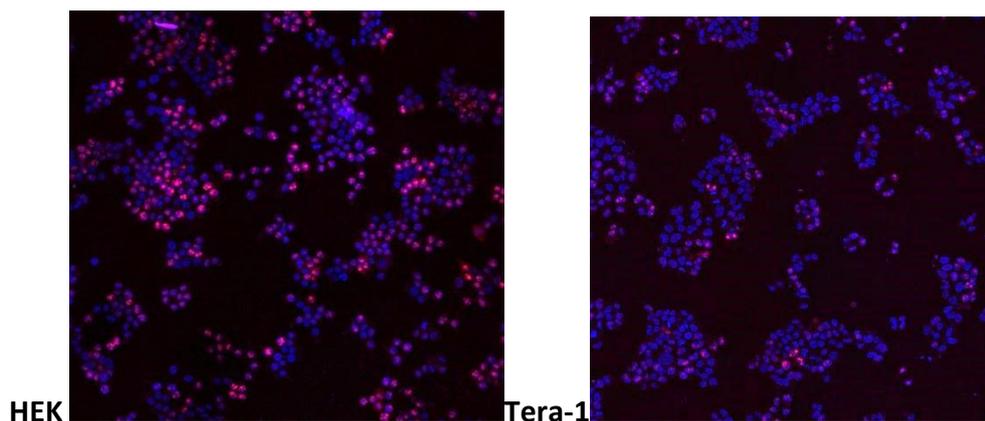


Abb. 8 **Immunfluoreszenzaufnahmen der eukaryotischen Zellen HEK und Tera-1:** Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM780, transduzierte Zellen wurden mit einem Anti-V5-Cy3-Antikörper angefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen.

Nach der Auszählung von 12 verschiedenen Bildausschnitten bei 20-facher Vergrößerung jedes einzelnen Präparats und Zelltypus, konnte den Erwartungen entsprechend eine höhere Transduktionsraten von circa 90 % erreicht werden. Bei den Tera-1 Zellen jedoch scheinen in der Abb. 8 weniger Zellen Rec-positiv zu sein, weil der Anti-v5-Antikörper nicht so ein starkes Signal widerspiegelt.

3.1.3 Detektion von überexprimierten Recs mittels FACS-Analyse

Zusätzlich sollten FACS-Analysen die Daten aus der Immunfluoreszenz untermauern. Aus der Immunfluoreszenz wurde ersichtlich, dass das Rec-Protein stark im Kern aggregierte. Somit musste eine Permeabilisierungsreagenz eingesetzt werden, welche auch den Zellkern durchlässig macht. Um eine ausreichende Permeabilisierung der Kernmembran (mit 0,5 % Saponin) und Anfärbung der Antikörper sicher zu stellen, wurden zunächst HEK-Zellen mit pcDNA3-coRev-V5 Mutanten transfiziert. Diese Mutanten exprimieren das dem Rec-Protein homologe Rev-Protein, welches die gleichen Kernsignalaufgaben bei dem HIV-1 Virus erfüllt und ähnlich lokalisiert ist. Die eingesetzten Rev-Mutanten besaßen entweder ein gestörtes Kernexport- oder Kernimportsignal. Deshalb konnte das Rev-V5-Tag Protein nur im Zellkern oder im Cytoplasma akkumulieren. Durch die jeweilige Lokalisation des Rev und dessen Signalstärke, konnte darüber geurteilt werden, ob im Zellkern eine schwächere oder gleich starke Anfärbung des V5-Tag mit dem monoklonalen Antikörper Anti-V5-Tag Cy3 erfolgen kann.

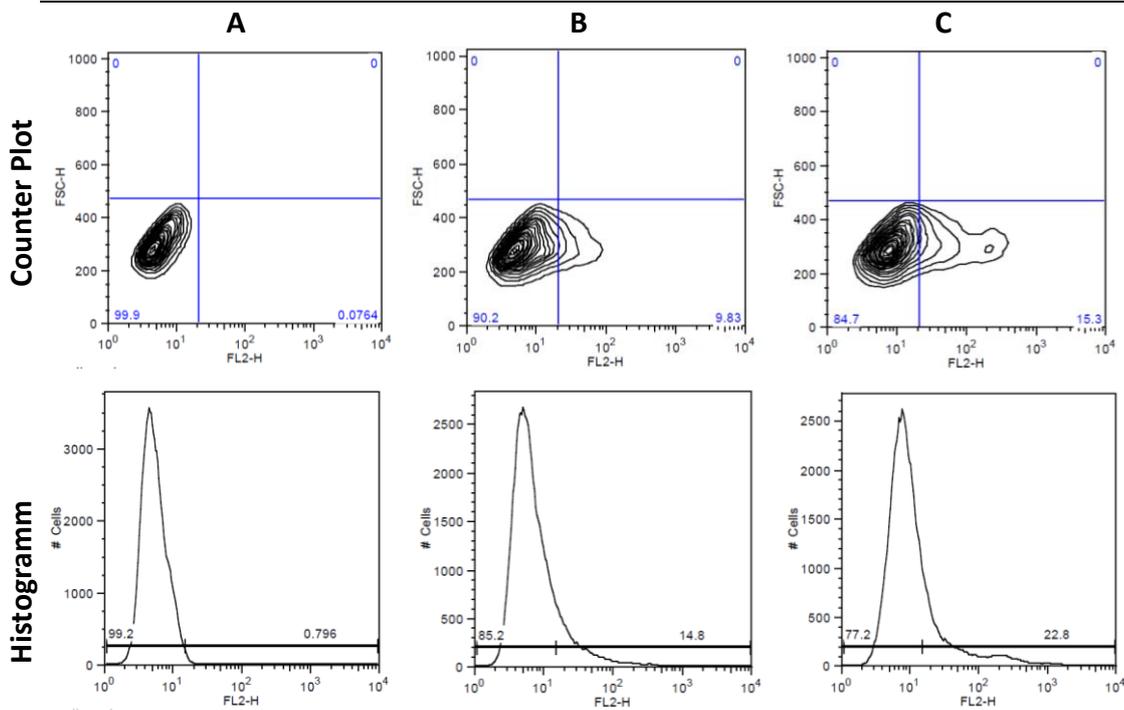


Abb. 9 FACS-Analyse der mit Rev-Mutanten transfezierten HEK-Zellen: Im Counter Plot ist der Forward-Scatter und im Histogramm die Zellzahl gegen den Anti-V5-Cy3 emittierenden FL2-Kanal aufgetragen. In beiden Diagrammtypen wurde ein Gate gesetzt, dass die negative Population von der Rec-positiven abgrenzt. **A** Zellpopulation von nativ gefärbten HEK-Zellen. **B** Zellpopulation mit der Kernexport-gestörten transfezierten Mutante HEK-Zellen **C** Zellpopulation mit der Kernimport-gestörten transfezierten Mutante HEK-Zellen.

