

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Robert Koch-Institut
FG 18: HIV und andere Retroviren



seit 1558

**Nachweis von HERV-K(HML-2) Proteinen und RNAs in der
HMM APOBEC3G Granula**

**Detection of HERV-K(HML-2) proteins and RNAs in the
HMM APOBEC3G granules**

Masterarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Master of Sciences

vorgelegt von

Adriana Block

aus Pasewalk

Jena, Dezember 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Hube

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
Zusammenfassung	12
Abstract	13
1. Einleitung.....	15
1.1 Retroviren	15
1.2 Einteilung der transposablen Elemente	16
1.3 HERV-K(HML-2)-Familie	17
1.4 Der Aufbau eines HERV-K(HML-2) Virus	19
1.5 Retroviraler Infektions-/ Proliferationszyklus	20
1.6 Viraler RNA-Transport bei HERV-K(HML-2)	23
1.7 APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3)	25
2. Zielstellung	28
3. Material.....	29
3.1 Konstrukte	29
3.2 Primer	30
3.3 Restriktionsenzyme	30
3.4 Chemikalien/Enzyme/Größenstandards	30
3.5 Antikörper.....	32
3.6 Kits.....	32
3.7 Geräte	32
4. Methoden.....	33
4.1 Nukleinsäureanalytik	33
4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	33
4.1.2 Restriktionsansätze mit Endonukleasen.....	35
4.1.3 DNA-Agaroseelektrophorese	35
4.1.4 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten	35
4.1.5 Ligationsansatz.....	35
4.1.6 Transformation.....	36
4.1.7 Plasmidisolierung.....	36
4.1.8 Konzentrationsbestimmung.....	37
4.1.9 Sequenzierung.....	37

4.2 Zellkultur-Technik	37
4.2.1 Zellkultivierung	37
4.2.2 Transfektionsansätzen	38
4.2.3 Stress-Reaktion mit Natriumarsenit	39
4.3 Aufreinigung der APOBEC3G Granula	39
4.3.1 Zellyse	39
4.3.2 Tandem Affinitätsaufreinigung eines zellulären Proteinkomplexes	40
4.3.3 Immunpräzipitation des Rec-V5 Proteins	41
4.4 Nachweis von APOBEC3G Protein	41
4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
4.4.2 Western Blot	42
4.5 Nachweis der tagged oriHERV-K113-RNA	42
4.5.1 DNase-Verdau	43
4.5.2 RNA-Extraktion	43
4.5.3 Entwicklung eines RT-qPCR-System zum Nachweis von tagged oriHERV-K113	43
4.6 Einfluss von APOBEC3G auf die Partikelproduktion	45
4.6.1 Ultrazentrifugation (UZ)	45
4.6.2 p27 ELISA	46
5. Ergebnisse	47
5.1 Klonierung des pNTAP-A3G Vektors	47
5.2 Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP) von modifiziertem APOBEC3G Protein	48
5.2.1 Spezifische Aufreinigung des modifizierten APOBEC3G Proteins mittels Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP)	49
5.2.2 Spezifitätsanalyse des APOBEC3G Antikörpers gegenüber HEK-293T-Zellysaten	52
5.2.4 Nachweis von APOBEC3G in TAP-Überständen aus HEK-293T- und Tera-1-Zellen	53
5.2.3 Nachweis von Staufen-1, Rec und G3BP als Bestandteil der HMM APOBEC3G Granula	56
5.3 Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zum Nachweis von tagged oriHERV-K113 in der HMM APOBEC3G Granula	58
5.3.1 Bindespezifität der verschiedenen HERV-K113 Primerkonstellationen ..	58
5.3.2 Effizienzanalyse der tagged oriHERV-K113 Primerpaare	59
5.3.3 Ermittlung des HERV-K113 Hintergrundsignals in HEK-293T- und Tera-1-Zellen	60

5.3.4 Quantitativer Nachweis von HERV-K(HML-2) RNAs in der HMM APOBEC3G Granula von HEK-293T-Zellen	60
5.3.5 Quantitativer Nachweis von HERV-K(HML-2) RNA in der HMM APOBEC3G Granula in Tera1-Zellen.....	64
5.4 Einfluss von APOBEC3G auf die HERV-K113 Partikel-produktion	67
6. Diskussion	69
Literaturverzeichnis.....	74
Selbstständigkeitserklärung	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Retroviren.....	15
Abbildung 2: Klassifizierung der transposablen Elemente.....	16
Abbildung 3: Darstellung der Vor- wie Nachteile von HERVs für den Wirt.....	17
Abbildung 4: Darstellung der Knospung von viralen HERV-K113 Partikeln.....	18
Abbildung 5: Aufbau eines reifen Betaretrovirus	19
Abbildung 6: Darstellung des viralen Replikationszyklus von Retroviren.....	20
Abbildung 7: Darstellung der proviralen Sequenz von HERV-K(HML-2) und daraus resultierende Transkripte	21
Abbildung 8: Proliferationsmechanismus von endogenen Retroviren (ERVs)	22
Abbildung 9: Einfluss von Staufen-1 auf den Rec vermittelten RNA-Transport von nicht bzw. teilweise gespleißter RNA	24
Abbildung 10: Darstellung der antiviralen Wirkungsweise des humanen APOBEC3G Proteins	26
Abbildung 11: Darstellung der Genstruktur des tagged oriHERV-K113-Provirus.....	29
Abbildung 12: Darstellung des pNTAP-Klonierungsvektor	33
Abbildung 13: Workflow eines Tandem Affinitätsaufreinigungs (TAP)-Systems	40
Abbildung 14: Darstellung des tagged oriHERV-K113 Plasmids mit den verwendeten Primern für die qRT-PCR.....	43
Abbildung 15: Klonierung des pNTAP-A3G Vektors.....	47
Abbildung 16: Darstellung eines Coomassie-gefärbten Proteingels für die Ansätze 1 und 4	49
Abbildung 17: Darstellung eines Coomassie-gefärbten Proteingels für die Ansätze 2 und 3	50
Abbildung 18: Darstellung eines Coomassie-gefärbten Proteingels für den Ansatz 5	51
Abbildung 19: Darstellung der Spezifität des APOBEC3G Antikörpers gegenüber den verschiedenen HEK-293T-Zelllysaten	52
Abbildung 20: Darstellung der APOBEC3G Western-Blot Ergebnisse für die Ansätze 1 bis 5 von den HEK-293T TAP-Überständen.....	53
Abbildung 21: Darstellung der APOBEC3G Western-Blot Ergebnisse für die verschiedenen Tera-1 Ansätze nach der finalen Calmodulin Eluierung (TAP)	54
Abbildung 22: Darstellung der Staufen-1, Rec-V5 und G3BP Western-Blot Ergebnisse für den Ansatz 1 während der Tandem Affinitätsaufreinigung aus den HEK-293T-Zellen	56

Abbildung 23: Darstellung der Spezifität von den verschiedenen Primerkonstellationen an oriHERV-K113 und tagged oriHERV-K113.....	58
Abbildung 24: grafische Darstellung der Mittelwerte der normierten Kopienzahl/ μ l mit Angabe des Standardfehlers für HEK-293T-Zellen	63
Abbildung 25: grafische Darstellung der Mittelwerte der normierten Kopienzahl/ μ l mit Angabe des Standardfehlers für die Tera-1-Zellen.....	66
Abbildung 26: Darstellung der Konzentration HERV-K113 Partikeln bei unterschiedlichen APOBEC3G Konzentration in den HEK-293T-Zellen.....	67
Abbildung 27: Rec/Staufen 1 Co-Lokalisation in HMM APOBEC3G Granula	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Konstrukte.....	29
Tabelle 2: verwendete Primer	30
Tabelle 3: verwendete Restriktionsenzyme.....	30
Tabelle 4: verwendete Chemikalien, Enzyme und Größenstandards	31
Tabelle 5: verwendete Antikörper	32
Tabelle 6: verwendete Kits.....	32
Tabelle 7: verwendete Geräte.....	32
Tabelle 8: Ansatz für die PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase	34
Tabelle 9: Ansatz für die PCR mit der HotStar Taq-DNA-Polymerase.....	34
Tabelle 10: Restriktionsansatz mit Endonukleasen	35
Tabelle 11: Ligationsansatz	36
Tabelle 12: Zusammensetzung LB-Medium.....	36
Tabelle 13: Sequenzierungsansatz.....	37
Tabelle 14: verwendete Zellzahlen	38
Tabelle 15: Transfektionsansatz mit der Calciumphosphat-Methode	38
Tabelle 16: Zusammensetzung der 2xHBS-Lösung	39
Tabelle 17: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.....	42
Tabelle 18: Ansatz für die qRT-PCR.....	44
Tabelle 19: Ansatz für die Duplex-RT-qPCR.....	45
Tabelle 20: Ansatz für die Transfektion von den HEK-293T- und den Tera-1-Zellen	48
Tabelle 21: Darstellung der Ergebnisse für die tagged oriHERV-K113 Standardreihe im Konzentrationsbereich von 10^3 bis 10^6 Kopien/ μ l für die verschiedenen Primerkonstellationen	59
Tabelle 22: Fluoreszenz-CT-Wert für das HERV-FAM und GAPDH-HEX Signal für die zelluläre RNA aus den HEK-293T- und den Tera-1-Zellen.....	60
Tabelle 23: Duplex RT-qPCR der tagged oriHERV-K113 RNA aus 4 unabhängigen TAP HMM APOBEC3G Aufreinigungen.....	61
Tabelle 24: Ermittlung der quantitativen Unterschiede im HERV-K(HML-2) RNA Levels in der HMM APOBEC3G Granula aus den HEK-293T-Zellen	62
Tabelle 25: Ergebnisse der Duplex RT-qPCR der tagged oriHERV-K113 RNA aus 2 unabhängigen TAP HMM APOBEC3G Aufreinigungen aus den Tera1-Zellen	64
Tabelle 26: Darstellung der quantitativen Unterschiede der HERV-K113 RNA Levels in der HMM APOBEC3G Granula aus den Tera-1-Zellen	65

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A. bidest	Aqua bidestillata
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom; „acquired immune deficiency syndrome“
APOBEC3	„Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like“
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Kapsid
ca.	circa
CFP	cyanblau fluoreszierendes Protein
CMV	Cytomegalovirus
d. h.	das heißt
ddNTP	2`3`-dideoxy-Nukleotidtriphosphat
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env	Hüllprotein, „envelope protein“
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
G	Guanin
Gag	gruppenspezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
GTP	Guanintriphosphat
G3BP	„Ras-GTPase-activating protein-binding protein“
HEK-293T-Zellen	humane embryonale Nierenkarzinomzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)piperaziny)-ethansulfonsäure

HERV	humanes endogenes Retrovirus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HML	human MMTV-like
HMM	„high molecular mass“
HRP	Meerrettichperoxidase
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IN	Integrase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	„lysogeny broth“
LINE	lange, verteilte Nukleotidelemente, „long-terminal interspersed elements“
LMM	„low molecular mass“
LTR	„long terminal repeat“
M	molar
MA	Matrixprotein
MMTV	mouse mammary tumour virus
mol	Maßeinheit für die Stoffmenge
mRNA	messengerRNA
NC	Nukleokapsidprotein
NES	Kernexportsignalsequenz
NLS	Kernimports signalsequenz
p. A.	analysenrein
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase/RT/RNaseH
Pro	Protease
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative real time-PCR
RanBP1	Ran-Bindeprotein-1
RBD	RNA-binde Domäne
Rec	Regulator of Expression encoded by cOFR
Rev	Regulator of Expression of Virion proteins
RNA	Ribonukleinsäure

RNP	Ribonukleoprotein
RRE	„rev responsive element“
RT	reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitative reverse Transkriptions-PCR
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”
SINE	kurze, verteilte Nukleotidelemente, „short interspersed elements“
SU	Oberflächenglykoprotein
T	Thyrosin
TAP	Tandem Affinitätsaufreinigung
Taq	Thermophilus aquaticus
TBD	Tubulin-bindende Domäne
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tera-1	Teratokarzinom-Zellen
T _m	Schmelztemperatur
TM	transmembranäre Domäne
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
Vif	„viral infectivity factor“
VLP	virus-like particle
VPr	virales Protein
WT	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Etwa 8% des menschlichen Genoms bestehen aus Sequenzen von humanen endogenen Retroviren (HERV). Ein Provirus, das für alle viralen Proteine einen vollständig offenen Leserahmen besitzt, ist HERV-K113 aus der HERV-K(HML-2) Familie. HERVs werden in gesunden Zellen epigenetisch kontrolliert, können aber in einigen Tumoren und Autoimmunerkrankungen reaktiviert werden und virale Partikel bilden. In diesem Zusammenhang wird eine kausale Rolle dieser Viren bei der Entstehung und Progression dieser Erkrankungen diskutiert.

Bei der Transkription des Provirus im Zellkern werden Vollängen-RNAs gebildet, von denen ein Anteil gespleißt wird. Das akzessorische Protein Rec von HERV-K(HML-2), welches aus einer vollständig gespleißten RNA synthetisiert wird, ist zusammen mit dem zellulären Staufen-1 Protein am Transport der nicht bzw. teilweise gespleißten viralen RNA-Transkripte aus dem Zellkern in das Zytoplasma beteiligt. Der Staufen-1/Rec-Ribonukleoproteinkomplex wird im Zellkern gebildet und ins Zytoplasma zum Ort der Proteinsynthese bzw. Partikelbildung transportiert. In einer zellulären Stresssituation fusioniert dieser Komplex wahrscheinlich mit den APOBEC3G Proteinen und bildet die sogenannte HMM APOBEC3G Granula.

In dieser Arbeit wurden zunächst mit APOBEC3G direkt oder indirekt assoziierte Proteine erfolgreich aufgereinigt. HMM APOBEC3G Granula besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und RNAs. Als APOBEC3G assoziierte Proteine wurden G3BP, Staufen-1 und das Rec Protein von HERV-K113 nachgewiesen. Die Co-Aufreinigung von G3BP legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Stressgranula handelt, da G3BP ein Stressgranula assoziiertes-Protein ist. Die Co-Aufreinigung von Rec und Staufen-1 mit APOBEC3G bestätigt zudem kürzlich publizierte subzelluläre Co-Lokalisationsdaten, die alle drei Proteine in der Stressgranula zeigen. Darüber hinaus ist dies eine weitere Evidenz für eine Verbindung zwischen dem Rec-assoziierten RNA-Transport und der HMM APOBEC3G Granula. Diese Hypothese wird durch Experimente zur Detektion vom HERV-K(HML-2) RNA in den APOBEC3G-Präzipitaten in dieser Arbeit erhärtet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch zusätzliche Transfektion von Rec eine erhöhte Präsenz von HERV-K(HML-2) RNA in der HMM APOBEC3G Granula erreicht werden kann.

Es konnte außerdem zum ersten Male gezeigt werden, dass durch ektopische APOBEC3G Expression die HERV-K113 Partikelproduktion verringert wird. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass der HMM APOBEC3G Restriktionsmechanismus auch gegenüber humanen endogenen Retroviren wirksam ist. Durch die Bin-

derung der viralen RNAs in der HMM APOBEC3G Granula steht diese nicht mehr für die Proteinsynthese bzw. Partikelproduktion zur Verfügung. Das führt zu einer Verringerung der gebildeten Viruspartikel und könnte so einen Schutzmechanismus vor Re-Infektion und Re-Integration darstellen.

Abstract

Human endogenous retrovirus sequences (HERV) represent about 8 % of the human genome. The HERV-K113 provirus belongs to the HERV-K(HML-2) family and contains an open reading frame for all viral proteins. HERVs control epigenetically in healthy cells. However, they can reactivate in some tumors and autoimmune diseases and can produce viral particle. In this context a causal role of these viruses in the formation and progression of tumors is discussed.

The provirus has been transcribed into full-length RNA and a certain percentage of the transcripts can spliced. The accessory protein Rec from HERV-K(HML-2) is synthesized from a totally spliced RNA transcript. In conjunction with Staufen-1, Rec is involved in the transport of not or partially spliced RNA transcripts from nucleus to cytoplasm. The Staufen-1/Rec ribonucleoparticle (RNP) formation occurs in the nucleus and is transported into the cytoplasm to a place of protein synthesis or particle formation. In a cellular stress situation this complex can be combined with the APOBEC3G protein and forms HMM APOBEC3G granules.

First of all, APOBEC3G in conjunction with direct or indirect associated proteins were successfully purified. HMM APOBEC3G granules consist of a multitude of proteins or RNAs. G3BP, Staufen-1 and Rec protein from HERV-K113 were detected as APOBEC3G associated proteins. The co-purification of G3BP indicated that these are stress granules because G3BP is a stress granule associated protein. The co-purification of Rec and Staufen-1 with APOBEC3G confirm the recent published subcellular co-localization studies that all three proteins are exist in stress granules. In addition, this is a further evidence for the connection between Rec associated RNA transport and HMM APOBEC3G granules. This hypothesis is confirmed by an experiment in this project because HERV-K(HML-2) RNA were detected in the HMM APOBEC3G granules. Furthermore it has been shown that with an additionally transfection of Rec, the presence of HERV-K(HML-2) RNA in the HMM APOBEC3G granules can be increased.

Studies have shown for the first time that with an ectopic expression of APOBEC3G the HERV-K113 particles decline. This indicates that the HMM APOBEC3G re-

striction mechanism is also effective against human endogenous retroviruses. Since the viral RNA is bound in the HMM APOBEC3G granules it is no longer disposable for protein synthesis or particle formation. This leads to a reduction of formed virus particles and might be protective against re-infection and re-integration.