Wie in der Abb. 9 zu erkennen ist, wird der V5-Tag um circa 5 % besser im Cytoplasma detektiert als im Zellkern. Die positive Population ist deutlicher und zeigt auch im Histogramm ein ausgeprägteres Signal. Wenn jedoch geringe Signalstärken detektiert werden müssten, wie sie aus der Immunfluoreszenzwerte der eukaryotischen Zelllinien zu erwarten waren, könnte diese 5%-Hürde zu ungenauen Daten oder gar keinem Signal führen.

Deswegen wurde für die Detektion des Rec-Proteins ein stärkeres Permeabilisierungsmittel (0,5 % Triton) benutzt, um auch im Kern bestmöglich anfärben zu können. Die FACS-Analyse wurde dazu mit 30 ng p24 Äquivalenten infizierten HEK-Zellen durchgeführt und es konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden.

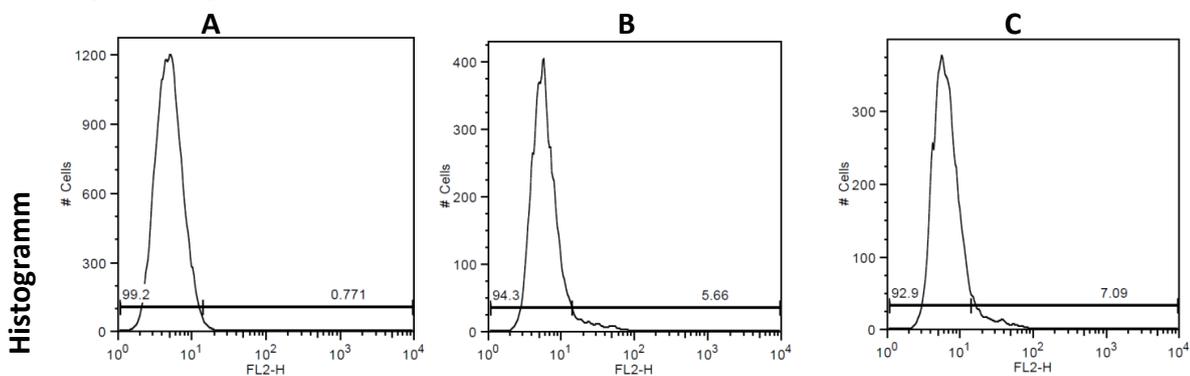


Abb. 10 FACS-Analyse der mit Rec-Konstrukt transduzierten HEK-Zellen: Im Histogramm ist die Zellzahl gegen den Anti-V5-Cy3 emittierenden FL2-Kanal aufgetragen. Das Gate grenzt die Rec-negative und -positive

Population ab. **A** Zellpopulation von nativ gefärbten HEK-Zellen. **B und C** Zellpopulation mit pWPXL-oricoRecV5 transduzierte HEK-Zellen

Bei den HEK-Zellen wurden 5,7 % und 7,1 % Rec-positive Zellen erfasst (siehe Abb. 10). Die Signale sind aufgrund der geringen Infektionsrate schwach und bilden kein klares Detektionssignal. Dennoch entsprechen die Werte den Beobachtungen mit 6,7 % Rec-positiven Zellen, welche auch in der Immunfluoreszenz mit 30 ng p24 Äquivalenten inkubiert wurden.

In der Tab. 2 werden noch einmal alle Transduktionsraten, der mit pWPXL-oricoRecV5 transduzierten eukaryotische Zelllinien HEK und Tera-1 und den primären NHEMs und OSECs, aus der Immunfluoreszenz und der FACS-Analyse zusammengefasst.

Tab. 2 Transduktionsraten [%] aller Zelltypen aus der Immunfluoreszenz und FACS-Analyse bei jeweiliger transduzierter Virusmenge

	Transduktionsrate [%]					
	HEK		Tera		NHEM	OSEC
P24 Gag- Protein-äquivalent [ng]	30	900	30	900	100	100
Immunfluoreszenz	6,7	90,9	7,3	87,9	45,4	35,2
FACS	MW 6,4					

3.2 Rec-Silencing

3.2.1 VLP-Produktion und Quantifizierung

Gegenteilig zur Rec-Überexpression sollten sich Knockdown-Versuche anschließen. Dabei wurde durch einen transfezierten Rec-Vektor das Rec in eukaryotische Zelllinien zunächst synthetisiert. Anschließend sollte das HERV-K113-Protein durch RNAi mittels shRNA-Vektoren herunterreguliert werden. Die shRNA-Sequenz wurde sowohl als Plasmid-DNA, als auch über ein Transduktoinsystem, basierend auf Lentiviren, in die Zelle gebracht. Für die Transduktion mussten demnach VLP hergestellt werden, welche die Nukleotidsequenz der shRNA beinhalten.

Dabei wurde mit dem pBSK-oriHERV-K113 Plasmid gearbeitet, welches sequenziert vorlag. Zur Vervielfältigung wurde das Expressionsplasmid in chemisch kompetente *E. coli* Stbl3

transformiert und wachsende Kolonien von Selektionsplatten gepickt und in Flüssigmedium angeimpft. Um weitere Flüssigkulturen mit demselben Klon animpfen zu können wurden Glycerolstocks angelegt. Nach einer Maxi-Präparation wurde der DNA-Gehalt gemessen. Um nun die Integrität der erhaltenen Plasmide zu kontrollieren, wurde anhand der bekannten Sequenzen eine Restriktionskontrolle durchgeführt. Der pBSK-oriHERV-K113 (12.636 bp) sollte mit *NotI* linearisiert und mit *EcoRI* in vier Fragmente (764 bp, 1143 bp, 1994 bp, 8735 bp) geschnitten werden.

Die Silencing-Vektoren mit einem pLVTHM-backbone (pLVTHM-shRec1/ 8/ 10) wurden nach dem gleichen Prinzip wie der Expressionsvektor vervielfältigt. Wenngleich die Plasmide aufgrund des kleinen Inserts von 71 Nukleotiden sequenziert werden müssten (ausreichend sequenziertes Material vorhanden). Jedoch wurde auch ein pLVTHM-Leervektor bei den RNAi-Versuchen mitgeführt, welche wie der Expressionsvektor vervielfältigt wurde. Um die korrekte Sequenz nachzuweisen, wurde der Leervektor durch einen Restriktionsverdau kontrolliert. Der pLVTHM-Leervektor (11.085 bp) sollte durch *NotI* linearisiert und mit *AgeI* in drei Fragmente (1341 bp, 3800 bp, 5943 bp) geschnitten werden.

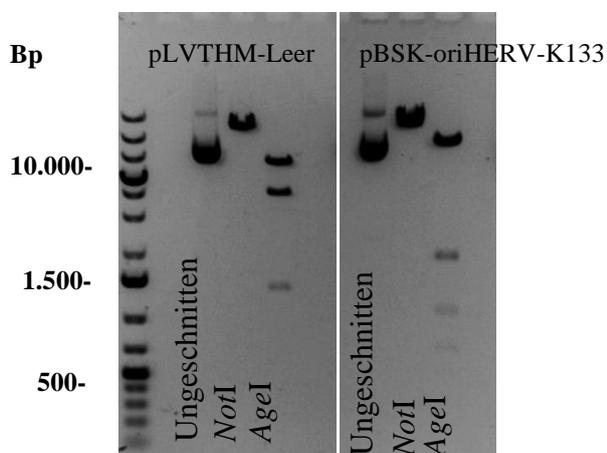


Abb. 11 **Elektrophoretische Gelauf trennung der Restriktionskontrollen der Plasmidpräparation von pLVTHM-Leer und pBSK-oriHERV-K113:** jeweils 1 % Agarosegel, Marker ganz links. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, 6× Loading Dye (Fermentas)

Alle, im Agarosegel sichtbaren Banden entsprechen den erwarteten Größen (siehe Abb. 11). Schließlich konnten der Expressionsvektor und die Plasmide für die VLP-Produktion eingesetzt werden.