1. Einleitung

1.1 Retroviren

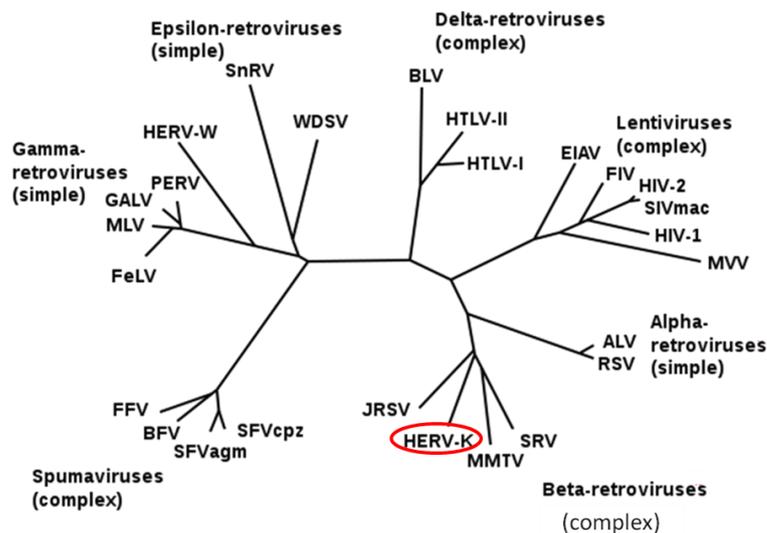


Abbildung 1: Einteilung der Retroviren: Rot markiert ist HERV-K, dass in die Gruppe der β -Retroviren eingeordnet wird. [24]

Nach dem „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) werden Retroviren in zwei Unterfamilien (Orthoretrovirinae und Spumaretrovirinae) unterteilt, wobei die Lentiviren sowie die α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren zu den Orthoretrovirinae und die Spumaviren zu den Spumaretrovirinae gehören [73].

Einige der Retroviren können bei Menschen und Tieren Infektionskrankheiten hervorrufen. Der wohl bekannteste Vertreter ist das Humane Immundefizienz Virus (HIV-1/HIV-2), welches der Erreger des erworbenen Immunschwäche Syndroms (AIDS) ist. Das HI-Virus wurde erstmals von Montagnier in den 1980er Jahren isoliert und gehört zur Gruppe der Lentiviren. [35]

Andererseits können Retroviren auch Tumorerkrankungen auslösen. Erstmals hat John J. Bittner 1936 das „Mouse Mammary Tumour Virus“ (MMTV), das zur Gruppe der β -Retroviren gehört, mit malignen Milchdrüsenerkrankungen bei Mäusen in Verbindung gebracht [34]. Ein weiteres bekanntes Beispiel ist das Humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ-1 (HTLV-1), das zur Gruppe der δ -Retroviren gehört und erstmals in den 1980er Jahren von Robert C. Gallo isoliert und identifiziert wurde [36]. Dieses Virus steht im Zusammenhang mit Erkrankungen wie eine adulte T-Zell-Leukämie oder chronischer Paraparese [36].

Außerdem wurde entdeckt, dass neben exogenen Retroviren auch endogene Formen ausgebildet werden, d. h., dass Retroviren menschliche Keimbahnzellen infi-

ziert und sich ins menschliche Genom der Keimbahnzellen integriert haben [25]. Diese integrierte virale Sequenz wird als Provirus bezeichnet. Dadurch kann das integrierte Virus vertikal auf die Nachkommen als humanes endogenes Retrovirus (HERV) weitervererbt werden, sodass jede Körperzelle das Virus trägt [25]. Endogenisierungen konnten für alle Retrovirusgruppen (α -, β -, γ -, δ -, ε -Retroviren, lenti- und spuma-artige Retroviren) gefunden werden [71]. Das humane endogene Retrovirus K gehört bspw. zu der Gruppe der β -Retroviren (siehe Abbildung 1).

1.2 Einteilung der transposablen Elemente

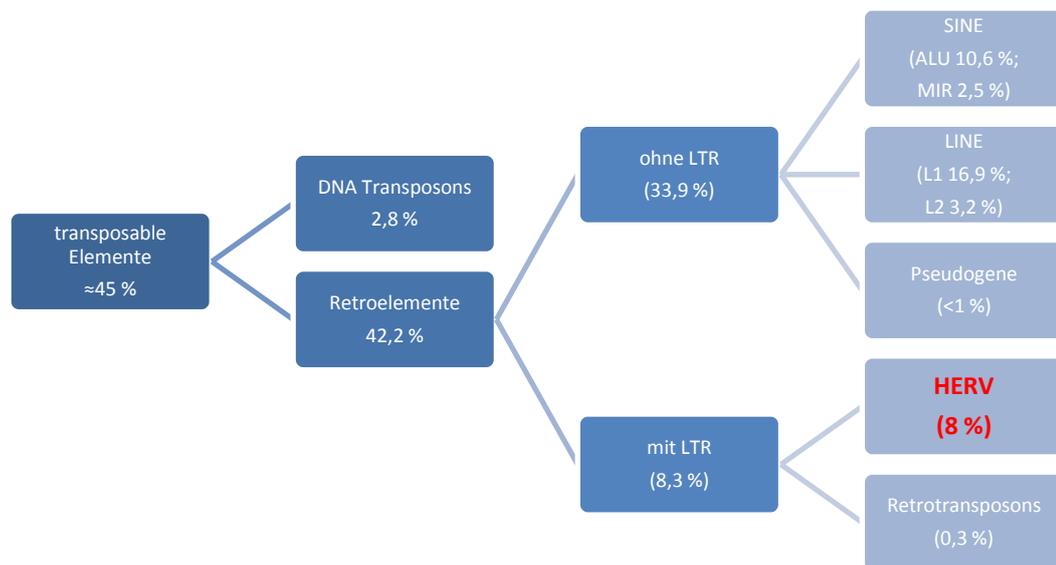


Abbildung 2: Klassifizierung der transposablen Elemente mit den jeweiligen Häufigkeiten ihres Vorkommens im menschlichen Genom [22 modifiziert]

Das menschliche Genom besteht zu ca. 45 % aus transposablen/mobilen Elementen. Diese werden in DNA-Transposons (2,8 %) und Retroelementen (42,2 %) unterschieden (siehe Abbildung 2) [38]. Erstmals hat Barbara McClintock 1956 die DNA-Transposons als mobile Elemente entdeckt [37]. Für die Vervielfältigung von DNA-Transposons werden keine RNA-Zwischenprodukte benötigt, wohingegen die Retroelemente diese RNA-Transkripte brauchen. Die Retroelemente werden nachfolgend in zwei Gruppen (ohne „Long terminal repeats“ (LTR) und mit LTR) unterschieden, wobei die Gruppe ohne LTR den größeren Anteil von 33,8 % ausmachen, und werden in SINE Elemente (kurze, verteilte Nukleotidelemente, „short interspersed elements“) mit den prominenten ALU- und MIR-Sequenzen und in LINE Elemente (lange, verteilte Nukleotidelemente, „long-terminal interspersed elements“) unterteilt. Die SINE Elemente exprimieren selbstständig keine Proteine und sind in ihrer Replikation von der Maschinerie der LINE-Elemente abhängig. [22]

Zur Gruppe mit LTR gehören die Retrotransposons und die HERVs [22]. Die LTRs sind regulatorische Sequenzen, die für die Regulation der Promotoraktivität und des Transkriptionsstarts vorhanden sind [14]. Eine Vielzahl der HERVs haben sich vor ungefähr 50 Millionen Jahren ins menschliche Genom integriert und sind mittlerweile so stark deletiert, dass nur noch einzelne Virusgene bzw. die regulatorischen LTRs enthalten sind. Einige HERV-Proteine und LTRs wurden jedoch evolutionär konserviert, da sie Vorteile für den Menschen mitbrachten. So sind einige HERV-Proteine bspw. an der Bildung der Plazenta beteiligt. Durch die LTRs entstehen zusätzliche regulatorische Promotorbereiche, wodurch bspw. die regulatorische Reichweite des p53-Netzwerkes enorm vergrößert wurde (siehe Abbildung 3: Vorteile für den Wirt). [25]

Außerdem wurde auch beobachtet, dass HERV RNAs und Proteine in einigen Tumoren und Geweben von Patienten mit Autoimmunerkrankungen auftreten bzw. erhöht sind, sodass für HERV eine Rolle in der Entstehung dieser Erkrankungen diskutiert wird (siehe Abbildung 3: Nachteile für den Wirt) [42, 43].

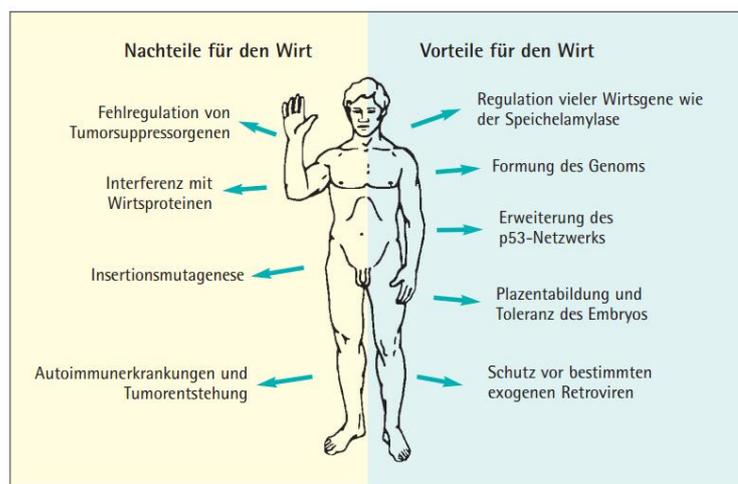


Abbildung 3: Darstellung der Vor- wie Nachteile von HERVs für den Wirt [25]

1.3 HERV-K(HML-2)-Familie

HERV-K Proviren wurden erstmals 1982 im menschlichen Genom aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu MMTV („mouse mammary tumour virus“) entdeckt, wovon sich auch ihr Name HML („Human MMTV-like“) ableitet [57]. Die ersten Mitglieder der HERV-K(HML-2) Familie haben sich vor 35 Millionen Jahren in das Genom der Altweltaffen integriert [33]. Durch wiederholte Proliferationsperioden kam es zu Re-Infektionen und damit verbunden zu einer Anhäufung von HERV-K Proviren im menschlichen Genom [25]. Die jüngsten belegten Integrationen fanden vor ca. 800.000 bis 2 Millionen Jahren statt [72]. Die meisten Proviren erlitten im Verlauf der Evolution starke

Deletionen und Mutationen [25]. Heute sind mindestens ca. 100 komplette HERV-K(HML-2) Proviren und 944 intakte bzw. fast intakte solo-LTRs bekannt [69].

HERV-K113 wurde erstmals von Turner beschrieben und besitzt einen vollständig offenen Leserahmen für alle viralen Proteine mit nahezu identischen LTR-Sequenzen [39]. Ein Basenaustausch pro LTR erfolgt mit einer Wahrscheinlichkeit von $2,3 \cdot 10^{-9}$ bis $5 \cdot 10^{-9}$ pro Jahr [54], d. h., dass eine Veränderung beider LTRs alle 200.000 bis 450.000 Jahre erfolgt [39]. Je stärker sich die beiden LTRs voneinander unterscheiden, desto länger liegt der Integrationszeitpunkt zurück. Aufgrund dieser Unterschiede wird das Alter von HERV-K113 auf ca. 1 Million Jahren geschätzt [69, 72].

Die Präintegrationsstelle von HERV-K113 ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert [33]. Die Prävalenz von HERV-K113 ist von der Ethnizität abhängig, d. h. bis zu 30 % der afrikanischen Bevölkerung sind Träger dieses Provirus [39]. Dies lässt die Hypothese zu, dass die initiale Integration des HERV-K113-Provirus in Afrika erfolgte und sich durch die nördliche und östliche Migration der afrikanischen Bevölkerung vor 150.000 bis 200.000 Jahren ausbreitete [39]. Nur 12 % der deutschen Bevölkerung sind Träger der HERV-K113 proviralen Sequenz [25].

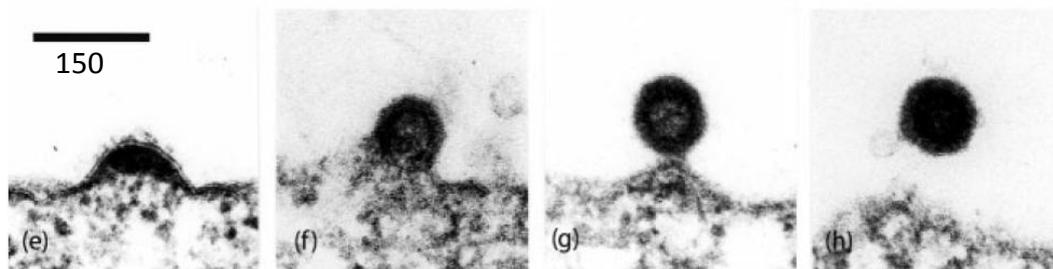


Abbildung 4: Darstellung der Knospung von viralen HERV-K113 Partikeln [28]

Prinzipiell besitzen einzelne Mitglieder der HERV-K(HML-2) Familie die Fähigkeit retrovirale Partikel zu bilden (siehe Abbildung 4 [28]). Auch die Infektiosität einzelner Hüllproteine konnte gezeigt werden [70]. Es konnte jedoch bisher kein Provirus identifiziert werden, dass die Kompetenz zur Replikation und Re-Integration besitzt [58, 59].

Es wird vielfach diskutiert, dass das Vorhandensein und die Expression von HERV im menschlichen Genom die Entstehung von verschiedenen Erkrankungen wie Tumoren und Autoimmundefekten begünstigen kann [28]. Es wurden bspw. *env* Transkripte in Melanomen und Menschen mit Brustkrebs nachgewiesen [52]. Außerdem konnte eine humorale Immunantwort gegenüber HERV-K(HML-2) bei Patienten mit Leukämien, Melanomen oder testikulären Tumoren detektiert werden [42,

43, 50, 51]. Es muss jedoch weiterhin untersucht werden, ob die HERV-K(HML-2) Expression die Ursache oder die Folge der Tumorerkrankung ist.

1.4 Der Aufbau eines HERV-K(HML-2) Virus

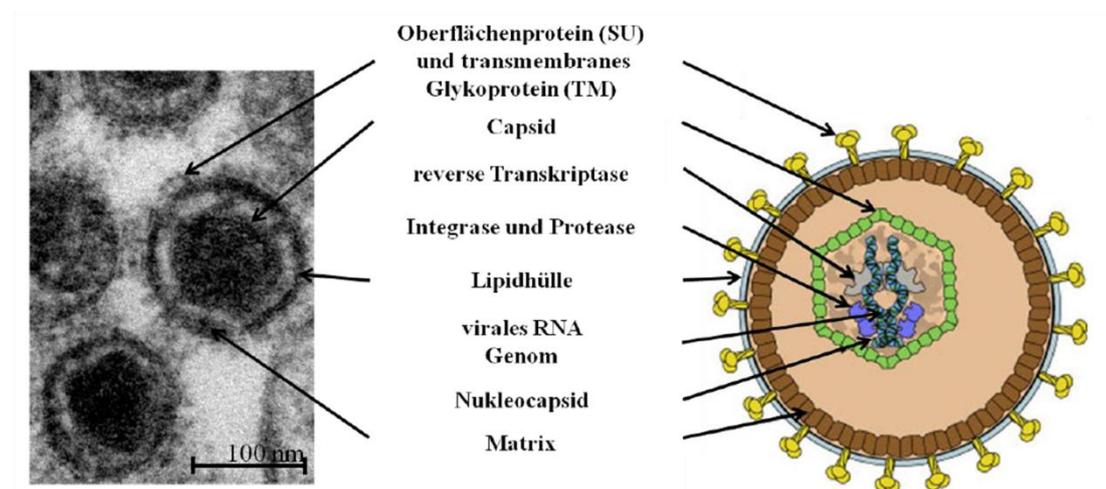


Abbildung 5: Aufbau eines reifen Betaretrovirus: Gegenüberstellung einer elektronenmikroskopischen und einer schematischen Darstellung eines reifen β -Retrovirus. Die viralen Hüllproteine, die aus den Oberflächen- (SU) und transmembranen Einheiten bestehen, sind in der Lipidmembran des Virus eingelagert. Das plusstrangorientierte, einzelsträngige RNA-Genom (zwei Kopien) sind von den Matrix-, Kapsid-, und Nukleokapsidproteine umgeben. Außerdem sind die Enzyme (Integrase, Protease, reverse Transkriptase und RNase H) ein Bestandteil des Virions. [48 (rechts: [15])]

Betaretroviren bilden umhüllte Viruspartikel mit einem Durchmesser von ca. 80-100 nm (siehe Abbildung 5) [73]. Das Erbgut besteht aus zwei Kopien eines einzelsträngigen RNA-Genoms in Plusstrangorientierung [48].