Für die Herstellung der VLP wurden die Plasmide mit der shRNA-Expressionskassette (pLVTHM-shRec1/ 8/ 10) sowie der pLVTHM-Leervektor wurden jeweils mit den Plasmiden

für Verpackungs- und Hüllproteine mit der Calciumphosphat-Methode in HEK 293T Zellen co-transfiziert. Durch eine Anregung im Fluoreszenzlicht bei 488 nm, konnte durch die GFP-kodierende Sequenz im pLVTHM-Vektor, exprimiertes GFP nach 48 h wahrgenommen werden und der gesamte Virusüberstand mit single-round VLPs wurde geerntet. Durch Ultrazentrifugation wurden die Viruspartikel aufkonzentriert oder nur filtriert und anschließend im p24-ELISA quantifiziert werden.

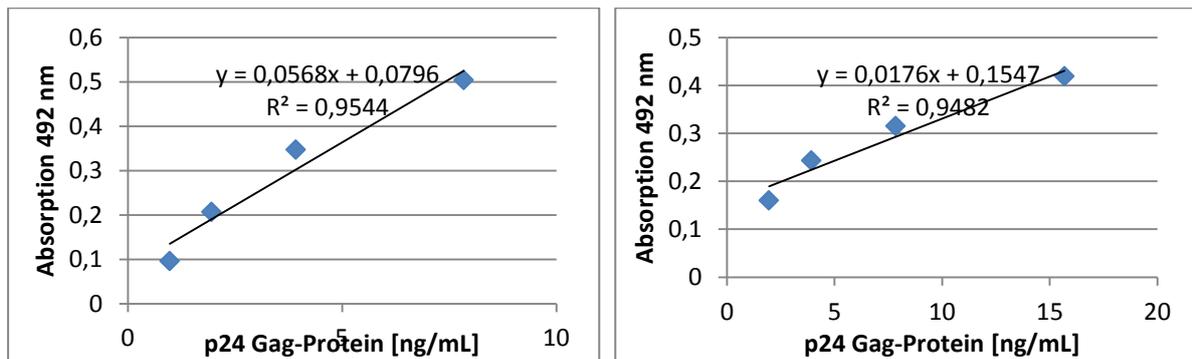


Abb. 12 **Auftragung der Absorption des Standards gegen p24 Gag-Proteinkonzentration im linearen Bereich:** links Virusquantifizierung für filtrierten Virusüberstand, rechts Virusquantifizierung für ultrazentrifugierten Virusüberstand.

Aus einem Standard mit einer Proteinkonzentration von 251 ng/mL ergab die Auftragung des linearen Bereiches für die den filtrierten Überstand die Geradengleichung $y=0,0568x+0,0796$ mit einem Regressionskoeffizienten von 0,95 und für den ultrazentrifugierten Virusüberstand die Geradengleichung $y=0,0176x+0,1547$ mit einem Regressionskoeffizienten von 0,95 (siehe Abb. 12). Durch einsetzen des Mittelwertes der Absorption der Proben in die Geradengleichung und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (VD), konnte die vorhandenen p24-gag-Protein Konzentration ermittelt werden.

Tab. 3 aus der Standardgeraden ermittelte p24 Gag-Proteinkonzentration der Proben bei gegebener VD

P24-gag-Protein Konzentration [ng/mL]				
	pLVTHM-Leervektor	pLVTHM-shRec1	pLVTHM-shRec8	pLVTHM-shRec10
Filt.	96,8	345,1	402,1	318,3
UZ	1805,9	5980,3	6415,7	5579,8

Durch die ermittelten Protein-Konzentrationen konnte die Virusmenge normalisiert werden. Vor dem eigentlichen Silencing-Versuch wurden die produzierten VLP erst auf ihre Infektiosität hin untersucht, indem HEK 293T Zellen infiziert wurden und eine GFP-positive Population mittels Durchflusszytometrie detektiert werden sollte. Anhand dieses Vorexperimentes sollte

eine möglichst hohe Transduktionsrate, mit klar erkennbaren Signalen einer GFP-positiven Population erkennbar werden.

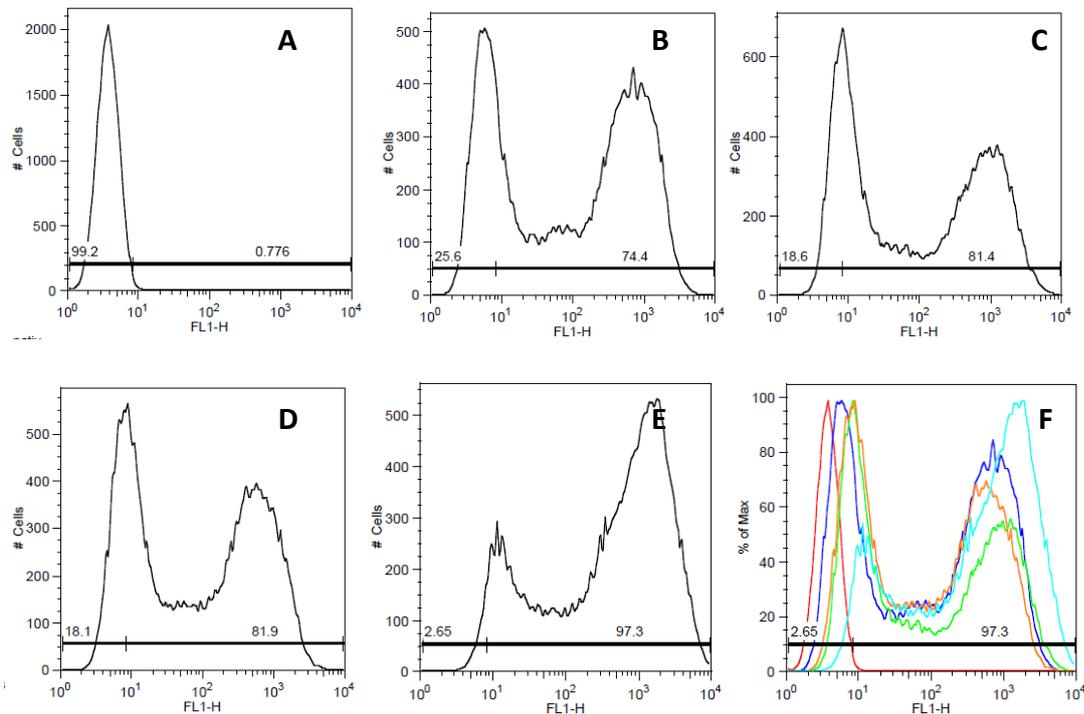


Abb. 13 **FACS-Analyse der mit pLVTHM transduzierten HEK-Zellen zur Kontrolle Infektiösität der VLP:** Im Histogramm ist die Zellzahl gegen GFP emittierenden FL1-Kanal aufgetragen. Das Gate grenzt die GFP-negative und -positive Population ab. **A** Zellpopulation von nativ HEK-Zellen. **B** LVTHM-shRec 1 transduzierte HEK-Zellen **C** LVTHM-shRec 8 transduzierte HEK-Zellen **D** LVTHM-shRec 10 transduzierte HEK-Zellen **E** LVTHM-Leer transduzierte HEK-Zellen **F** Überlagerung aller Graphen von A - E

Bei allen Vektorsystemen konnten eindeutige GFP-Signale von über 74 % ermittelt werden (siehe Abb. 13). Somit lässt sich eine Infektiösität sowie auch eine hohe Transduktionsrate bestätigen. Am höchsten war diese bei dem pLVTHM-Leervektor mit 97 % zu erkennen, was noch einmal gut in Abb. 13 E deutlich wird (LVTHM-Leer blaue Kurve).

3.2.2 Detektion des Rec-Silencing mittels Duplex real time RT-PCR

Da gezeigt wurde, dass die Zellen mit den shRNA-exprimierenden Vektoren zu transduzieren waren, konnte der Silencing-Versuch durchgeführt werden um Effekte auf RNA Ebene zu zeigen. Dazu wurden die HEK 293T in 6-well Platten mit pBSK-oriHERV-K113 (kurz oriHERV) transfiziert und mit den sh-Vektoren co-transfiziert oder den shRNA-pseudotypisierten Lentiviren im Abstand von 24 h co-transduziert (siehe Abb. 14). Der Virusüberstand wurde bei einer Polybrene-Konzentration von 6 µg/mL transduziert und bei 800 g für 1 h spinoculiert, wonach die

Ansätze nach vollbrachte Transfektion bzw. Transduktion 48 h im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert wurden.

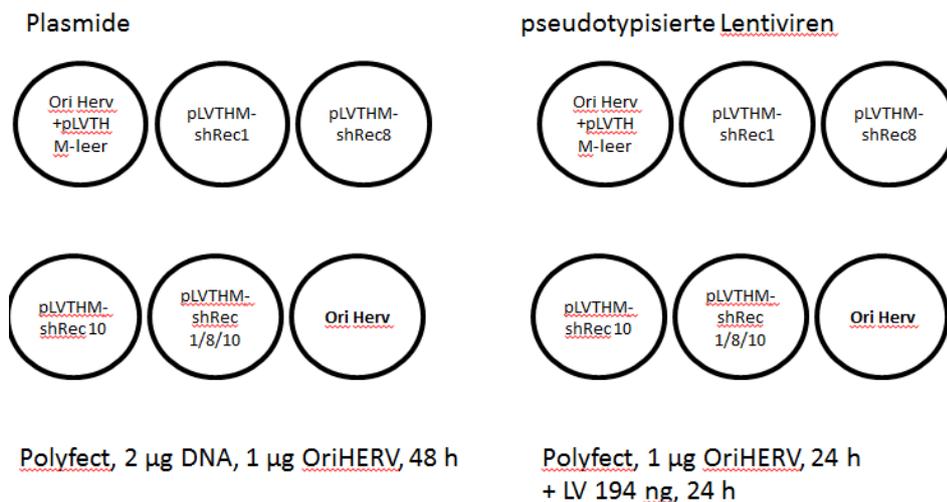


Abb. 14. **Auftragsschema für das Rec-Silencing in einer 6-well Platte:** pBSK-oriHERV-K113 wird in jedes well mit 1 µg transfiziert. Die sh-Vektoren sowohl als Plasmid wie auch pseudotypisierten Lentiviren werden nach obigen Schema co-transfiziert oder co-transduziert

Als Transfektions- bzw. Transduktionskontrolle vor der Lyse der Zellen wurde das exprimierte GFP im Fluoreszenzlicht bei 488 nm angeregt und nachdem eine grüne Fluoreszenz nach 48 h wahrgenommen werden konnte, wurden die Zellen trypsinisiert und die total RNA mittels Kit isoliert.

Da aufgrund der sehr schwachen Expression von Rec in der nicht-codonoptimierten Form ein Gen-Silencing des Rec durch Western Blot oder Immunfluoreszenz zu zeigen nicht praktikabel ist, wurde eine Duplex real time RT-PCR durchgeführt. Dabei wird die Ausgangsmenge er mRNA für das in allen eukaryotischen Zellen exprimierte Houskeeping-Gen GAPDH durch eine spezifische Primer- und Sonden Kombination erfasst und in derselben PCR-Reaktion auch die Ausgangsmenge an Rec-RNA bestimmt. Zellen, in denen Rec stark exprimiert wird, haben ein anderes Verhältnis von GAPDH-RNA zu Rec-RNA wie Zellen, in denen Rec inhibiert wird, da die Menge an GAPDH für alle Ansätze gleich sein soll. Diese wurde anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet.

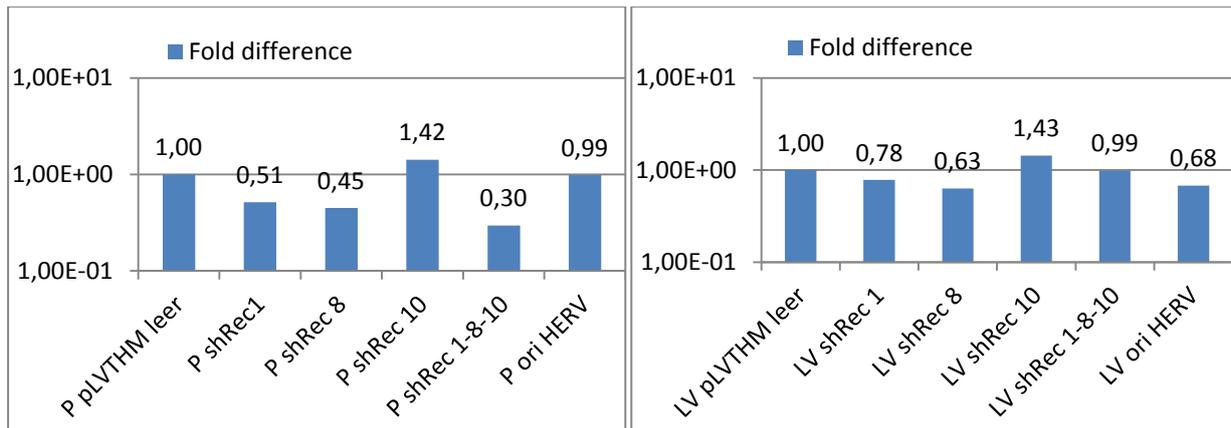


Abb. 15 **Auswertung $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode des Rec-Silencing durch shRNA:** links Graph für die Plasmid transfizierte shRNA und rechts der Graph für die VLP transduzierte shRNA

Alle Proben wurden auf den Kalibrator 100% bezogen. Als Kalibrator wurde die mit pLVTHM-Leervektor transfizierte bzw. LVTHM-Leervektor transduzierte Probe gewählt und bildlich dargestellt (siehe Abb. 15). Dabei sollte es möglichst keine große Differenz zwischen der mock-Probe (nur mit oriHERV transfizierten Zellen) und der mit pLVTHM-Leervektor transfizierte bzw. LVTHM-Leervektor transduzierte Probe zu erkennen sein. Vor allem bei dem viralen Transduktionssystem besteht die Gefahr einer Interferenz zwischen viral eingebrachten Genprodukten mit dem Rec.