Dieses Genom enthält vier verschiedene Genabschnitte: *gag*, *pro*, *pol* und *env*. Das *gag* („group specific antigen“) -Gen kodiert das Hauptstrukturpolyprotein bestehend aus Matrix (MA)-, Kapsid (CA)- und Nukleokapsidprotein (NC). Das Matrixprotein bindet an der Wirtszellmembran, das Kapsidprotein bildet das virale Core und das Nukleokapsidprotein bindet an die virale genomische RNA [7]. Schon die alleinige Expression von Gag-Proteinen führt zu einer Bildung von nicht-infektiösen, unreifen Virus-artigen Partikeln (VLPs) [7]. Das *pro* („protease“) -Gen enthält die Information für die Produktion der viralen Protease, die das Gag-Vorläuferprotein während der Partikelreifung in Matrix (MA)-, Kapsid (CA)- und Nukleokapsidprotein (NC) prozessiert, sodass aus einem nicht-infektiöses ein infektiöses Virus entsteht [22]. Das *pol* („polymerase“) -Gen kodiert für die reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und RNase H. Diese Bestandteile werden zusammen mit dem Genom ins Virion einge-

baut und besitzen wichtige Funktionen während des Replikationszykluses. Das *env* („*envelope*“) -Gen beinhaltet die Informationen für das Oberflächenglykoprotein, die in Oberflächen (SU)- und den transmembranen Einheiten (TM) prozessiert werden. Diese Glykoproteine sind in der Lipiddoppelmembran integriert und liegen als Trimere vor [55], die elektronenmikroskopisch als „Spikes“ erkennbar sind [56]. [14]

1.5 Retroviraler Infektions-/ Proliferationszyklus

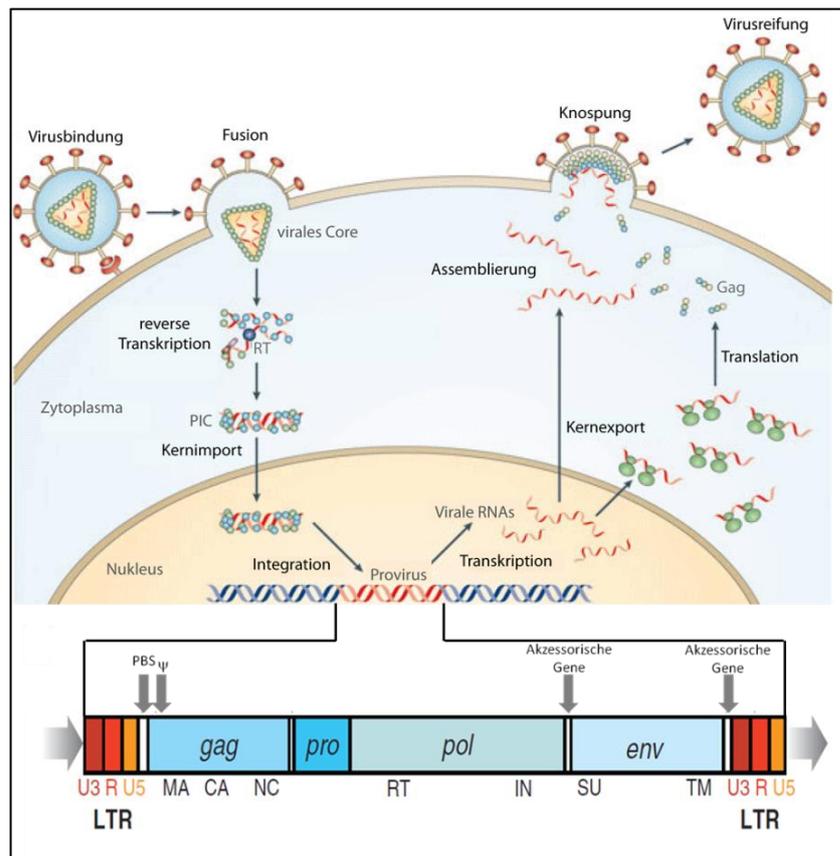


Abbildung 6: Darstellung des viralen Replikationszyklus von Retroviren mit dem integrierten Provirus. Das Retrovirus bindet an die Rezeptoren der Wirtszellmembran, wodurch eine Membranfusion und damit einhergehende Freisetzung des viralen Cores erfolgte. Durch die Spaltung der Kapsidproteine wurden die viralen Nucleinsäuren mit den enthaltenen Enzymen freigesetzt. Über die reverse Transkriptase wurden die viralen RNAs in doppelsträngige DNA umgeschrieben und in den Zellkern transportiert, um dann über die Integrase ins menschliche Genom integriert zu werden. Anschließend erfolgt die Transkription von viralen RNAs, die für die Entstehung von neuen viralen Partikeln verwendet werden. [13, 14 modifiziert]

Der retrovirale Replikationszyklus (siehe Abbildung 6) beginnt mit der Bindung des viralen Oberflächenglykoproteins an die spezifischen membranständigen Rezeptoren der Wirtszelle [13]. Dies bewirkt eine Fusionierung der Virus- mit der Wirtszellmembran, sodass das virale Core ins Zytoplasma freigesetzt wird [13]. Durch die Auflösung der Kapsidstruktur werden die viralen RNAs und Enzyme freigegeben

[13]. Das Besondere der Retroviren ist die reverse Transkriptase, die die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA transkribiert [14]. Während der reversen Transkription wird die abgelesene virale RNA über die RNase H abgebaut [27]. Die entstandene doppelsträngige DNA wird anschließend in den Zellkern transportiert, um dort mittels der viralen Integrase ins humane Genom integriert zu werden [14].

Das integrierte virale Genom wird als Provirus bezeichnet (siehe Abbildung 6) und besitzt eine Länge von ca. 10 Kilobasen (kb) [22]. Das Provirus wird von LTRs flankiert [14]. Diese LTRs sind regulatorische Sequenzen, die für die Regulation der Promotoraktivität und des Transkriptionsstarts vorhanden und an den Genomenden in gleicher Orientierung (U3, R und U5) angeordnet sind [14]. Im U3-Bereich befinden sich *cis*-aktive Sequenzen, die die retrovirale Genexpression regulieren [27]. Nach dem U5-Bereich der 5`LTR-Region befindet sich die Primerbindestelle (PBS) des Provirus (siehe Abbildung 6) [14]. Dort bindet spezifisch die zelluläre tRNA und initiiert damit die reverse Transkription [22]. Bei HERV-K bindet eine Lysin (K)-tragende tRNA an die Primerbindestelle (daher auch die Bezeichnung HERV-K) [22]. Die ψ -Stelle dient als Verpackungssignal der viralen RNAs und liegt im 5`-Gag-Bereich [14].

Komplexe Retroviren wie HIV, HTLV oder HERV-K können zusätzlich sogenannte akzessorische Genregionen besitzen, die zwischen dem *Gag/Env* und dem *Env/3`LTR* angeordnet sind [22]. Diese akzessorischen Gene codieren aus einer vollständig gespleißten RNA Nichtstrukturproteine und besitzen vielfältige Funktionen beginnend bei der Regulation der Replikation bis hin zur De-Regulation der Wirtsabwehr [21, 14]. HERV-K bildet das Rec-Protein („regulation of expression encoded by cORF“), welches essentiell für den retroviralen RNA-Transport ist [22].

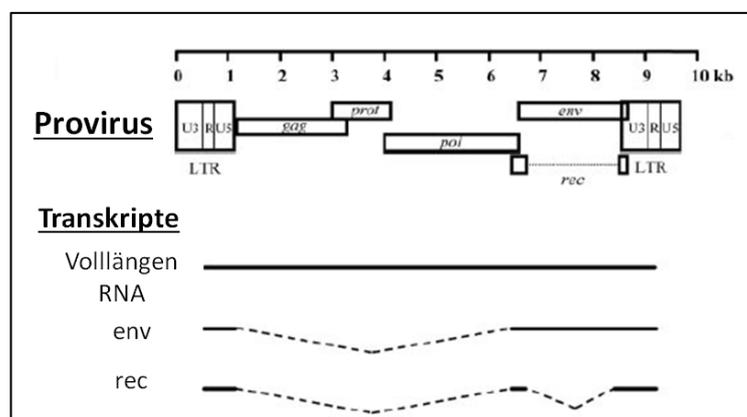


Abbildung 7: Darstellung der proviralen Sequenz von HERV-K(HML-2) und daraus resultierende Transkripte (Volllängen, env und rec RNA) [22]

Die provirale Sequenz kann als Vollängen, *env* und *rec* RNA transkribiert werden (siehe Abbildung 7) [22]. Die Vollängen RNA dient als Genom für die neuentstehenden Viruspartikeln oder wird als mRNA zur Synthese von Gag- und Pol-Vorläuferproteinen verwendet [22]. Die vRNA kommt auch in verschiedenen Spleißvarianten (teilweise- und/oder vollständig gespleißte RNA) vor [22]. Die Env-Vorläuferproteine werden aus einer einfach gespleißten viralen RNA am rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und während der Synthese in die Zellmembran integriert [27]. Die Gag-Aggregation erfolgt entweder im Zytoplasma oder an der Virusmembran [14]. Außerdem können die Gag-Proteine mit den zytoplasmatischen Anteilen des Hüllproteins interagieren, welches die Knospung von unreifen viralen Partikeln zur Folge hat [22]. Die Virusreifung erfolgt durch die enzymatische Spaltung der Gag-Vorläuferproteine über die virale Protease, sodass das zentrale Nukleokapsid gebildet wird [22]. Die reifen, infektiösen Viren können neue Zellen infizieren (siehe Abbildung 8: Reinfektion) [14].

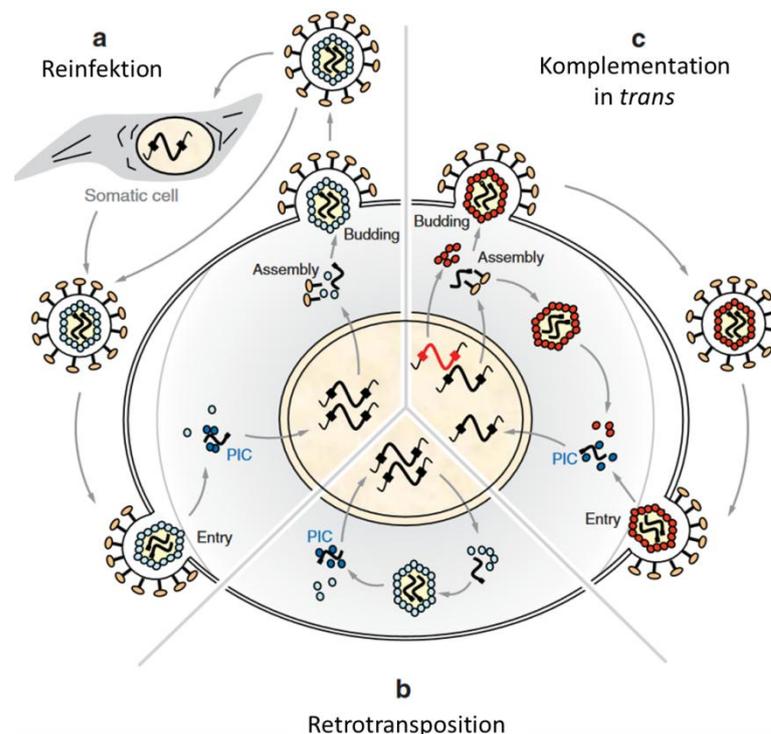


Abbildung 8: Proliferationsmechanismus von endogenen Retroviren (ERVs): (a) Reinfektion: Die Voraussetzung für eine Reinfektion ist ein funktionelles Hüllprotein, um ein Wiedereintritt des Virus in die Keimbahnzellen des Wirtes zu vermitteln. Es erfolgt eine kurze Replikationsperiode in einer somatischen Zelle, um die weitere Anpassung bzw. die Fitness der Retroviren zu erhöhen bzw. zu ermöglichen. (b) Retrotransposition ist ein intrazellulärer Amplifikationsmechanismus von Retrotransposons und ERVs. Dieser ist weniger gut verstanden, aber wahrscheinlich werden Übergangsformen von Core-Partikeln gebildet. (c) Komplementation in trans: Für die Virussyntese wird ein Helfervirus benötigt. Das Helfervirus stellt Proteine bereit, die von den ERVs für die Partikelbildung benötigt werden. Diese können entweder durch Retrotransposition bzw. Reinfektion proliferieren. [14]

Aufgrund verschiedenster Deletionen bzw. Mutationen in der proviralen Sequenz von HERVs sind diese meist nicht mehr in der Lage, einen vollständigen Proliferationsmechanismus zu durchlaufen. HERVs können jedoch intrazelluläre Amplifikationsmechanismen wie Retrotransposition oder Transkomplementation durchlaufen. Bei der Retrotransposition erfolgt keine Freisetzung von Viruspartikeln. Stattdessen wird das gebildete Viruscore in der Produzenten-Zelle aufgelöst und es erfolgt eine Re-Integration (siehe Abbildung 8: Retrotransposition). Bei der Komplementation in trans verwenden HERVs funktionelle Proteine eines Helfervirus, um neue virale Partikeln zu bilden, sodass eine Re-Infektion bzw. Retrotransposition erfolgen kann (siehe Abbildung 8: Komplementation in *trans*). [14]

1.6 Viraler RNA-Transport bei HERV-K(HML-2)

Das akzessorische Nichtstrukturprotein Rec wird aus einer vollständig gespleißten RNA synthetisiert und besitzt Homologien zum HIV Protein Rev- und zum HTLV Protein Rex [23]. Diese Transportproteine (Rec, Rev und Rex) binden an ungespleißte bzw. an teilweise gespleißte virale RNA-Transkripte [23]. Dadurch wird die RNA stabilisiert und der Transport aus dem Zellkern ermöglicht bzw. gefördert [22].

Rec ist ein 14,7 kDa großes Protein und bindet an das „Rec Responsive Element“ (RcRE), einer hochkonservierten strukturellen RNA Region, die sich in der U3-Region der 3' LTR der HERVs befindet. [22]

Das vollständig gespleißte Rec Transkript kann über zelluläre RNA-Transportmechanismen in das Zytoplasma transportiert und translatiert werden. Das Rec Protein besitzt eine Kernimport- (NLS) und eine Kernexportsignalsequenz (NES). An die NLS bindet Importin- β und ermöglicht somit den Kernimport durch die Nukleopore (siehe Abbildung 9). Durch Bindung von Ran GTP an Importin- β im Zellkern erfolgt die Dissoziation des Rec/Importin- β -Komplexes. Das freie Rec Protein bindet und multimerisiert an der ungespleißten bzw. teilweise gespleißten HERV-K113 RNA. An diesem Komplex bindet auch das zelluläre Staufen-1 Protein, sodass ein Ribonukleoproteinkomplex bestehend aus Staufen-1, Rec und HERV-K113 RNA im Zellkern gebildet wird [26]. [11, 29]

Exportin-1 (auch Crm1 genannt) bindet an die NES von Rec und Staufen-1, sodass der Kernexport dieses Komplexes erfolgen kann und durch eine energieabhängige Katalyse von GTP zu GDP zerfällt dieser Exportin/Staufen-1/Rec-Ribonucleoproteinkomplex. [11, 29]

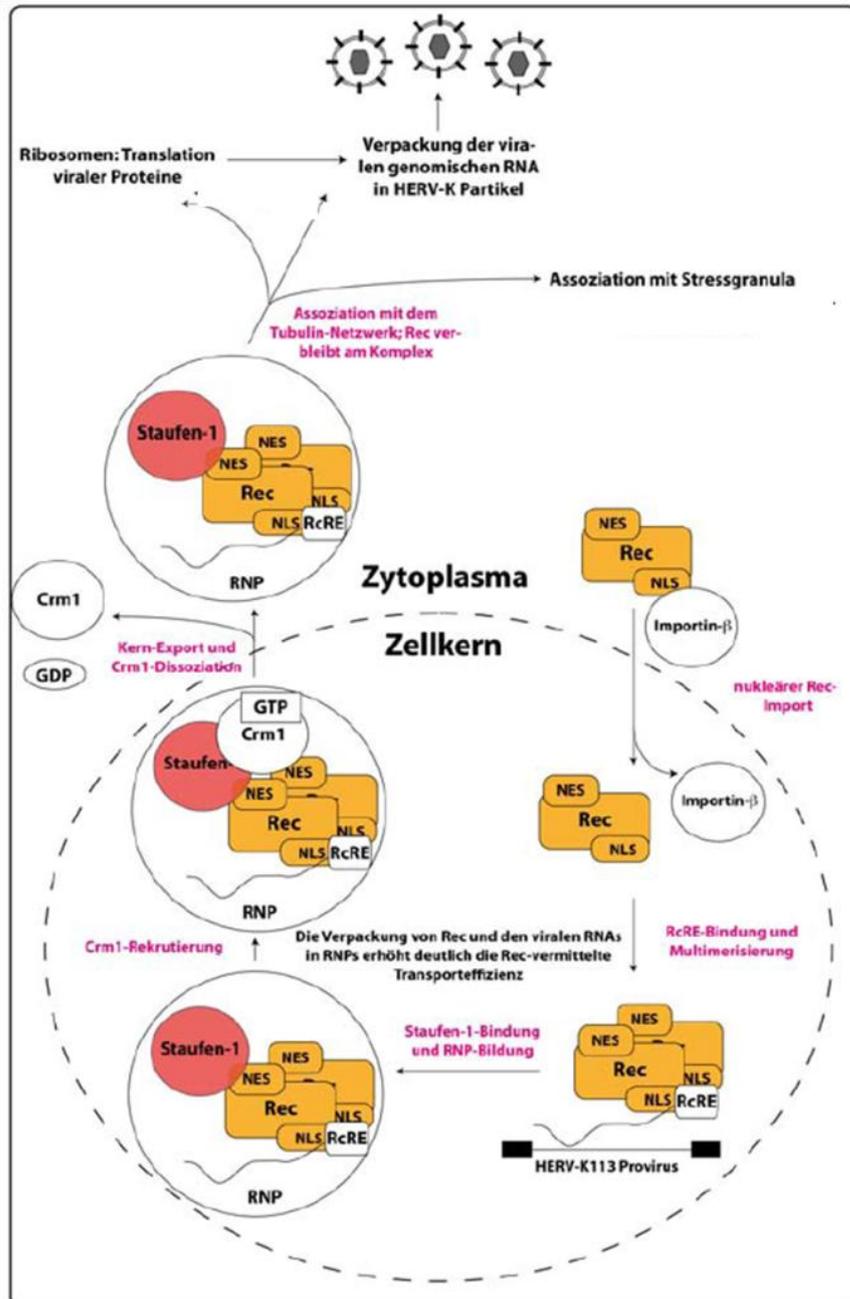


Abbildung 9: Einfluss von Staufen-1 auf den Rec vermittelten RNA-Transport von nicht bzw. teilweise gespleißter RNA: Importin-β bindet über die NLS-Sequenz an Rec, sodass ein Kernimport erfolgt. Anschließend kann Rec an die virale RNA binden und multimerisieren. Staufen-1 bindet an die Rec-Multimere bzw. an die virale RNA, wodurch ein Staufen-1/Rec-Ribonukleoproteinkomplex entsteht. Dieser Komplex wird mit Hilfe von Crm1 (Exportin-1) aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert und wird zu den Ribosomen für die virale Proteintranslation oder zur Plasmamembran transportiert. In einer zellulären Stresssituation kann dieser Komplex mit Stressgranula assoziiert sein. [27, modifiziert]