Bei dem shRNA-Expressionsplasmid induzierte Rec-Silencing konnte eindeutig ein Knock-down-Effekt durch das pLVTHM-shRec 1-Plasmid und das pLVTHM-shRec 8-Plasmid erzielt werden. Beide bewegen sich dabei um die 50 % Down-Regulation des Rec-Gens und können ihren Effekt sogar bis zu 70 % summieren. Verhältnismäßig zum Kalibrator liegt die Rec-RNA von den pLVTHM-shRec 10 transfizierten Plasmids deutlich über 100%. Somit konnte bei der shRec 10-RNA keine Genstilllegung beobachtet werden.

Die Ergebnisse der VLP-transduzierten shRNAs gleichen verhältnismäßig dem der shRNA-Plasmid Transfektion. Auch hier sind leichte Absenkungen der Rec-Genregulation bei LVTHM 1 und LVTHM 8 zu erkennen. Jedoch wird in den mit single-round LVTHM-Leervektor und LVTHM 10 VLP transduzierte Zellen mehr Rec-RNA exprimiert.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien sowie Primärzellen zu untersuchen ob, ausgehend von einem funktionellen Rec-Gen, eine Überexpression bzw. Herunterregulierung auf Transkriptom- und Proteomebene möglich ist.

4.1 Rec-Überexpression

Dazu wurde für die Überexpression das codonoptimierte oricoRec mit V5-Tag im Vektor pWPXL benutzt. Dieser Vektor besitzt expressionsstarke Promotoren wie EF1a. Aus den Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz wurden erfolgreiche Infektion mit dem pWPXL-oricoRec-V5 Konstrukt offensichtlich. Dabei war wie zu erwarten das Rec-Protein in 293T Zellen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (Hanke et al 2012). Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass auch in den primären Zellen NHEM und OESC Rec ebenso lokalisiert ist. Bei den eukaryotischen Zelllinien HEK und Tera-1 konnten mit geringen Virusmengen, 30 ng quantifizierte p24-Gag-Proteinmenge, Transduktionsraten von circa 7 % erreicht werden. Bei den primären Zellen NHEM (Normal human epidermal melanocyten) und OSEC (Ovarian surface epithelial cells) waren es um die 40 % bei 100 ng eingesetzter, mit p24-ELISA-Assay normalisierten, Virusäquivalent. Sehr gute Transduktionsergebnisse konnten bei den HEK und Tera-1 Zellen bei 900 ng eingesetztem p24-Gag-Proteinäquivalent erzielt werden. Hierbei ergaben sich bis zu 90 % Rec-positive Zellen, was eher bei transfizierter Plasmid-DNA der Fall gewesen war (Hanke 2012, Hanke 2013). Es wäre also denkbar, dass bei steigender Viruslast bei den Primärzellen, eine ebenso hohe Transduktionsrate erzielt werden könnte. Dazu sollten jedoch noch in einer einheitlichen Zelllinie untersucht werden in wie weit eine weitere Erhöhung der Virusmenge mit den Transduktionseffizienz korreliert. Zudem darf eine zelltoxische Konzentration an Virusüberstand nicht überstiegen werden, sofern produzierter Virusüberstand in Primärzellen-ungeeignetem Medium gelagert wird. Ferner müssen das eingesetzte Volumen an Virusüberstand in Bezug zum Aufwand der Ultrazentrifugation betrachtet werden, als auch Überlegungen angestellt werden, ob nicht rein filtrierter Virusüberstand in größeren Volumina nicht dieselben Erfolge mit sich bringt. Jedenfalls stellen die Infektionsversuche im 6-well Format, $3 \cdot 10^5$ Zellen pro well Aussaat, Zusatz von 6 $\mu\text{g/mL}$ Polybrene und 1h Spinoculation bei 800 g eine Basis mit dem pWPXL-oricoRec-V5-Vektor dar. Es ist jedoch zu überlegen, ob der p24-ELISA nicht mit anderen Detektionsmethoden kombiniert werden sollte, um auch eine

Infektiösität und Intaktheit der VLP zu garantieren. Im Vorfeld der Versuche konnte zumindest ein p24-ELISA in Verbindung mit einem RT-Aktivitätstest festgestellt werden, dass die meisten aktiven VLP nach 72 – 96 h vorhanden sind. Nach diesem Zeitraum sollten Zellfunktionen des Syntheseapparates der Zelle eine Genexpression des pseudotypisierten Genoms sichergestellt haben und auch die Zeit zur Reifung der VLP ausreichen. Es können auch weitere Methoden in Betracht gezogen werden, um eine maximale Infektion zu erzielen. Zum Beispiel wie die Magnetofektion, bei der HIV an magnetische Nanopartikel gekoppelt wird und dadurch zum Virus-Zellkontakt gezwungen werden kann. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass in Bezug auf die Infektionsrate es bei HIV kein Unterschied zur Spinoculation gibt (Sacha 2010, Nature Protocols). Auch für Polybrene ist eine optimale Konzentration erreicht. Mehr als 6 mg/mL würde keine weitere Adsorptionssteigerung mit sich bringen. Abhängig von dem Zelltyp könnten aber auch noch andere Polymere wie Poly-L-Lysozin ausprobiert werden (Davis et al 2004).

Bei der FACS-Analyse von dem überexprimierten Rec, zur alternativen Quantifizierung Rec-positiver Zellen, müssten weitere Optimierungsschritte eingeleitet werden. Es konnte zwar gezeigt werden, dass bei der Permeabilisierungsmethode von 0,5 % Saponin nur 5 % weniger V5-Signal aus dem Zellkern detektiert werden konnte als aus dem Cytoplasma, jedoch kann dies auch an unterschiedlichen Expressionsgeschwindigkeiten beider Proben liegen, am Transfektionserfolg als auch an der Zellkonstitution in den verschiedenen Kulturgefäßen. Falls Proben mit fast 100%iger Transduktionsrate wie in der Immunfluoreszenz präsent wären, wäre auch ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal vorhanden um klare Daten zu erhalten. Da das Rec-Protein hauptsächlich im Kern akkumuliert, wurde ein stärkeres Permeabilisierungsreagenz mit Triton-X eingesetzt. Jedoch konnte dabei eine stärkere Streuung der Zellpopulation erkannt werden. Die Signale im Histogramm waren unsauber und auch im Dotplot war die Zellpopulation in Zellgröße und Granularität zerstreut (Diagramm nicht gezeigt). Es bleibt also noch einmal die Aufgabe Zellen mit unterschiedlichen Permeabilisierungsreagenzen zu testen oder Inkubationszeiten mit dem Antikörper zu verlängern. Die Durchflusszytometrie ist ein sensitives Verfahren und sollte für Transduktionsraten, im besten Fall mit einem GFP-Kontrollvektor, zum Einsatz kommen.