Der Staufen-1/Rec-Ribonukleoproteinkomplex bleibt im Zytoplasma bestehen und kann mit anderen zellulären Proteinen interagieren (siehe Abbildung 9). Durch die Interaktion von Staufen-1 mit dem Tubulin- Zytoskelett wird dieser Komplex zum

rauen Endoplasmatischen Retikulum bzw. zu freien Polysomen transportiert, sodass eine virale Proteintranslation erfolgen kann. Über das Zytoskelett kann die Volllänge HERV-K(HML-2) RNA auch zur Plasmamembran transportiert werden, um dort als Genom in die neuentstehenden viralen Partikeln eingebaut zu werden. Eine Stauf-1 und Rec Überexpression fördert auch gleichzeitig die Entstehung von neuen viralen Partikeln. Stauf-1 interagiert auch mit dem HERV-K(HML-2) Gag-Protein und fördert so die Multimerisation und die Assemblierung von endogenen viralen Partikeln. [26]

Darüber hinaus hat Stauf-1 eine physiologische Funktion während einer zellulären Stresssituation, da Stauf-1 an der Bildung von Stressgranula beteiligt ist. In Immunfluoreszenzexperimenten wurde eine Co-Lokalisation von Rec und Stauf-1 in Stressgranula nachgewiesen, sodass in Stresssituationen die gebundene virale RNA wahrscheinlich nicht mehr translatiert wird. [26]

1.7 APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3)

Die APOBEC3 Gene sind auf dem humanen Chromosom 22 lokalisiert und können eine doppelte Cytidin-Deaminase-Domäne (CD) oder nur eine einzelne Cytidin-Deaminase-Domäne enthalten. Diese APOBEC3-Enzymfamilie besitzt eine RNA-editierende und/oder eine DNA-mutierende Aktivität. [18]

Das APOBEC3G (oder A3G) Protein kann während der Knospung in die Viren eingebaut werden (siehe Abbildung 10). Dies erfolgt entweder durch die Bindung an die virale RNA, sodass APOBEC3G zusammen mit dem Genmaterial in die Viren eingebaut wird oder durch Bindung an die Gag-Proteine während der Knospung [12]. Durch die Bindung der Viren an die Rezeptoren der Zielzelle erfolgt die Fusionierung der Virus- und Zellmembran, sodass durch die Spaltung der viralen Core-Struktur die viralen RNAs und die mitgebrachten Proteine, wie z. B. das APOBEC3G, freigesetzt werden. Dieses APOBEC3G warnt die Zielzelle vor einer exogenen viralen Infektion. [16]

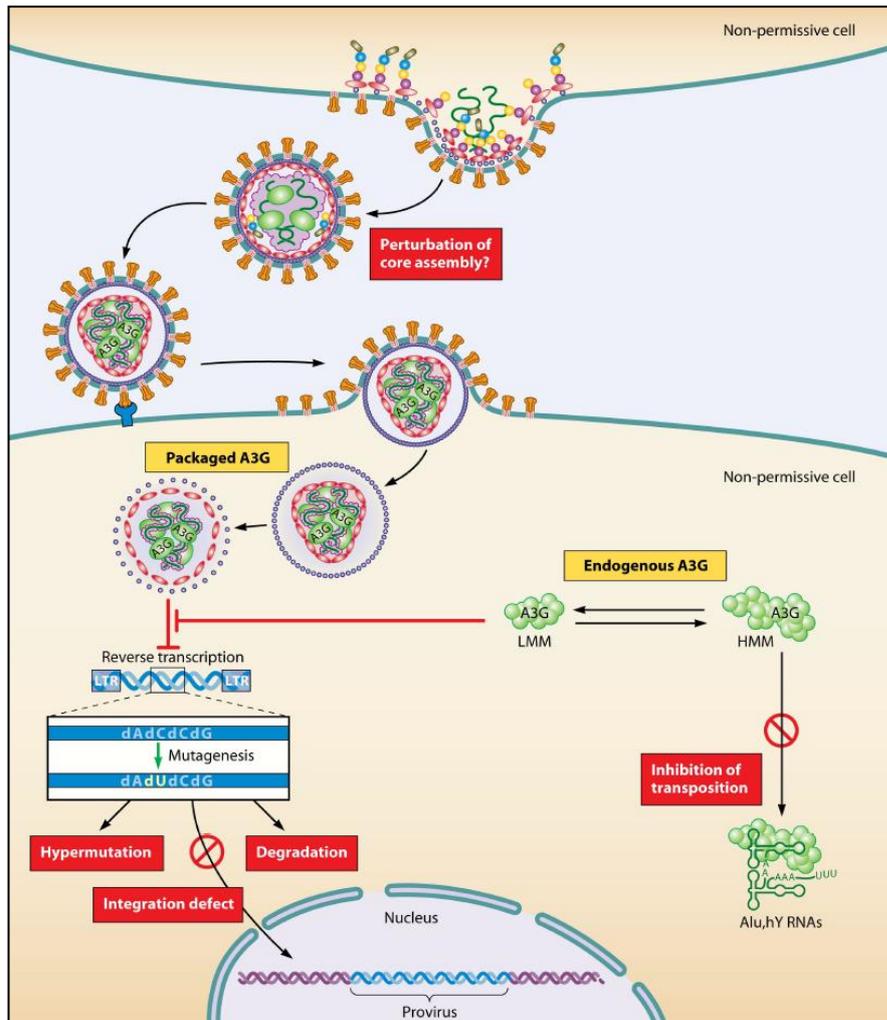


Abbildung 10: Darstellung der antiviralen Wirkungsweise des humanen APOBEC3G Proteins: In einer virusproduzierenden Zelle wird APOBEC3G in die viralen Partikeln eingebaut, um die nachfolgende Zelle vor einer Virusinfektion zu „warnen“. APOBEC3G kommt als LMM („low molecular mass“) und als HMM („high molecular mass“) APOBEC3G Form in der Zelle vor. Als LMM APOBEC3G inhibiert es die reverse Transkription, sodass während der Minusstrang-DNA-Synthese eine Cytidin Deaminierung erfolgt, welches Hypermutationen, Integrationsstörungen und Zerstörung der DNA zur Folge hat. Die Multimerisierung des APOBEC3G Proteins zu HMM APOBEC3G Granula bildet einen intrazellulären Schutz gegenüber endogenen Retroelementen wie Alu und hY RNAs. Durch Bindung der RNA dieser Retroelemente wird deren Transposition inhibiert. [16]

Intrazellulär besitzt das APOBEC3G Protein zwei verschiedene Formen: LMM („low molecular mass“) und HMM („high molecular mass“) APOBEC3G Form. Das LMM APOBEC3G Protein inhibiert die reverse Transkription und ist währenddessen enzymatisch aktiv, sodass während der Minusstrang DNA Synthese eine Deaminierung des Cytidins zu Uracil erfolgt. Dies bewirkt eine Guanin zu Adenin Hypermutation im Plusstrang der DNA, was nach erfolgter Integration, Transkription und Translation eine Produktion von inaktiven viralen Proteinen zur Folge hat. Außerdem kann das eingebaute Uracil in der viralen DNA auch von zellulären DNA-

Reparaturenzymen erkannt werden, sodass eine abasische Stelle entsteht, welches die Zerstörung der DNA bewirkt. Diese Mutation kann auch die Integration des Provirus inhibieren, wenn aberrante DNA-Enden entstanden sind. Das humane APOBEC3G zeigt eine katalytische Aktivität gegenüber einzelsträngiger DNA und nicht gegen DNA-DNA-, DNA-RNA-Hybride oder gegenüber einzelsträngiger RNA. [16]

Das LMM APOBEC3G kann zu einer HMM APOBEC3G Granula mit einer Molekulargröße von 5-15 MegaDa multimerisieren, wobei das APOBEC3G Protein innerhalb dieser Granula enzymatisch inaktiv ist [17, 18]. Das APOBEC3G Protein besitzt eine N-terminale CD1-Domäne, die an der Multimerisierung beteiligt ist, und eine C-terminale CD2-Domäne, die die Deaminase-Aktivität enthält [16]. Die HMM APOBEC3G Granula Bildung ist RNA abhängig und innerhalb dieser Granula wurden schon verschiedene RNAs, wie z. B. die ALU-Sequenzen oder hY RNAs, nachgewiesen (siehe Abbildung 12) [32]. Außerdem inhibiert die HMM APOBEC3G Granula die Retrotransposition von ALU und LINE-Elementen im menschlichen Genom, wodurch die Integrität des humanen Genoms bewahrt wird [67]. [20]

2. Zielstellung

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass HERV-K(HML-2) RNA mit der HMM APOBEC3G Granula assoziiert sein könnte. Zum einen interagiert das RNA-Transportprotein Rec mit Staufen-1, einer Komponente der Stressgranula, und zum anderen wurde in Co-Lokalisationsstudien eine Verbindung von HMM APOBEC3G Granula mit Stressgranula gezeigt. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die virale HERV-K(HML-2) RNA und Proteine wie bspw. Staufen-1, Rec und G3BP in die HMM APOBEC3G Granula transportiert werden. Dabei ist G3BP ein Kontrollprotein für die Bildung einer Stressgranula, da dieses Protein ein typisches Stressgranula-assoziiertes Protein darstellt.

Ist dies der Fall, könnte das ein Hinweis auf einen HMM APOBEC3G-assoziierten Restriktionsmechanismus gegenüber humanen endogenen Retroviren (HERV) sein, da die virale HERV-K(HML-2) RNA in dieser Granula komplexiert wäre und so nicht mehr für die virale Replikation (Proteintranslation bzw. Partikelbildung) zur Verfügung stehen würde.

Daraufhin soll nachgewiesen werden, ob APOBEC3G tatsächlich einen Einfluss auf die virale Partikelbildung besitzt. Theoretisch sollte mit steigenden APOBEC3G Konzentrationen die virale Partikelkonzentration erniedrigt sein. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass das humane Genom vor übermäßiger viraler Re-Infektionen bzw. Re-Integrationen auf diese Weise geschützt werden würde.

Außerdem soll überprüft werden, ob die intrazelluläre Rec-Konzentration einen Einfluss auf den HERV-K(HML-2) RNA Transport besitzt und ob sich somit der HERV-K(HML-2) RNA Gehalt in der HMM APOBEC3G Granula ändert.

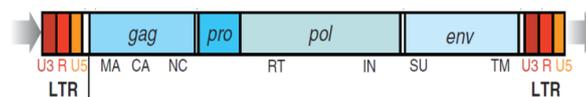
Ein Bestandteil dieser Arbeit soll die Etablierung einer RT-qPCR Methode sein, um ausschließlich das transfizierte humane endogene Retrovirus in der HMM APOBEC3G Granula nachzuweisen.

3. Material

3.1 Konstrukte

Tabelle 1: verwendete Konstrukte

Name	Referenzen
APOBEC3G-CFP	Malim <i>et al.</i> [3]
APOBEC3G-YFP	Malim <i>et al.</i> [3]
Staufen-Cherry	Hanke <i>et al.</i> [4]
pCMV-Staufen-Flag	Hanke <i>et al.</i> [4]
TIA YFP	Kedersha <i>et al.</i> [5]
pBud-Rec V5	Hanke <i>et al.</i> [4]
pBSK-tagged oriHERV-K 113 [siehe Abbildung 11]	Oliver Hohn
Rec EGFP	Hanke <i>et al.</i> [6]
Rec CFP	Daniel Ivanusic
pNTAP-B-APOBEC3G	Adriana Block



CCAACGTGGAGGCTTTCTCTAGGGTGAAGGTACGCTCGAGCGTGGTCATTGAGGACAAGTCGACGAGAGAGATCCCAGTACGTCTACAGTCAGCCTTACGGTAAGCTTGTGCGC*GCTAAGAAGTCGAGGGTGATAATGGGGCA

* oriHERV-K113 [TCGGAAGAAGCT]
tagged oriHERV-K113 [GCTAAGAAGTCG]

Abbildung 11: Darstellung der Genstruktur des tagged oriHERV-K113-Provirus, welches in dem pBSK-Vektor hinein kloniert wurde. Der Unterschied zwischen dem oriHERV-K113- und dem tagged oriHERV-K113-Plasmids besteht in der Mutation zwischen der 5'-LTR und der Gag-Sequenz. Dabei kam zu einem Sequenzaustauschen von [TCGGAAGAAGCT (oriHERV-K113)] mit [GCTAAGAAGTCG (tagged oriHERV-K113)]. Diese Mutationsstelle ist für die späteren Analysen entscheidend, um den tagged oriHERV-K113 vom Wildtyp oriHERV-K113 zu unterscheiden. Der tagged oriHERV-K113 gelangt über eine Transfektion in die Zelle (exogen) und der Wildtyp oriHERV-K113 (endogen) befindet sich bereits in der Zelle. [7, modifiziert]

3.2 Primer

Tabelle 2: verwendete Primer mit deren Sequenzen; eingeteilt in Sequenzierungs-, Mutageneseprimer und Primer für die Entwicklung des RT-qPCR-Systems

Primer	Sequenzen (5' → 3')
Sequenzierungsprimer	
T3 Primer-forward	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7 Primer-reverse	GTAATACGACTCACTATAGGGC
Mutageneseprimer	
APOBEC3G-EcoRI-forward	TCAAATCGACGAATTCATGAAGCCTCACTTCAGA AACACAG
APOBEC3G-HindIII-reverse	CATGGTTAAAGTAAGCTTTCAGTTTTCTGATTCT GGAGAATGG
Primer für die Entwicklung des RT-qPCR-Systems	
Primer forward	CCAACGTGGAGGCTTTTCTCTAG
WT Primer reverse	ATCACCTAGCTTCTTCCGA
Primer reverse Mut-2	CCATTATCACCTCGACTTCTTA
Primer reverse Mut-3	ATCACCTCGACTTCTTAGC
Primer reverse Mut-4	CACCCTCGACTTCTTAGC

Die Primer wurden bei Invitrogen Cooperation (USA, Carlsbad) bestellt und die GAPDH-HEX-, HERV-FAM-Sonde und ROX-Fluoreszenzfarbstoff wurden bei TIB MOLBIOL (Deutschland, Berlin) bestellt.