Schlussendlich konnte eine Überexpression von Rec festgestellt werden. Nach dem Anschluss an verschiedene Optimierungsmethoden, wären weitere Experimente, wo in welchen Veränderungen auf transkriptioneller und zellulärer Ebene erkennbar werden, interessant. Schon mikroskopisch könnten durch maligne Transformationen intrazelluläre Mikrofilamentstrukturen zerbrechen und Zellen von ihrer epitheloiden oder fibroblastenartigen Form entarten (Morzow

2010). Zellen würden dann nicht mehr wie HEK-Zellen in Monolayern wachsen, sondern durch fehlende Kontaktinhibition traubenförmige Gebilde annehmen wie die Tera-1 Zellen. Durch ein Scale-Up zu DNA- und Proteinexpressions-Microarrays könnten im großen Umfang zum Beispiel sinkende Intergin- und steigende Proteinasegehalte in transformierenden Zellen gemessen werden. dadurch könnte eine maligne Zellveränderung auch auf das Rec zurückgeführt werden (Stengel 2010, Büscher 2006).

4.2 Rec-Silencing

Für das Rec-Silencing wurde mit drei bestehenden shRNA-Konstrukten gearbeitet. Allgemein wird geraten mit mehreren shRNAs, welche sich sequenziell als optimal heraus gestellt haben, zu experimentieren um den Effekt einer Genstillegung zu vergrößern (Mülhardt 2009, Ambion® 2013).

Vor dem Silencing konnten hohe Transduktionsraten durch eine FACS-Analyse bewiesen werden. Dabei erzielte der pLVTHM-Leervektor mit mehr als 15 % eine wesentlich höhere GFP-Positivzellzahl als die shRec-Konstrukte. Dieses Phänomen konnte nicht geklärt werden, Verursacher sind offenbar off-target Effekte. Da sich die Vektoren bis auf die 71 Nukleotide der shRNA-Kassette nicht unterscheiden, bleibt dieser Verdacht unbegründet. Jedoch traten auch bei dem Rec-Silencing gegenteilig erwartete Resultate auf. Oft wurde eine sogar erhöhte Rec-RNA erhalten als herunterregulierte. Es konnte nachgewiesen werden, dass shRec 1 eine genregulierende Funktion einnimmt, wobei im Vergleich zum Kalibrator pLVTHM-Leervektor 50 % Rec-Genstillegung erzielt wurden. Auch im Zusammenspiel mit shRec 8, welche selbst eine 50%ige Herunterregulierung bewirkte, summiert sich der Knock-Down- Erfolg. Nur das shRec 10-Konstrukt zeigte keine Effekte, was jedoch anhand von wenigen Versuchsdurchführungen nicht ausgeschlossen werden kann. Um stabile Datensätze zu bekommen, sollten weitere Durchläufe ausgewertet werden. Das Rec-Silencing in den Primärzellen ist bis dato noch nicht abgeschlossen, jedoch erwies sich schon die Transfektion der empfindlichen Primärzellen als schwierig. NHEM-Zellen, welche mit der sensible Zelllinien konzipierte Attractene Transfektionsreagenz behandelt wurden, brauchte lange Regenerationszeiten, da anscheinend doch hohe Cytotoxizitäten die Zellen schädigten.

Die RNAi-Auswirkungen durch die VLP-shRec induzierte Inhibition waren relativ uneindeutig. Bei vorigen Versuchen (nicht dargestellt) konnte nach 24 h Inkubation nach Transduktion keine Interferenz festgestellt werden. Höchst wahrscheinlich hatte die kurze Zeit von der Infektion

bis hin zur Synthese von Transkripten nicht ausreicht. Bei der zweiten Versuchsdurchführung (siehe Ergebniss) konnte nach 48 h ansatzweise eine verringerte Genexpression wahrgenommen werden. Jedoch war zu jener Zeit das Problem, dass innerhalb der letzten 24 h eine zu hohe Zelldichte im well vorhanden war. Die Zellen könnten durch Kontaktinhibition ihre Zellfunktion eingeschränkt haben und hatten keine weitere Replikationsphase um die sh-Transkripte in ausreichender Menge zu bilden bzw. Zeit um Effekte hervor zu rufen.

Es stellt sich auch die Frage für welchen Zeitraum die RNAi stabil sein kann, ob es transiente oder persistente Auswirkungen hat (Chung 2013). Dazu müssten über einen längeren Zeitraum täglich total RNA Proben entnommen und eine real time RT-PCR angesetzt werden. Zudem reicht nicht nur ein Nachweis der mRNA-Reduzierung, auch auf Proteinebene, zum Beispiel mittels Western Blot, müssen Nachweise erbracht werden, was in vorigen Arbeiten der Arbeitsgruppe noch nicht gelungen ist. Außerdem bleibt immer die Frage in wie weit sich das Genom der Zelle durch den eingeschleusten Vektor verändert und unvorhergesehen Zellaktivitäten hervorgerufen werden.

5 Zusammenfassung

Häufig kommt es in Tumorgeweben zu einer erhöhten Transkript- und Proteinexpression bis hin zu unreifen Partikeln der humanen endogenen Retrovirus und besonders der HERV-K(HML-2)-Familie. Das retrovirale RNA-Transportprotein Rec des HERV-K113 steht dabei im Verdacht an der potentiellen malignen Transformation von Zellen beteiligt zu sein. Bisher konnten Überexpressionen dieses akzessorischen Proteins in Krebszellen wie Melanome oder Ovarialkarzinome sowie Protein-Protein-Interaktionen beobachtet werden, welche zu einer vermehrter Proliferation führten. In dieser Arbeit sollten die Überexpression von Rec in Primärzellen als Modellsystem etabliert werden um zukünftig die Auswirkungen des Proteins auf den Zellmetabolismus sowie die Schritte bis hin zur malignen Transformation untersuchen zu können. Dazu wurde das Rec-Gen mit dem bestehenden lentiviralen Transduktionssystem in die eukaryotischen Zelllinien, primären Melanocyten und Ovarienzellen geschleust. Mittels Immunfluoreszenz konnte wie erwartet im Zellkern lokalisiertes, exprimiertes Rec-Protein detektiert werden, auch bei den hier erstmalig untersuchten primären Zellen. In den HEK-Zellen konnten per Immunfluoreszenz ermittelte Transduktionsraten von 90 % erreicht werden. Die verstärkte Rec-Expression wurde in den Primärzellen NHEM- und OSEC von bis zu 45 % erreicht. Bei den hier getesteten Permeabilisierungs- und Anfärbemethoden konnte exprimiertes Rec im Kern nur unvollständig angefärbt und bei der Durchflusscytometrie der Immunfluoreszenz der HEK-Zellen entsprechende Ergebnisse erlangt werden. Zur weiteren Testung der Methode wurden Versuche mit einer Mutante des HIV-1 Rev Proteins durchgeführt, bei der die Lokalisation durch Mutation der Kernimport bzw. -export vorgegeben war. Im Gegensatz zu dem gleich erwarteten Detektionssignal, wurde waren 5 % Unterschied zu verzeichnen.