3.3 Restriktionsenzyme

Tabelle 3: verwendete Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz und Herstellungsfirma

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz mit Schnittstellen	Herstellungsfirma
EcoRI	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'	New England Biolabs Inc.; USA, Beverly
HindIII	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'	New England Biolabs Inc.; USA, Beverly
XhoI	5' CTCGAG 3' 3' GAGCTC 5'	New England Biolabs Inc.; USA, Beverly
KpnI	5' GTACC 3' 3' CCATGG 5'	New England Biolabs Inc.; USA, Beverly
NotI	5' GCGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5'	New England Biolabs Inc.; USA, Beverly

3.4 Chemikalien/Enzyme/Größenstandards

Die verwendeten Chemikalien wurden nach dem Reinheitsgrad p. A. von den Firmen Sigma-Aldrich Corporation (USA, MO, St. Louis) und Roth (Deutschland, Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 4: verwendete Chemikalien, Enzyme und Größenstandards mit Herstellungsfirma und Hauptsitz der Firma

Chemikalien, Enzyme, Größenstandards	Herstellungsfirma	Hauptsitz
0,5 M/1,5 M Tris-Puffer	Bio-Rad	USA, CA, Hercules
100xPenicillin/Streptomycin	Invitrogen Corporation	USA, Carlsbad
30 %ige Arcylamidlösung	Carl Roth GmbH	Deutschland, Karlsruhe
5xABI-Puffer		
6xDNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific	USA, MA, Waltham
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH	Deutschland, Erlangen
Bacto Tryptone	BD	Deutschland, Heidelberg
Bacto Yeast Extract	BD	Deutschland, Heidelberg
BigDye 3.1	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems	USA, CA, Foster City
BSA	New England Biolabs Inc.	USA, Beverly
Carbenicillin	Carl Roth GmbH	Deutschland, Karlsruhe
Carbonat-Bicarbonat-Puffer (Kapsel)	Sigma-Adrich Corporation	USA, MO, St. Louis
DMEM low glyucose; powder	Thermo Fisher Scientific	USA, MA, Waltham
dNTP`s	Fermentas International Inc.	Canada, Burlington
Ethanol	Carl Roth GmbH	Deutschland, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH	Deutschland, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Biochrom GmbH	Deutschland, Berlin
Generuler 1kb; 1kb Plus oder 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas International Inc.	Canada, Burlington
IGEPAL	Sigma-Adrich Corporation	USA, MO, St. Louis
Kanamycin	Carl Roth GmbH	Deutschland, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen Corporation	USA, Carlsbad
Natriumarsenit	Sigma-Adrich Corporation	USA, MO, St. Louis
NEB-Puffer	New England Biolabs Inc.	USA, Beverly
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas International Inc.	Canada, Burlington
Pfu-DNA Polymserase/-Puffer	Thermo Fisher Scientific	USA, MA, Waltham
Phosphat-Citrat-Puffer (Tabletten)	Sigma-Adrich Corporation	USA, MO, St. Louis
Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH	Deutschland, Mannheim
Resolving Gel Buffer (1,5 M Tris-HCl)	Bio-Rad	USA, CA, Hercules
SOC-Medium	Invitrogen Corporation	USA, Carlsbad
Stacking Gel Buffer (0,5 M Tris-HCl)	Bio-Rad	USA, CA, Hercules
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs Inc.	USA, Beverly
T4-DNA-Ligase-Puffer	New England Biolabs Inc.	USA, Beverly
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH	Deutschland, Mannheim
TEMED	Roth	Deutschland, Karlsruhe
XL10-Gold Ultracompetente Zellen	Agilent Technologies	USA, CA, Santa Clara
Zeocin	Invitrogen Cooperation	USA, Carlsbad

3.5 Antikörper

Tabelle 5: verwendete Antikörper mit Herstellungsfirma und Hauptsitz der Firma

Antikörper	Spezies	Herstellungsfirma	Hauptsitz
primärer Antikörper			
Anti-APOBEC3G	Ziege	Abcam	UK, Cambridge
Anti-APOBEC3G	Kaninchen	Sigma-Aldrich	USA, MO, St. Louis
Anti-G3BP	Maus	Abcam	UK, Cambridge
Anti-Staufen-1	Rattenserum	Robert Koch-Institut	Deutschland, Berlin
Anti-V5	Maus	Bio-Rad	USA, CA, Hercules
Anti-p27	Kaninchen	Robert Koch-Institut	Deutschland, Berlin
sekundäre Antikörper			
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	Sigma-Adrich Corpora- tion	USA, MO, St. Louis
Anti-Maus 800 CW	Ziege	Li-Cor	Deutschland, Bad Homburg vor der Höhe
Anti-Ratte HRP	Ziege	Sigma-Adrich Corpora- tion	USA, MO, St. Louis
Anti-Ziege HRP	Kaninchen	Dako	DK, Glostrup

3.6 Kits

Tabelle 6: verwendete Kits mit Herstellungsfirma und Hauptsitz der Firma

Kit	Herstellungsfirma	Hauptsitz
HotSar Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen GmbH	Deutschland, Hilden
InterPlay Mammalian TAP Purification Kit	Agilent Technologies	USA, CA, Santa Clara
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen GmbH	Deutschland, Hilden
QIAGEN One Step RT-PCR Kit	Qiagen GmbH	Deutschland, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH	Deutschland, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH	Deutschland, Hilden
RNeasy Midi-Kit	Qiagen GmbH	Deutschland, Hilden
TUMM (TaqMan Universal Master Mix)	Thermo Fiser Scientific	USA, MA, Waltham
TURBO DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific	USA, MA, Waltham
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega Corporation	USA, Madison

3.7 Geräte

Tabelle 7: verwendete Geräte mit Herstellungsfirma und Hauptsitz

Geräte	Herstellungsfirma	Hauptsitz
Beckman Optimal-L100K Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter	USA, Fullerton
CO2-Inkubator C 200 für eukaryotische Zellen	Labotect	Deutschland, Göttingen
DNA Engine Thermocycler	BioRad	USA, CA, Hercules
ELISA Reader (Sunrise)	Tecan	Schweiz, Männedorf
Gelapparatur SE260	Hofer	USA, MA, Holliston
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL Gesellschaft für Labor- technik GmbH	Deutschland, Burgwe- del
Inkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific	USA, Edison
Konfokales Laser Scanning	Carl Zeiss	Deutschland, Oberko-

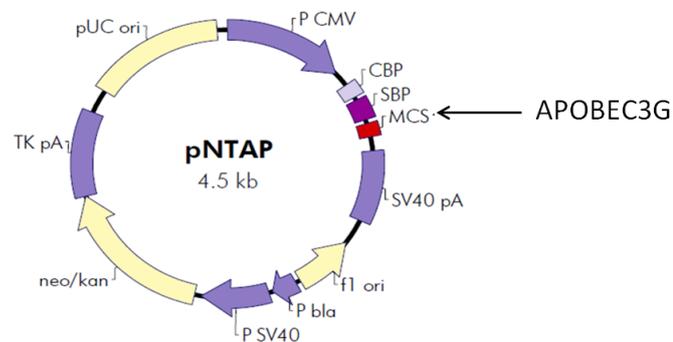
Mikroskop LSM 780 (cLSM)		chen
Mikro 200R	Hettich Zentrifugen	Deutschland, Tuttlingen
Multifuge 1S-R	Kendro	Deutschland, Langenselbold
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Thermo Scientific	USA, MA, Waltham
Odyssey	Li-Cor	Deutschland, Bad Homburg vor der Höhe
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro	Deutschland, Langenselbold
Stratagene Mx3000	Agilent Technologies	USA, CA, Santa Clara
Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	BioRad	USA, CA, Hercules
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer	BioRad	USA, CA, Hercules
X-Ray Retina	Fotochemische Werke Berlin GmbH	Deutschland, Berlin

4. Methoden

4.1 Nukleinsäureanalytik

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Eine Polymerase-Kettenreaktion diente der *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten.



CBP: Calmodulin-bindende-Domäne des Proteins
 SBP: Streptavidin-bindende-Domäne des Proteins
 MCS: multiple Klonierungsstelle

Abbildung 12: Darstellung des pNTAP-Klonierungsvektor: CBP: Calmodulin-bindende-Domäne, SBP: Streptavidin-bindende-Domäne, MCS: multiple Klonierungsstelle, um das APOBEC3G in den pNTAP-Vektor hinein zu klonieren. Das Plasmid besitzt eine Kanamycin-Resistenzkassette. Das synthetisierte, modifizierte APOBEC3G Protein besitzt eine Calmodulin- und Streptavidin-bindende-Domäne, die für die Tandem-Affinitätsaufreinigung essentiell ist. [8, modifiziert]

Die Pfu-DNA-Polymerase (Ansatz siehe Tabelle 8) besitzt eine Korrekturlesefunktion und wurde für die Amplifizierung von APOBEC3G mit den APOBEC3G-EcoRI- und APOBEC3G-HindIII-Primern verwendet, um das APOBEC3G anschließend

korrekt in den pNTAP-B-Vektor zu klonieren (siehe Abbildung 12). Bei einem Kontroll-PCR-Ansatz wurde die HotStar Taq-DNA Polymerase verwendet (Ansatz siehe Tabelle 9).

Eine typische PCR-Reaktion wird in verschiedene Phasen unterteilt: Denaturierung, Primer-Bindung und Elongation. Die Temperatur für die Primer-Bindung wird individuell anhand des Purin-Pyrimidin-Gehaltes mittels folgender Formel: $4 \cdot \sum G/C + 2 \cdot \sum A/T - 5$ ermittelt.

Tabelle 8: Ansatz für die PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase

PCR-Ansatz	eingesetztes Volumen/Konzentrationen
Pfu-Polymerase-Puffer	5 µl
2,5 mM dNTPs	4 µl
forward/reverse Primer	je 5-50 pM
Template-DNA	100 ng
Pfu-Polymerase (Roche Diagnostik)	2-3 Einheiten/µl
A. bidest	ad. 50 µl

PCR-Bedingung mit der Pfu-Polymerase:

1-2 min bei 95 °C	Denaturierung	
0,5-1 min bei 95 °C	} 30 Zyklen	
30 s bei 45°-65 °C		Denaturierung
2 min pro kb bei 72 °C		Primer-Bindung
5 min bei 72-74 °C	Elongation	
	finale Elongation	

Tabelle 9: Ansatz für die PCR mit der HotStar Taq-DNA-Polymerase

PCR-Ansatz	eingesetztes Volumen/Konzentrationen
10x-Puffer Dream Taq	2,5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
forward/reverse Primer	je 0,1-0,5 µM
Template-DNA	100 ng
HotStar Taq DNA-Polymerase (Qiagen)	2-3 Einheiten/µl
A. bidest	ad. 20 µl

PCR-Bedingung mit der HotStar-Polymerase:

15 min bei 95 °C	Denaturierung/Aktivierung der Polymerase	
0,5-1 min bei 95 °C	} 30 Zyklen	
0,5-1 min bei 50-68 °C		Denaturierung
1 min pro kb bei 72 °C		Primer-Bindung
10 min bei 72 °C	Elongation	
	finale Elongation	

4.1.2 Restriktionsansätze mit Endonukleasen

Die verwendeten bakteriellen Endonukleasen erkennen spezifisch palindromische Sequenzen (siehe Tabelle 3) und schneiden die DNA so, dass ein 5`-Überhang entsteht. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37 °C wurde die Qualität des Restriktionsverdau (siehe Tabelle 10) durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft und die Vektor/Insert-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

Tabelle 10: Restriktionsansatz mit Endonukleasen

Restriktionsbestandteilen	eingesetztes Volumen
Vektor/Insert	2 µl
Restriktionsenzym	je 2 µl
NEB-Puffer (BSA)	5 µl
A. bidest	1 µl
	ad. 50 µl

4.1.3 DNA-Agaroseelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Ladung und Größe und ist somit ein Maß für die Qualität und der Größenkontrolle von DNA-Fragmenten. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2) auf eine Endkonzentration von 1-2 % abhängig von den erwarteten DNA-Fragmentgrößen eingestellt. In der Mikrowelle wurde die Agaroselösung bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlen wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugeben und das flüssige Gel zum Aushärten in die Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit 6xDNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente im Agarosegel erfolgte im 1%igen TAE-Puffer bei 60-120 V. Als Größenstandard wurde der „Generuler 1 kb DNA“ Marker oder der „Generuler 100 bp DNA“ Marker von Fermentas verwendet.

4.1.4 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Für die Gelextraktion von Fragmenten wurde das „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega Corporation; USA, Madison) nach Herstellerangaben verwendet.

4.1.5 Ligationsansatz

Die T4-DNA-Ligase verknüpft freie 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxylgruppen unter Verbrauch von ATP, welches zur Entstehung einer Phosphordiesterbindung führte. Diese Methode diente dem Ligieren von Insert und Vektor Fragmenten nach vorheriger

Restriktion mit den gleichen Restriktionsendonukleasen. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die im Ligationsansatz (siehe Tabelle 11) enthaltenen Plasmide in chemokompetente *E. coli*-XL-10-Zellen transformiert und die Zellen auf Selektivplatten (LB-Platten mit Antibiotika (siehe Tabelle 12: Zusammensetzung LB-Platten)) ausplattiert.

Tabelle 11: Ligationsansatz

Ligationsansatz	eingesetztes Volumen/Konzentration
Vektor	80 ng
Insert	Konzentration wird über folgende Formel berechnet: $\text{ng [Fragment]} = 5 \cdot \text{ng [Vektor]} \cdot \frac{\text{Länge [Insert]}}{\text{Länge [Vektor]}}$
T4-DNA-Ligase Puffer	2 µl
T4-Ligase	0,5 µl
A. bidest	ad. 20 µl

4.1.6 Transformation

Für die chemische Transformation wurden die Plasmide zu den *E. coli* XL-10 chemokompetenten Zellen (Invitrogen Corporation) gegeben und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Durch Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die *E. coli*-Zellen bei 37 °C für 1 Stunde vermehrt und auf ein Selektivmedium ausplattiert. Die Selektivmedien waren LB-Platten mit Antibiotikazusätzen wie Kanamycin, Carbenicillin (ähnlich wie Ampicillin) oder Zeocin in einer Konzentration von 10 mg/ml.

Tabelle 12: Zusammensetzung LB-Medium: Für die Herstellung der LB-Platten wurden 20 g Agar pro Liter Medium zugesetzt und erhitzt, um die LB-Platten mit den Antibiotikazusätzen gießen zu können.

Bestandteil	Menge/Volumen
Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
Natriumchlorid	10 g
Wasser	1000 ml (Volumeneinheit)

4.1.7 Plasmidisolierung

Die entstandenen Kolonien auf den Selektivplatten wurden in LB-Flüssigmedium (siehe Tabelle 12) mit Antibiotikazusätzen in einer Konzentration von 10 mg/ml über Nacht bei 37 °C kultiviert. Für die Plasmidisolierung aus den Bakterienzellen wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder das „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

4.1.8 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Gerät „Nanodrop-1000“ (Thermo Scientific).

4.1.9 Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet (siehe Tabelle 13). Die verwendeten Primer besaßen eine Länge von 18-25 Nukleotiden mit einem GC-Anteil von mindestens 40 % und einer Schmelztemperatur (T_m) von 53-63 °C. Für die Sequenzierungsreaktion wurde Big Dye Premix verwendet, der AmpliTaq DNA-Polymerase, dNTPs und fluoreszierende 2`3`-Didesoxynukleosidtriphosphat-Mix (ddNTPs) enthält. Die Sequenzanalyse erfolgte im Sequenzierungslabor des Robert Koch-Instituts und die Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm „Bio Edit Sequence Alignment Editor“ [74] ausgewertet.

Tabelle 13: Sequenzierungsansatz

Sequenzierungsbestandteile	eingesetztes Volumen
Plasmid-DNA (150-300 ng)	x µl
Primer	0,5 µl
Big Dye	1 µl
5xABI-Puffer	1,5 µl
A. bidest	ad. 10 µl

PCR-Bedingung für die Sequenzierungsreaktion:

2 min bei 96 °C		Denaturierung
10 s bei 96 °C	} 25 Zyklen	Denaturierung
5 s bei 53 °C		Primer-Bindung
4 min bei 60 °C		Elongation

4.2 Zellkultur-Technik

4.2.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche kultiviert und passagiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen befanden sich im Wachstumsmedium bestehend aus DMEM mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 1x Penicillin/Streptomycin. Die adhärennten Zellen wurden mit 10 ml PBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA vom Zellkulturboden abgelöst. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von

serumhaltigem Medium abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 300xg pelletiert und in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde über eine Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH; Deutschland, Wertheim) bestimmt und auf eine entsprechende Zellzahl in Abhängigkeit der verwendeten Kultivierungsgefäße eingestellt und ausgesät (siehe Tabelle 14).

Es wurden zwei verschiedene eukaryotische Zelllinien verwendet. Die HEK-293T-Zelllinie sind humane embryonale Nierenkarzinom-Zellen und die Tera-1-Zelllinie humane Teratokarzinom-Zellen.

Tabelle 14: verwendete Zellzahlen

	6-Well-Platte	10 cm Zellkultur- schale	175 cm² Zellkul- turflasche
HEK-293T-Zellen	4·10 ⁵ Zellen	4·10 ⁶ Zellen	6·10 ⁶ Zellen
Tera-1			10 ⁷ Zellen

4.2.2 Transfektionsansätzen

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen erfolgte mit der Calciumphosphat-Methode. Für die Calciumphosphat-Methode wurde eine bestimmte DNA-Menge in A. bidest verdünnt (siehe Tabelle 15) und mit einer sterilen 2,5 M Calciumchlorid-Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde auf eine sterile 2xHBS-Lösung (pH 7,1; Ansatz siehe Tabelle 16) getropft. Während einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur entstanden DNA-Komplexe. Das Transfektionsgemisch wurde auf die Zellen, die vorher mit PBS gewaschen und mit einem geringen Volumen an Wachstumsmedium versetzt wurden, gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht erfolgte ein Mediumswechsel.

Für die APOBEC3G-Stressversuche wurden 48 µg DNA (8 µg pNTAP-A3G, 25 µg tagged oriHERV-K113, 10 µg Rec-V5 und 5 µg Staufen-Flag) pro 175 cm² Zellkulturflasche verwendet. Für die jeweiligen Kontrollen wurde immer eine Komponente ersetzt.

Tabelle 15: Transfektionsansatz mit der Calciumphosphat-Methode

	6-Well-Platte	10 cm-Zell- kulturschalen	175 cm² Zell- kulturflasche
DNA-Menge	2,4 µg in 45 µl A. bidest	4,8 µg in 90 µl A. bidest	48 µg in 900 µl A. bidest
2,5 M CaCl₂- Lösung	5 µl	10 µl	100 µl
2xHBS-Lösung	50 µl	100 µl	1 000 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung der 2xHBS-Lösung

2xHBS-Lösung	V in l
5 M NaCl-Lösung	5,6 ml
0,5 m HEPES pH 7,1	10 ml
0,15 M Na₂HPO₄	1 ml

4.2.3 Stress-Reaktion mit Natriumarsenit

Um die Bildung der HMM („high molecular mass“) APOBEC3G Granula zu stimulieren, wurden die Zellen mit einer 0,5 mM Natriumarsenitlösung für 1 h bei 37 °C gestresst. Dafür wurde eine 0,05 M Natriumarsenit-Stocklösung mit Wachstumsmedium auf 0,5 mM verdünnt.