Nach der Demonstration der induzierten Rec-Überexpression sollte mittels shRNA-Vektoren die Rec-Expression ausgehend von einem Vollängen-Molekularklon von HERV-K113 durch RNA-Interferenz herunter reguliert werden. Der Knockdown-Effekt wurde mit einer Duplex real time RT-PCR gemessen. Dabei konnten erfolgreich, nach Transfektion der entsprechenden Plasmide, zwei von drei shRNA-Konstrukten die Rec-Expression bis zu 50 % ausschalten. Zusammen summierte sich dieser Effekt sogar zu 70 % Rec-Silencing. Im Gegensatz dazu konnte nach Transduktion von pseudotypisierten Partikeln, welche mit den sh-Konstrukten ausgestattet waren, kein eindeutiges Gen-Silencing gezeigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass durch ein lentivirales Transduktionssystem das Rec-Protein in Primärzellen überexprimiert werden kann. Das Herunterregulieren durch shRNA konnte bei-

spielsweise in Zelllinien gezeigt werden und sollte nach Optimierung der Transduktion in primären Zellen genauso möglich sein. Dadurch könnten auf Transkriptom- und Proteom-Ebene andere Proteine bzw. Onkogene untersucht werden und welchen Einfluss sie bei der Regulation von Rec spielen. Somit könnten weitere Interaktionspartner des Rec entdeckt und seine Funktion besser verstanden werden.

6 Abstract

Especially in germ cell tumors the transcription and expression of human endogenous retrovirus of the HERV-K(HML-2) is upregulated. The accessory RNA export adapter protein Rec may play a not unimportant role of inducing carcinoma. However Rec expression was found in melanoma and ovarian cancer and it could be shown that there are several protein-protein-interactions with other metabolic proteins which initiate a higher cell proliferation.

To create a model of Rec mediated changes in cell metabolism in primary cells, a lentiviral transduction system was used to overexpress Rec in primary cells such like melanocytes and ovarian epithelia cells. HEK 293 and Tera-1 cell lines were included as controls. Like expected, by immunofluorescence Rec-protein located in nucleoli was detected in all tested cell types, whereas 90 % of HEK and Tera-1 cells got transduced and almost 45 % of both primary cells. The detection of Rec in the sensitive flow cytometer was not comparable to immunofluorescence data, maybe due to ineffective permeabilization of the nucleus membrane.

To suppress Rec expression RNAi technique was used. Three shRNA expression plasmids were transfected in 293T cells together with a full length molecular clone of HERV-K113 and two of them showed knockdown efficiency of 50 %, respectively, whereas in combination 70 % silencing could be achieved. Gen-silencing induced by Virus-like-particle constructed with the shRNA expression could not be detected.

In conclusion, it was shown that overexpression of Rec in cell lines as well as in primary cells is possible and that Rec expression at least in 293T cells can be inhibited by shRNA. With further optimization this approach can be used to understand the influence of HERV in cell metabolism and the way of malign transformation.

7 Literaturverzeichnis

- ©EPFL (2010). URL: <http://tcf.epfl.ch> (zuletzt aufgerufen am 22.11.2013)
- ambion® © 2014 Thermo Fisher Scientific Inc. (2014) URL: <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/rnai.html> (zuletzt aufgerufen am 24.02.2014).
- Baltimore, D. (1985): Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell*. 1985 Mar;40(3):481-2.
- Bannert, N., Kurth, R. (2004): Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14572-9. Epub 2004 Aug 13.
- Bannert, N., Kurth, R. (2011): Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses, *Int. J Cancer*: 126, 306-314
- Beimforde, N., Hanke, K., Ammar, I., Kurth, R., Bannert, N. (2007): Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology*. 2008 Feb 5;371(1):216-25. doi:10.1016/j.virol.2007.09.036.
- Bittner, J. J. (1936): some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*. 1936 Aug 14;84(2172):162.
- Boller, K., Schönfeld, K., Lischer, S., Fischer, N., Hoffmann, A., Kurth, R., Tönjes, R. (2008): Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *Journal of General Virology* (2008), 89, 567–572 DOI 10.1099/vir.0.83534-0.
- Büscher, K. et al (2005): Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. *Cancer Res* 2005;65:4172-4180.
- Büscher, K. et al. (2006): Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas und melanoma cell lines. *Melanoma Res* 16(3):223.doi:10.1097/01.cmr.0000215031.07941.ca
- Cegolon, L. et al (2013): Human endogenous retroviruses and cancer prevention: evidence and prospects. *BMC Cancer*. 2013 Jan 3;13:4. doi: 10.1186/1471-2407-13-4.
- Chudak C, Beimforde N, George M, Zimmermann A, Lausch V, Hanke K, Bannert N (2013): Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2) *Retrovirology*. 2013 Nov 19;10:140. doi: 10.1186/1742-4690-10-140.

- Chung, H.-C. et al (2013): Inhibition of porcine endogenous retrovirus in PK15 cell line by efficient multitargeting RNA interference. *Transpl Int.* 2014 Jan;27(1):96-105. doi: 10.1111/tri.12219. Epub 2013 Nov 25.
- Coffin et al. (1997): *Retroviruses*. Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Davis et al (2004): Charged Polymers Modulate Retrovirus Transduction via Membran Charge Neutralization and Virus Aggregation. *Biophys J.* Feb 2004; 86(2): 1234–1242.
- Denne, M. et al (2007): Physical and Functional Interactions of Human Endogenous Retrovirus Proteins Np9 and Rec with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. *JOURNAL OF VIROLOGY*, June 2007, p. 5607–5616, doi:10.1128/JVI.02771-06.
- Elena Cherkasova, E., Weisman, Q., Childs, R. W. (2013): Endogenous retroviruses as targets for antitumor immunity in renal cell cancer and other tumors. *Front Oncol.* 2013 Sep 17;3:243. eCollection 2013.
- Fletcher, H. (2013): *Genetik für Biologen, Biochemiker, Pharmazeuten und Mediziner*. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim.
- Fuchs, G., Schlegel, H. G. (2007): *Allgemeine Mikrobiologie*, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Fuchs, N. V. et al (2013a): Human endogenous retrovirus K (HML-2) RNA and protein expression is a marker for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Retrovirology.* 2013 Oct 24;10:115. doi: 10.1186/1742-4690-10-115.
- Fuchs, N. V. et al (2013b): Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promoter Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3. *J Virol.* 2011 Apr;85(7):3436-48. doi: 10.1128/JVI.02539-10. Epub 2011 Jan 19.
- Galli, U. M. ; Sauter, M. ; Lecher, B. ; Maurer, S. ; Herbst, H. ; Roemer, K. ; Mueller-Lantzsch, N.: Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. In: *Oncogene* 24 (2005), Apr, S. 3223–3228
- Gallo et al (1982): Human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) is in T but not B Lymphocytes from a patient with cutaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1982; 79(18): 5680–5683. PMID: PMC346968
- Gallo R. C. (2005): The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology.* 2005; 2: 17. doi: 10.1186/1742-4690-2-17