4.3 Aufreinigung der APOBEC3G Granula

4.3.1 Zelllyse

Die Zellen in einer 175 cm² Zellkulturflasche wurden mit PBS vom Zellkulturboden abgelöst und bei 300xg für 5 min pelletiert. Danach wurden die Zellen mit 5 ml Lysis-Puffer, bestehend aus 50 mM HEPES, 125 mM NaCl, 0,2 % IGEPAL und Protease-Inhibitor-Tablette (Roche) lysiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C unter Rotation erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4.000xg bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Falcon überführt. Anschließend erfolgte eine Tandem Affinitätsaufreinigung des enthaltenen Proteinkomplexes.

Bei Zellen, die in einer 6-Well-Platte oder 10 cm Zellkulturschale kultiviert wurden, erfolgte die Zelllyse direkt in dem Well durch die Zugabe von 200 µl oder 400 µl Lysis-Puffer. Dann erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 16 000xg, um ein zellfreies Lysat herzustellen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt, mit 6x Proteinladepuffer (bestehend aus 6 % SDS, 30 % Glycerol, 33 µM β-Mercaptoethanol, 0,1 M Tris-HCL (pH 7,4) mit einer Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.2 Tandem Affinitätsaufreinigung eines zellulären Proteinkomplexes

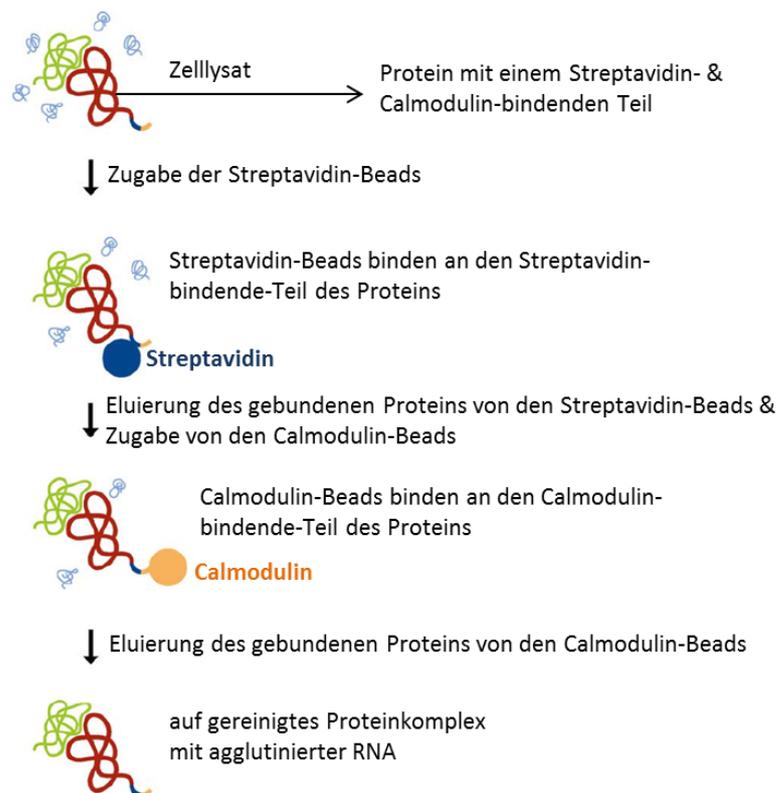


Abbildung 13: Workflow eines Tandem Affinitätsaufreinigungs (TAP)-Systems: Das APOBEC3G Protein enthält N-Terminal eine Streptavidin- und Calmodulin-bindende Domäne, sodass das Protein über Streptavidin- und Calmodulin-Beads aufgereinigt werden konnte. [8, modifiziert]

Die Aufreinigungsschritte erfolgten überwiegend entsprechend den Herstellerangaben des Tandem Affinitätsaufreinigungs (TAP)-Systems von Agilent Technologies. In der Abbildung 13 wird der Workflow der Tandem Affinitätsaufreinigung dargestellt. Das modifizierte APOBEC3G-Protein, welches sich im Zelllysat befindet, besitzt eine Calmodulin- und Streptavidin-bindende-Domäne, die für die Aufreinigung essentiell ist. Als erstes erfolgte eine Zugabe von Streptavidin-Beads, die an die Streptavidin-bindende-Domäne des Proteins bindet. Die anderen nicht gebundenen Proteine wurden entfernt. Nach Eluierung von den Streptavidin-Beads erfolgte eine weitere Aufreinigung mittels Zugabe von Calmodulin-Beads, die das modifizierte Protein bindet. Durch Waschung der Beads wurden andere nicht gebundene Proteine entfernt und nach Eluierung von den Calmodulin-Beads erhielt man ein sehr reines Protein mit seinen Interaktionspartnern (Proteine, DNA, RNA). Innerhalb der HMM APOBEC3G Granula befand sich die tagged oriHERV-K113 RNA. Zur Auflockerung des Proteinkomplexes und zur Beseitigung von DNA (z. B. tagged oriHERV-K113 Plasmide) wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (siehe 4.5.1). An-

schließlich erfolgte eine RNA-Isolierung (siehe 4.5.2) und der Nachweis der tagged oriHERV-K113 RNA mittels Duplex-RT-qPCR (siehe 4.5.3.3).

Von den jeweiligen Aufreinigungsschritten wurden Aliquote entnommen, die mit 6x Proteinladepuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert wurden. Die TAP-Aufreinigung wurde entsprechend der Publikation von Chiu *et al.* angepasst [1], wobei alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt wurden und auf EDTA verzichtet wurde.

4.3.3 Immunpräzipitation des Rec-V5 Proteins

Zu den jeweiligen Überständen (ca. 100 µl) wurde 15 µl der gewaschenen Anti-V5-Agarose (Sigma-Aldrich Cooperation; USA, MO, St. Louis) geben und durch Rotation bei 4 °C für 2 Stunden bindet das Rec-V5-Protein an die Anti-V5-Agarose. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Die Agarose-Beads wurden mit 20 µl 6xProteinladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht, damit die V5-markierten Proteine sich von den Agarose-Beads lösten. Nach anschließender Zentrifugation kann der Überstand bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert werden.

4.4 Nachweis von APOBEC3G Protein

4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden im SDS-PAGE nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Dafür wurde ein 5%iges Sammel- und ein 12%iges oder 15%iges Trenngel verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 17). Die Konzentration des Trenngels ist abhängig von dem zu detektierenden Protein. Je größer das zu detektierende Protein desto niedrigprozentiger war das Trenngel. Durch Zugabe von Ammonium-Persulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Vernetzung von Acrylamid-Monomeren katalysiert. Die Auftrennung der Proteine im Laufpuffer (bestehend aus 2,5 mM Tris (pH 8,3), 19,2 mM Glycin und 1% SDS) erfolgte bei 125 bis 180 V. Als Größenstandard wurde der „PAGERuler Prestained Protein“ Marker von Thermo Fisher Scientific verwendet. Nach erfolgter Elektrophorese wurde die Proteinbande mit Coomassie Colloidal Blau gefärbt oder die Proteine über Western-Blot Analyse spezifisch nachgewiesen.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für zwei Gele

	12%iges Trenngel	15%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
A. bidest	6,8 ml	4,8 ml	5,7 ml
30% Acrylamid	8,0 ml	10,0 ml	1,7 ml
1,5 M Tris-Lösung	5 ml	5 ml	
0,5 M Tris-Lösung			2,5 ml
10%iges SDS	200 µl	200 µl	100 µl
10%iges APS	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

4.4.2 Western Blot

Nach erfolgter Proteingelelektrophorese wurden die Gele in Transferpuffer (bestehend aus 2,5 mM Tris (pH 8,3), 19,2 mM Glycin, 1% SDS und 20% Methanol) äquilibriert und die Proteine über ein Semi-Dry-Blotting-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde 5 min in Methanol aktiviert. Anschließend wurde ein Sandwich bestehend aus Filterpapier, PVDF-Membran, Proteingel und Filterpapier in die Blot-Apparatur gelegt und bei 20 V für 30 min geblottet. Dann wurde die Membran in 4%igem Milchpulver in PBST (0,1 % Tween in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Membran inkubierte in der primären Antikörperlösung (Antikörper verdünnt in 4%igem Milchpulver in PBST) über Nacht bei 4 °C. Dann wurde die Membran dreimal für 5 min in PBST gewaschen.

Es wurden zwei verschiedene Detektionssysteme verwendet. Dafür wurde entweder ein sekundärer Antikörper mit HRP (Meerrettichperoxidase) verdünnt in PBST zur Membran hinzugeben. Anschließend wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und 3-mal in PBST gewaschen. Die Lichtreaktion der HRP wurde über das „Super Signal West Dura Extended Duration Substrate“ von Thermo Fisher Scientific angeregt. Diese Lichtreaktion wurde durch die Schwärzung des Röntgenfilms (X-Ray Retina, Fotochemische Werke Berlin GmbH) sichtbar. Andererseits wurde ein Infrarot (IR) -gekoppelter sekundärer Antikörper verdünnt in PBST zur Membran hinzugegeben. Dieser wurde eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und zweimal für 30 min in PBST gewaschen. Die Detektion des gebundenen IR-Farbstoffes erfolgte über das Gerät Odyssey von Li-Cor.

4.5 Nachweis der tagged oriHERV-K113-RNA

Ziel der Arbeit war es, retrovirale RNA in der HMM APOBEC3G Granula nachzuweisen. Der Nachweis erfolgte über die RT-qPCR („quantitative reverse Transkripti-

ons-PCR“) der isolierten tagged oriHERV-K113 RNA aus der HMM APOBEC3G Granula.

4.5.1 DNase-Verdau

Bevor die virale RNA quantifiziert werden konnte, musste kontaminierende Plasmid-DNA eliminiert werden. Zur Beseitigung von tagged oriHERV-K113 Plasmiden wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Die Hydrolyse der DNA erfolgte über die Turbo DNase von Ambion life technologies. Dieses „Turbo DNase Kit“ wurde nach Herstellerangaben verwendet.

4.5.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „RNeasy Midi-Kit“ (Qiagen GmbH).

In der HMM APOBEC3G-Granula befand sich die tagged oriHERV-K113 RNA. Diese Granula wurde durch vorherige Zellyse, Aufreinigung und DNase-Verdau behandelt, sodass die RNA-Isolierung erst ab Schritt 4: Zugabe von RLT-Puffer erfolgte.

4.5.3 Entwicklung eines RT-qPCR-System zum Nachweis von tagged oriHERV-K113

4.5.3.1 Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe vom tagged oriHERV-K 113 Plasmids

Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe des tagged oriHERV-K113 Plasmids von 0,2 bis $2 \cdot 10^6$ Kopien/ μ l hergestellt. Nach jedem Verdünnungsschritt wurde das Eppendorf-Tube 30-mal invertiert, für 5 min bei 56 °C inkubiert und 1 min auf Trockeneis herunter gekühlt. [2]

4.5.3.2 qRT-PCR der dekadischen Verdünnungsreihe vom tagged oriHERV-K113 Plasmids

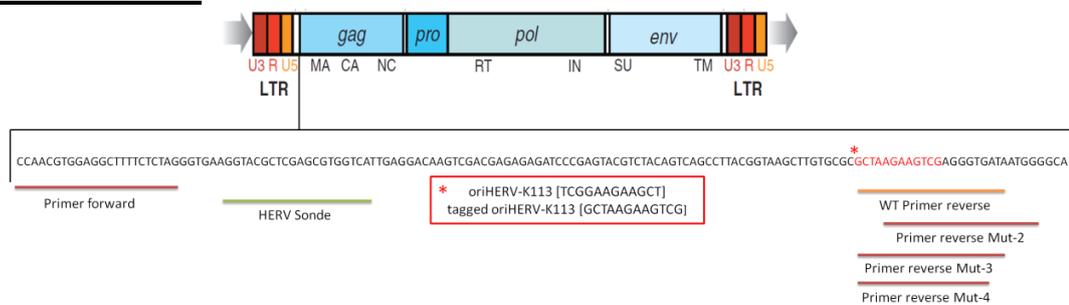


Abbildung 14: Darstellung des tagged oriHERV-K113 Plasmids mit den verwendeten Primern für die qRT-PCR

Die dekadische Verdünnungsreihe (quantitative real time PCR (qRT-PCR) -Ansatz siehe Tabelle 18) des getaggten oriHERV-K113 Plasmids wurde mit verschiedenen Primerkonstellationen separat getestet, um zu ermitteln, welche Primerkonstellation die beste Effizienz besitzt. Bei jeder Konstellation blieb der vorwärts gerichtete Primer („Primer forward“) gleich und es wurde nur der rückwärts gerichtete Primer („Primer reverse“) geändert (siehe Abbildung 14), da diese Primerregion die mutierte Sequenz beinhaltete. Die tagged oriHERV-K113 Sonde hybridisiert an der DNA zwischen den vorwärts und den rückwärts gerichteten Primer. Die Sonde enthielt zwei Fluoreszenzfarbstoffe am 5` Ende den Reporter und am 3` Ende den sogenannten Quencher. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an der Sonde gebunden und befanden sich in räumlicher Nähe, sodass das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher unterdrückt wurde. Erst durch die DNA-Polymerase, die eine 5`→3` Exonukleaseaktivität besitzt, wurde der Reporter vom Quencher getrennt, sodass die Fluoreszenz vom Reportermolekül detektiert werden konnte. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge des eingesetzten PCR-Produktes.

Tabelle 18: Ansatz für die qRT-PCR

Reaktionsbestandteile	Konzentration	Volumen
TUMM (TaqMan Universal Master Mix)	2x	12,5 µl
Primer forward	10 µM	1 µl
Primer reverse Mut-2; Mut-3 oder Mut-4	10 µM	1 µl
tagged oriHERV Sonde (FAM)	10 µM	0,5 µl
RNase-freies Wasser		5 µl
Template		5 µl

qRT-PCR-Bedingung:

10 min bei 95 °C		Denaturierung
30 s bei 95 °C	} 45 Zyklen	Denaturierung
1 min bei 54 °C		Primer-Bindung
20 s bei 72 °C		Elongation

4.5.3.3 Duplex-RT-qPCR zum Nachweis der tagged oriHERV-K113 RNA

Duplex-RT-qPCR bedeutet, dass zwei Primerkonstellationen mit deren Sonden in einem PCR-Mix enthalten waren. Daraufhin entstanden zwei verschiedene Amplifikate: ein tagged oriHERV-K113 Amplifikat, das durch eine FAM-markierte Sonde quantifiziert wurde und ein GAPDH Amplifikat, das durch eine HEX-markierte

Fluoreszenzsonde detektiert wurde. Zu dem PCR-Mix wurde zusätzlich ein ROX-Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, welches als Referenz verwendet wurde, um mögliche Pipettierfehler auszugleichen.

Die RT-qPCR richtete sich nach dem Protokoll des OneStep RT-PCR Kits von Qiagen (RT-qPCR Ansatz siehe Tabelle 19). Somit erfolgte zunächst eine reverse Transkription bei 37 °C für 30 min, wodurch die virale RNA in DNA umgeschrieben wurde. Diese DNA wurde dann amplifiziert und in Echtzeit entsprechend der gemessenen Fluoreszenzsignale quantifiziert. Die Messung erfolgte am Stratagene Mx3000 (Agilent Technologies). Für die Messung wurden folgende Kanäle verwendet: 585-610 nm (ROX-Signal), 535-555 nm (Hex-Signal) und 492-516 nm (FAM-Signal).

Tabelle 19: Ansatz für die Duplex-RT-qPCR

Reaktionsbestandteile	Konzentration	Volumen
5x Qiagen RT-PCR Puffer	5x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1 µl
dNTPs	10 mM	1 µl
ROX	10 mM	0,125 µl
HERV-Primer forward	10 µM	1,5 µl
HERV- Primer reverse Mut-3	10 µM	1,5 µl
tagged oriHERV Sonde (FAM)	10 µM	0,5 µl
GAPDH- Primer forward	10 µM	0,75 µl
GAPDH- reverse	10 µM	0,75 µl
GAPDH- oder pBSK-Sonde (HEX)	10 µM	0,25 µl
Qiagen Enzym Mix		1 µl
RNase-freies Wasser		7,625 µl
Template		4 µl

Duplex-RT-qPCR-Bedingung:

30 min bei 50 °C		reverse Transkription
15 min bei 95 °C		Denaturierung
30 s bei 95 °C	} 40 Zyklen	Denaturierung
1 min bei 54 °C		Primer-Bindung
30 s bei 72 °C		Elongation

4.6 Einfluss von APOBEC3G auf die Partikelproduktion

4.6.1 Ultrazentrifugation (UZ)

Die Aufkonzentrierung von Virusüberständen erfolgte per Ultrazentrifugation unter der Verwendung des SW32Ti-Rotors in der Beckman Optima-L100K Ultrazentrifuge. Zuvor wurden die virushaltigen Überstände bei 4.600xg für 30 min bei 4 °C zentrifu-

giert und steril filtriert, um die enthaltenen Zelltrümmer zu entfernen. Dieser zellfreie Überstand wurde auf ein 20 % Sucrosekissen geschichtet. Anschließend erfolgte eine dreistündige Zentrifugation bei 32.000xg und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert und das Viruspellet in 200 µl PBS aufgenommen.

Für die Aufkonzentrierung der Virusüberstände von 6-Well-Platten wurden die Virusüberstände in 2 ml Eppendorf-Tubs überführt und 5 min bei 4.000 rpm zellfrei zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und 3 Stunden bei 23.880xg und 4 °C wurden die Viren in einer Micro 200 R Zentrifuge pelletiert. Das Viruspellet wurde in 55 µl PBS resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

4.6.2 p27 ELISA

Eine 96-Well-Platte wurde mit 1:50 verdünnten Antikörper gegen p27-Capsid in Carbonatpuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Platte wurde dreimal mit PBST (PBS mit 0,05 % Tween) gewaschen und dann mit 200 µl einer Blockierungslösung (2%igem Milchpulver in PBS) für eine Stunde bei 37 °C blockiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Viren wurden durch die Zugabe von 0,2%igem Tween mit einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur inaktiviert. Das Virus und die p27 Capsid-Standard-Verdünnungsreihe (Konzentration 100 ng/ml) wurden in PMT (2 % Milchpulver in PBST) entweder in 1:2 oder 1:3 Verdünnungsstufen verdünnt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter dreimaliger Waschung wurde 50 µl der primären Antikörper-Lösung (VD K140 Serum (anti-p27); 1:400 Verdünnung in PMT) auf die Platten pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurde nach dreimaliger Waschung 50 µl die sekundären Antikörper-Lösung (anti-rabbit HRP von Sigma (A0545); 1:2500 Verdünnung in PMT) auf die Platten für eine Stunde bei 37 °C gegeben. Die Farbentwicklung erfolgte durch die Zugabe von 50 µl Entwicklungslösung bestehend aus 12,5 ml Phosphat-Citrat-Puffer, 5 mg OPD-Tablette und 12 µl einer 30%igem Wasserstoffperoxidlösung. Nach einer circa zehnmütigen Inkubation wurde 25 µl einer 25%igen Schwefelsäurelösung dazugegeben, um die Farbreaktion abzustoppen. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader bei 492 nm und 620 nm. [9]

5. Ergebnisse

5.1 Klonierung des pNTAP-A3G Vektors

Um HMM APOBEC3G Granula und damit assoziierte RNAs und Proteine spezifisch aufzureinigen zu können, musste zunächst die APOBEC3G Sequenz in einen geeigneten Vektor (hier pNTAP-B) umkloniert werden. Diese Klonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI (siehe Abbildung 15 A). Laut der NCBI Datenbank besitzt das APOBEC3G Protein eine Gensequenz mit einer Länge von 1.186 bp [10]. Mit Hilfe eines Kontrollverdaus und der Sanger-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die APOBEC3G Nukleotidsequenz korrekt und im richtigen Leserahmen in den pNTAP-Vektor mit einer Größe von 4,5 kb hineinkloniert wurde.

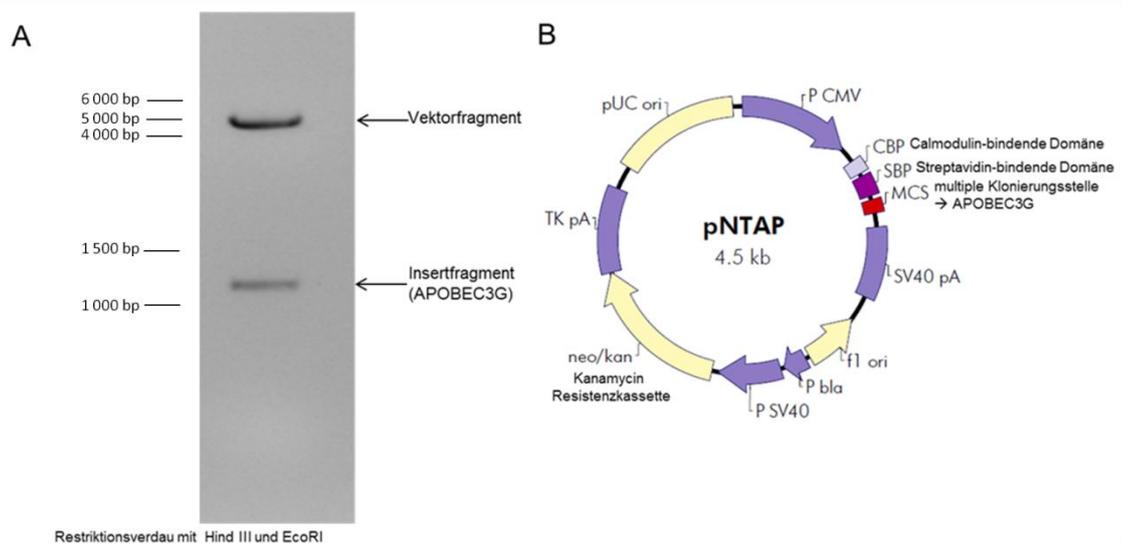


Abbildung 15: Klonierung des pNTAP-A3G Vektors: A) Restriktionsverdau des pNTAP-A3G Vektors mit Hind III und EcoRI B) Darstellung des pNTAP-Leervektors mit einer enthaltenen Kanamycinresistenz-Kassette (neo/kan), einer Calmodulin-bindenden Domäne (CBP), einer Streptavidin-bindenden Domäne (SBP) und einer Multiklonierungsstelle (MCS), in der APOBEC3G hineinkloniert wurde [8, modifiziert].

5.2 Tandem-Affinitätsausreinigung (TAP) von modifiziertem APOBEC3G Protein

Um die spezifische Assoziation der HERV-K(HML-2) RNA mit der HMM APOBEC3G Granula nachzuweisen, wurden HEK-293T- und Tera-1-Zellen mit fünf verschiedenen Ansätzen transfiziert (siehe Tabelle 20) und anschließend mit Natriumarsenit gestresst, um die Bildung von der HMM APOBEC3G Granula zu induzieren. Diese Granula wurde dann per Tandem-Affinitätsaufreinigung isoliert und weiter analysiert. Für den ersten Ansatz wurden die Zellen (HEK-293T- oder Tera-1-Zellen) mit pNTAP-A3G, tagged oriHERV-K113, Rec-V5 und Staufen-1-Flag transfiziert. Die weiteren Ansätze sind Kontrollansätze, in denen jeweils eine Komponente durch den entsprechenden Leervektor oder ein anderes, nicht-bindendes Protein ersetzt wurde (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Ansatz für die Transfektion von den HEK-293T- und den Tera-1-Zellen

	1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz	4. Ansatz	5. Ansatz
8 µg	pNTAP- A3G	pNTAP- A3G	pNTAP- A3G	pNTAP-B (Leervektor)	A3G CFP (ohne Tag)
25 µg	tagged oriHERV- K113	tagged oriHERV- K113	pBSK (Leervektor)	tagged oriHERV- K113	tagged oriHERV- K113
10 µg	Rec-V5	pBud (Leervektor)	Rec-V5	Rec-V5	Rec-V5
5 µg	Staufen-1- Flag	Staufen-1- Flag	Staufen-1- Flag	Staufen-1- Flag	Staufen-1- Flag

5.2.1 Spezifische Aufreinigung des modifizierten APOBEC3G Proteins mittels Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP)

Zur Kontrolle der Tandem-Affinitätsaufreinigung wurden Proben während der Aufreinigung entnommen. Pro Ansatz wurden fünf verschiedene Überstände der einzelnen Aufreinigungsschritte auf das Vorhandensein von Proteinen im SDS-Coomassie-Gel untersucht: nach der Zellyse (1), nach der Bindung an die Streptavidin-Beads (2), nach der Eluierung von den Streptavidin-Beads (3), nach der Bindung an die Calmodulin-Beads (4) und nach der Eluierung von den Calmodulin-Beads (5).

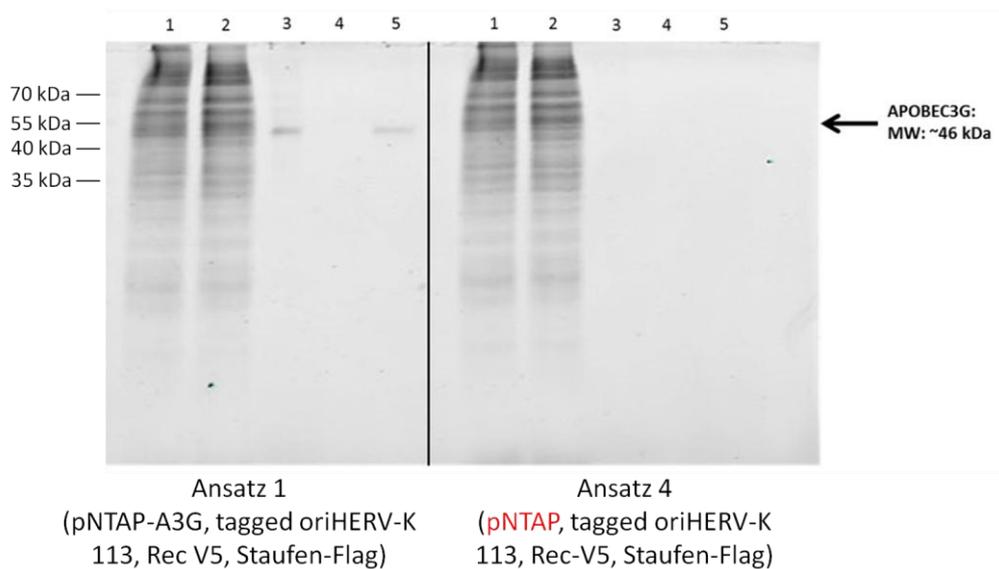


Abbildung 16: Darstellung eines Coomassie-gefärbten Proteingels für die Ansätze 1 und 4 (siehe Tabelle 20), in denen die jeweiligen TAP-Überstände analysiert wurden. 1: Zellysat, 2: Überstand nach Bindung an die Streptavidin-Beads, 3: Eluat von den Streptavidin-Beads, 4: Überstand nach Bindung an die Calmodulin-Beads, 5: Eluat von den Calmodulin-Bead, Rot markiert ist der Vektor, der bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurde, und mit dem Pfeil wird die Höhe des APOBEC3G Proteins mit einer Größe von ca. 46 kDa dargestellt.

In der Abbildung 16 ist der Ansatz 1 und der Ansatz ohne pNTAP-A3G (4) dargestellt. Im Zellysat (Überstand 1) befanden sich alle zellulären Proteine, sodass viele Proteinbanden im Coomassie-gefärbten Proteingel ersichtlich sind. Die meisten dieser Proteine konnten nicht an die Streptavidin-Beads binden, sodass wiederum im Überstand 2 viele Proteinbanden erkennbar sind, die ebenfalls im Überstand 1 nachgewiesen wurden. Im Überstand nach der Eluierung von den Streptavidin-Beads (3) ist nur im Ansatz 1 eine deutliche Bande bei ca. 46 kDa erkennbar. Dieses Protein kann auch an die Calmodulin-Beads binden, da nach der Bindung an die Calmodulin-Beads (4) keine Proteinbande mehr bei 46 kDa ersichtlich ist, jedoch

das Protein nach der Eluierung von den Calmodulin-Beads (5) wieder nachgewiesen werden konnte.

Im Ansatz ohne pNTAP-A3G (4) sind im dritten, vierten und fünften Überstand keine Proteinbanden zu erkennen, was zeigt, dass nur in der ersten Probe APOBEC3G spezifisch angereichert und aufgereinigt wurde und es sich somit nicht um eine Kontamination handelt.

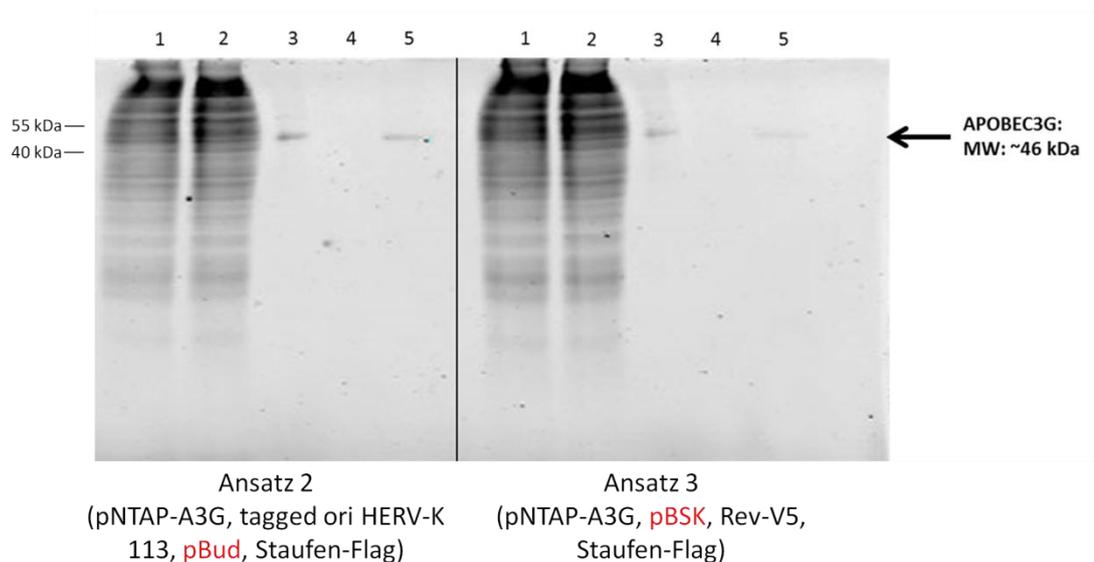


Abbildung 17: Darstellung eines Coomassie-gefärbten Proteingels für die Ansätze 2 und 3 (siehe Tabelle 20), in denen die jeweiligen TAP-Überstände analysiert wurden; 1: Zellysate, 2: Überstand nach Bindung an die Streptavidin-Beads, 3: Eluat von den Streptavidin-Beads, 4: Überstand nach Bindung an die Calmodulin-Beads, 5: Eluat von den Calmodulin-Beads, Rot markiert sind die Vektoren, die bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurden, und mit dem Pfeil wird die Höhe des APOBEC3G Proteins mit einer Größe von ca. 46 kDa dargestellt.

Die Spezifität der Aufreinigung konnte auch in den anderen Ansätzen gezeigt werden. In den Ansätzen ohne Rec (2) und ohne tagged oriHERV-K113 (3) ist das Aufreinigungsergebnis ähnlich gegenüber dem Ansatz 1 (siehe Abbildung 16). Es konnte das APOBEC3G Protein in beiden Ansätzen über Streptavidin- und Calmodulin-Beads aufgereinigt werden (siehe Abbildung 17). Im Ansatz 2 soll überprüft werden, ob durch das Fehlen des zusätzlichen transfizierten Rec Plasmids der Transport von HERV-K(HML-2) RNA verringert wird und somit eventuell weniger HERV-K(HML-2) RNAs in der HMM APOBEC3G Granula im Gegensatz zum Ansatz 1 detektiert wird. Im Ansatz 3 wurde kein tagged oriHERV-K113 Plasmid in die Zelle transfiziert, sodass es zwar zu einer Bildung der HMM APOBEC3G Granula kam (siehe Abbildung 17), aber keine tagged oriHERV-K113 RNA in dieser HMM APOBEC3G Granula nachgewiesen werden kann.

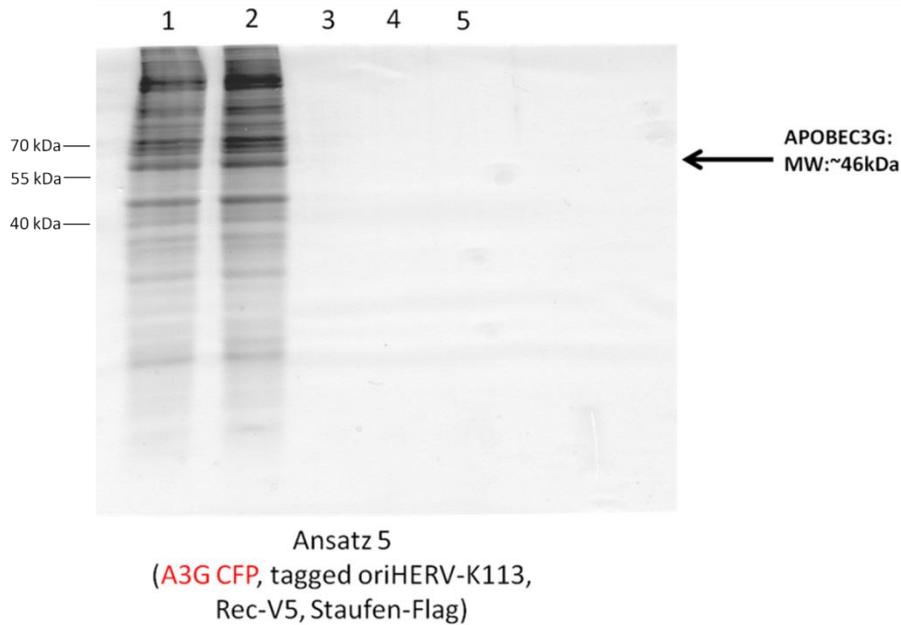


Abbildung 18: Darstellung eines Coomassie-gefärbten Proteingels für den Ansatz 5 (siehe Tabelle 20), in denen die jeweiligen TAP-Überstände analysiert wurden. 1: Zellysat, 2: Überstand nach Bindung an die Streptavidin-Beads, 3: Eluat von den Streptavidin-Beads, 4: Überstand nach Bindung an die Calmodulin-Beads, 5: Eluat von den Calmodulin-Beads, Rot markiert sind die Vektoren, die bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurden, und mit dem Pfeil wird die Höhe des APOBEC3G Proteins mit einer Größe von ca. 46 kDa dargestellt.

Im Ansatz (5), in dem pNTAP-A3G gegen A3G CFP ausgetauscht wurde, wurde hingegen ein nicht-modifiziertes APOBEC3G Protein (ohne Tags) gebildet. Dieses Protein kann nicht an die Calmodulin- bzw. Streptavidin-Beads binden (siehe Abbildung 18), sodass ein ähnliches Ergebnis wie im Ansatz ohne pNTAP-A3G (4) zu erkennen ist (siehe Abbildung 16).