- George R. Young, G- R., Stoye, J. P., Kassiotis, G. (2013): Are human endogenous retroviruses pathogenic? An approach to testing the hypothesis. *Bioessays*. 2013 Sep;35(9):794-803. doi: 10.1002/bies.201300049. Epub 2013 Jul 17.
- Gonzalez-Hernandez, M. J. et al (2012): Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K (HML-2) Is Activated by the Tat Protein of HIV-1. *J Virol*. 2012 Aug;86(15):7790-805. doi: 10.1128/JVI.07215-11. Epub 2012 May 16.
- Graw, J. (2006): *Genteik*. 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Griffith, D. J. (2001): Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol*. 2001;2(6):REVIEWS1017. Epub 2001 Jun 5.
- Hanke et al. (2013): The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). *Int. J. Cancer*: 132, 556-567
- Hanke, K. (2010): *Dissertation Funktionelle Charakterisierung der HERV-K Proteine Env und Rec*, Berlin.
- Hanke et al (2013): Staufen-1 Interacts with the Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML-2) Rec and Gag Proteins and Increases Virion Production, *J. Virol. October 2013* 87:20. doi: 10.1128/JVI.03031-12. Epub 2013 Aug 7.
- Hohn et al. (2013): HERV-K(HML-2), the best preserved family of HERVs: endogenization, expression, and implications in health and disease. *Frontiers in oncology* doi: 10.3389/fonc.2013.00246
- Holtmann, H. et al (2008): *Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene*. 1. Auflage, © Elsevier GmbH, München.
- Hughes, J. F. and Coffin, J. M. (2001) Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat. Genet* **29**, 487–489
- Hughes, J., Coffin, J. M. (2001): Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat Genet*. 2001 Dec;29(4):487-9.
- Klug, W. et al (2007): *Genetik*. 8. Auflage, Pearson Studium, München.
- Knippers, R. (2006): *Molekulare Genetik*. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M. and FitzHugh, W. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921

- Li, Z.-G. et al (2013): Knockdown of Porcine Endogenous Retroviruses by RNA Interference in Chinese Experimental Miniature Pig Fibroblasts. *Transplant Proc.* 2013 Mar;45(2):748-55. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.03.068.
- Löwer R., Tönjes R. R., Korbmacher C., Kurth R., Löwer J. (1995): Identification of a Rev-Related Protein by Analysis of Spliced Transcripts of the Human Endogenous Retroviruses HTDV/HERV-K, *J Virol.* 1995 Jan;69(1):141-9.
- Löwer, R. (1999): The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol.* 1999 Sep;7(9):350-6.
- Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R. (1996): Review: The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
- Mayer, J., Ehlhardt, S., Seifert, M., Sauter, M., Müller-Lantzsch, N., Mehraein, Y., Zang, K.-D. and Meese, E. (2004) Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. *Virology* **322**, 190–198
- Modrow et al. (2010): *Molekulare Virologie*, 3.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Montagnier et al (1983): Isolation of a T-lymohotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983 May 20;220(4599):868-71.
- Moyes, D. L. et al. (2005): The distribution of the endogenous retrovirus HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics* Volume 86, Issue 3.
- Mülhardt, C. (2009): *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlaug, Heidelberg.
- Mullins C. S., Linnebacher M. (2012): Human endogenous retroviruses and cancer: Causality and therapeutic possibilities. *World J Gastroenterol* 2012 November 14; 18(42): 6027-6035, doi:10.3748/wjg.v18.i42.6027
- Munk, K. (2001): *Grundstudium Biologie Genetik*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg · Berlin.
- Ringo, J. (2006): *Genetik kompakt*. 1. Auflage, © Elsevier GmbH, München.
- Ruggieri, A., Maldener, E., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Meese, E., Fackler, O. T., Mayer, J. (2009): Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) encodes a stable

- signal peptide with biological properties distinct from Rec Retrovirology 2009, 6:17
doi:10.1186/1742-4690-6-17
- Ruprecht, K., Ferreira, H., Flockerzi, A., Wahl, S., Sauter, M., Mayer, J., Mueller-Lantzsch, N. (2008): Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML-2) RNA Transcripts Are Selectively Packaged into Retroviral Particles Produced by the Human Germ Cell Tumor Line Tera-1 and Originate Mainly from a Provirus on Chromosome 22q11.21. JOURNAL OF VIROLOGY, Oct. 2008, p. 10008–10016, doi:10.1128/JVI.01016-08.
 - Sacha et al (2010): Synchronous infection of SIV and HIV in vitro for virology, immunology, and vaccine-related studies. Nat Protoc. 2010; 5(2): 239–246. doi: 10.1038/nprot.2009.227
 - Schmitt, K. (2013): Transcriptional Profiling of Human Endogenous Retrovirus Group HERV-K(HML-2) Loci in Melanoma. Genome Biol Evol. 2013;5(2):307-28. doi: 10.1093/gbe/evt010.
 - Stengel S. et al (2010): Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. Genes Chromosomes Cancer. 2010 May;49(5):401-11. doi: 10.1002/gcc.20751.
 - Sternberg et al. (2012): Dissertation Prävalenzen der humen endogenen Retroviren K113 und K115 bei Patienten mit akuter/chronischer Leukämie. Berlin.
 - Stoye, J. P. (2001): Endogenous retroviruses: Still active after all these years?. Curr Biol. 2001 Nov 13;11(22):R914-6.
 - Stoye, J. P. et al (2000): Endogenous retroviruses and the human germline. Curr Opin Genet Dev. 2000 Dec;10(6):651-5.
 - Subramanian, R.P. et al. (2011): Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K(HML-2) group of human endogenous retrovirus. Retrovirology 8:90. Doi:10.1186/1742-4690-8-90.
 - Turner, G., Barbulescu M., Su M., Jensen-Seaman, M. I., Kidd K. K., Lenz, J. (2001): Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. Curr Biol. 2001 Oct 2;11(19):1531-5.
 - van der Kuyl, A. C. (2012): HIV infection and HERV expression: a review. Retrovirology. 2012 Jan 16;9:6. doi: 10.1186/1742-4690-9-6.

-
- Wang-Johanning, F. (2007): Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian Cancer. *Int J Cancer* 120(1):81-90. Doi 10.1002/ijc.22256
 - Wang-Johanning, F. et al (2006): Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*: 120, 81–90 (2006) Wiley-Liss, Inc.
 - Wink, M. (2004): *Molekulare Biotechnologie, Konzepte und Methoden*. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim.
 - Zwolin´ska, K. (2013): Frequency of Human Endogenous Retroviral Sequences (HERV) K113 and K115 in the Polish Population, and Their Effect on HIV Infection. *PLoS One*. 2013 Oct 28;8(10):e77820. doi: 10.1371/journal.pone.0077820. eCollection 2013.