Erwartungsgemäß wurden in den Ansätzen, in denen der pNTAP-A3G Vektor in die Zellen transfiziert wurde, nach den Elutionsschritten eine Bande bei ca. 46 kDa [45] detektiert, sodass wahrscheinlich das modifizierte APOBEC3G Protein erfolgreich aufgereinigt wurde.

5.2.2 Spezifitätsanalyse des APOBEC3G Antikörpers gegenüber HEK-293T-Zelllysaten

Während der Tandem Affinitätsaufreinigung wurde ein ca. 46 kDa großes Protein angereichert und aufgereinigt. Um nachzuweisen, dass es sich dabei tatsächlich um APOBEC3G handelt, wurde ein Western Blot durchgeführt. Zuvor wurden die Antikörper auf ihre Spezifität getestet. Dafür wurden verschiedene HEK-293T-Zelllysate verwendet: untransfiziert (1), mit pNTAP (2) und mit pNTAP-A3G (3).

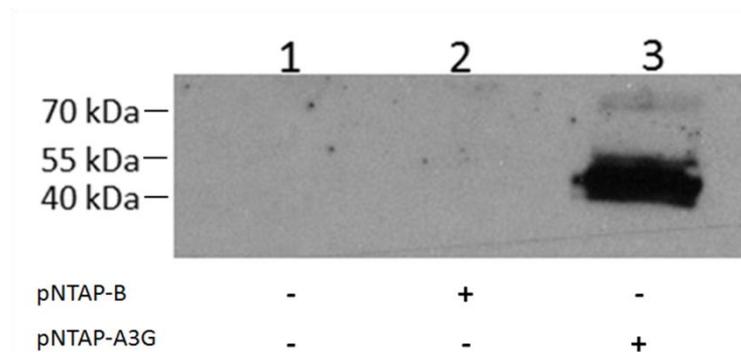


Abbildung 19: Darstellung der Spezifität des APOBEC3G Antikörpers gegenüber den verschiedenen HEK-293T-Zelllysaten: 1: Zelllysate ohne Transfektion, 2: Zelllysate mit Transfektion von pNTAP-B, 3: Zelllysate mit Transfektion von pNTAP-A3G; Der primäre Antikörper Anti-A3G von Abcam wurde 1:250 und der sekundäre Antikörper Anti-Ziege HRP von Dako 1:2000 eingesetzt.

Ein spezifischer APOBEC3G Nachweis (46 kDa-Bande, siehe Abbildung 19) erfolgte nur in dem HEK-293T-Zellen, in die der pNTAP-A3G Vektor transfiziert wurde. Eine zusätzliche schwache Proteinbande ist auch auf Höhe der 70 kDa Referenzbande nachweisbar, wobei es sich wahrscheinlich um APOBEC3G Dimere handelt. Die Negativkontrollen sind erwartungsgemäß negativ, da HEK-293T-Zellen endogen kein APOBEC3G Protein produzieren.

5.2.4 Nachweis von APOBEC3G in TAP-Überständen aus HEK-293T- und Tera-1-Zellen

Nachdem die Spezifität des APOBEC3G Antikörpers verifiziert wurde, wurden die Überstände der HEK-293T- und Tera-1-Zellen aus der TAP (siehe 5.2.2) auf das Vorhandensein von APOBEC3G untersucht.

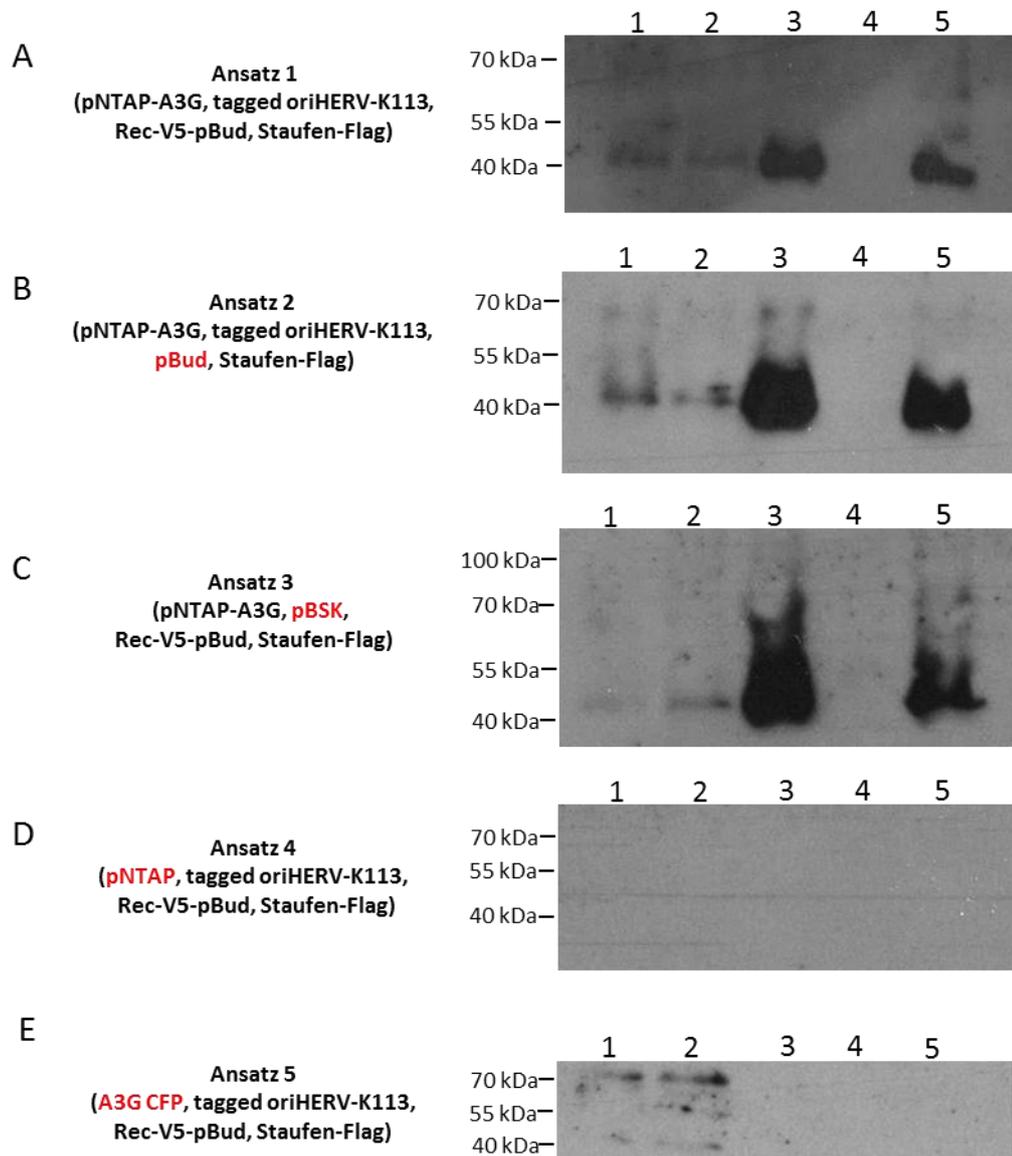


Abbildung 20: Darstellung der APOBEC3G Western-Blot Ergebnisse für die Ansätze 1 bis 5 von den HEK-293T TAP-Überständen (siehe Tabelle 20): A: Ansatz 1, B: Ansatz 2 (ohne Rec), C: Ansatz 3 (ohne tagged oriHERV-K113), D: Ansatz 4 (ohne pNTAP-A3G), E: Ansatz 5 (mit A3G CFP statt pNTAP-A3G), 1: Zelllysat, 2.: Überstand nach Bindung an die Streptavidin-Beads, 3: Eluat von den Streptavidin-Beads, 4: Überstand nach Bindung an die Calmodulin-Beads, 5: Eluat von den Calmodulin-Beads. Der primäre Antikörper Anti-A3G von Abcam wurde 1:250 und sekundärer Antikörper Anti-Ziege HRP von Dako 1:2000 verwendet. Rot markiert sind die Vektoren, die bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurden.

Im Ansatz 1 und den Ansätzen ohne Rec (2) und ohne tagged oriHERV-K113 (3) wurde das modifizierte APOBEC3G im Überstand 1 bis 3 und 5 spezifisch bei ca. 46 kDa nachgewiesen (siehe Abbildung 20). APOBEC3G wurde im Zelllysat detektiert, d. h. die HEK-293T-Zellen wurden erfolgreich mit dem pNTAP-A3G Vektor transfiziert und produzierten das modifizierte APOBEC3G Protein. Nach Bindung der Streptavidin-bindenden Domäne des APOBEC3G Proteins an die Streptavidin-Beads wurde im Überstand 2 immer noch APOBEC3G nachgewiesen, sodass das APOBEC3G Protein nicht vollständig an die Streptavidin-Beads binden konnte. Der überwiegende Teil des APOBEC3G Proteins wurde nach der Eluierung von den Streptavidin-Beads (3) nachgewiesen. Im Überstand nach Bindung an die Calmodulin-Beads (4) wurde APOBEC3G nicht detektiert, was zeigt, dass APOBEC3G vollständig an die Calmodulin-Beads gebunden hat. APOBEC3G wird erst wieder im Eluat von den Calmodulin-Beads (5) sichtbar.

Im Ansatz ohne pNTAP-A3G (4) wurde erwartungsgemäß keine APOBEC3G Bande und im Ansatz mit A3G CFP statt pNTAP-A3G (5) wurde das APOBEC3G Protein nur im Überstand 1 und 2 detektiert (siehe Abbildung 20), da dieses APOBEC3G Protein kein modifiziertes Protein ist und somit nicht an die Calmodulin- bzw. Streptavidin-Beads binden konnte.

Das modifizierte APOBEC3G Protein wurde also sehr spezifisch und sauber aufgereinigt.

Auch in Tera-1 Zellen wurde APOBEC3G entsprechend transfiziert und anschließend per TAP-Aufreinigung angereichert (siehe Abbildung 21).

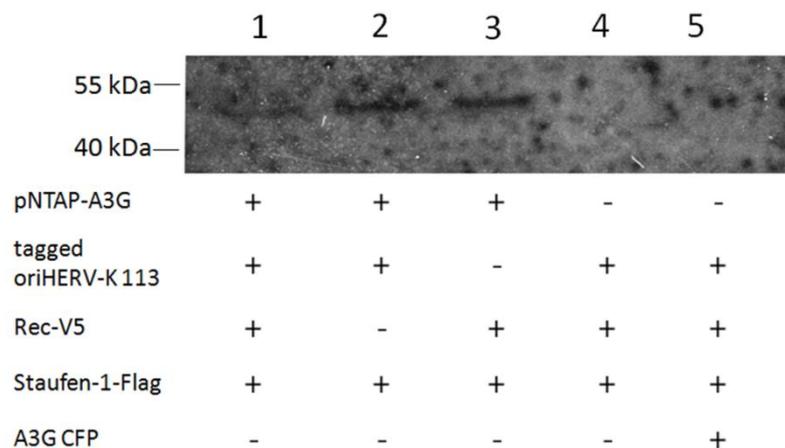


Abbildung 21: Darstellung der APOBEC3G Western-Blot Ergebnisse für die verschiedenen Tera-1 Ansätze nach der finalen Calmodulin Eluierung (TAP): 1: Ansatz 1, 2: Ansatz 2 (ohne Rec), 3: Ansatz 3 (ohne tagged oriHERV-K113), 4: Ansatz 4 (ohne pNTAP-A3G), 5: Ansatz 5 (mit A3G CFP statt pNTAP-A3G). Der primäre Antikörper Anti-A3G von Sigma-Aldrich wurde 1:500 und sekundärer Antikörper Anti-Kaninchen HRP von Sigma-Aldrich 1:2500 verwendet.

Ein spezifischer APOBEC3G Nachweis erfolgte im Ansatz 1 und im Ansatz ohne Rec (2) und ohne tagged oriHERV-K113 (3). In diesen Ansätzen konnte demnach das modifizierte APOBEC3G Protein über Streptavidin- und Calmodulin-Beads aufgereinigt werden (siehe Abbildung 21). In den Ansätzen ohne pNTAP-A3G (4) und mit A3G CFP (5) wurde kein APOBEC3G Protein nachgewiesen.

5.2.3 Nachweis von Staufen-1, Rec und G3BP als Bestandteil der HMM APOBEC3G Granula

In der HMM APOBEC3G Granula befindet sich neben den APOBEC3G Proteinen auch eine Vielzahl von anderen Proteinen. Zwei dieser Proteine sind G3BP („Ras GTPase-activating protein-binding protein“) und Staufen-1. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Proteine mit aufgereinigt wurden. Außerdem wurde das Vorhandensein von HERV-K(HML-2) Rec in der HMM APOBEC3G Granula untersucht. Nur wenn Rec und Staufen-1, als Komponenten der Ribonukleoproteinpartikeln in der Granula zu finden sind, ist der spezifische Transport viraler RNA in diesen Strukturen überhaupt wahrscheinlich. In der nachfolgenden Abbildung 22 ist exemplarisch der Nachweis dieser drei Proteine für den Ansatz 1 dargestellt.

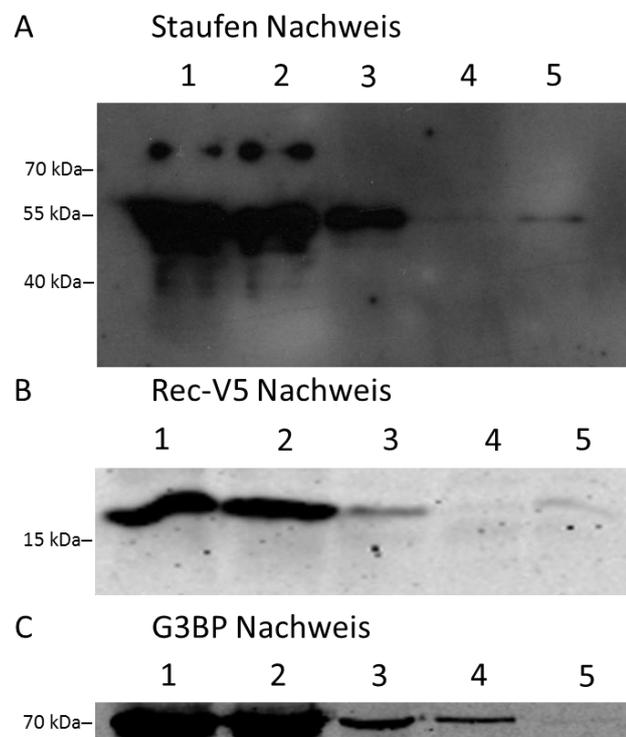


Abbildung 22: Darstellung der Staufen-1, Rec-V5 und G3BP Western-Blot Ergebnisse für den Ansatz 1 während der Tandem-Affinitätsaufreinigung aus den HEK-293T-Zellen: A: Staufen-1 Western Blot Ergebnis: Der primäre Antikörper Anti-Staufen-1 aus dem Rattenserum (1/2) wurde mit einer Verdünnung von 1:4000 und der sekundäre Antikörper Anti-Ratte HRP von Sigma-Aldrich mit einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. B: Rec-V5 Western-Blot Ergebnis: Nach V5-Immünpräzipitation wurde Rec-V5 mit dem Anti-V5 von Serotec in einer Verdünnung von 1:5000 und mit dem Anti-Maus 800 CW von Li-Cor in einer Verdünnung von 1:5000 nachgewiesen. C: G3BP Western-Blot Ergebnis: Der primäre Antikörper Anti-G3BP von Abcam wurde 1:500 und der sekundäre Antikörper Anti-Maus 800 CW von Li-Cor mit einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. 1: Zelllysat, 2: Überstand nach der Bindung an die Streptavidin-Beads, 3: Eluat von den Streptavidin-Beads, 4: Überstand nach der Bindung an die Calmodulin-Beads, 5: Eluat von den Calmodulin-Beads.

Sowohl im Zellysate der HEK-293T-Zellen als auch in den Überständen nach den Eluierungen (Überstand 3 und 5) wurde Staufen-1 im Überstand nachgewiesen, was auf eine enge Assoziation von HMM APOBEC3G und Staufen-1 hindeutet (siehe Abbildung 22 A). Auch G3BP kann in der HMM APOBEC3G Granula nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22 C). Staufen-1 wurde in der Publikation von Chiu *et al.* 2006 bereits als Komponente der HMM APOBEC3G Granula nachgewiesen [32] und G3BP ist ein typisches Stressgranula-assoziiertes Protein [46]. Bei der Co-Aufreinigung von G3BP wurde im Unterschied zum Staufen-1 Protein im Überstand (4) nach der Bindung an die Calmodulin-Beads eine eindeutige Bande detektiert, was darauf hinweist, dass G3BP nur schwach oder indirekt mit APOBEC3G interagiert und Veränderungen der Pufferbedingungen zum Auflösen dieser Verbindung führen. Dennoch ist eine schwache Bande im Überstand nach der Eluierung der HMM APOBEC3G Granula von den Calmodulin-Beads (5) sichtbar.

Um eine mögliche Verbindung zwischen Rec-assoziiertem RNA-Transport und HMM APOBEC3G Granula als vermeintlichen Ort für den HERV-K(HML-2) Silencing-Effekt zu zeigen, wurde die HMM APOBEC3G Granula auch auf das Vorhandensein von Rec untersucht. Der Ansatz 1 zeigt dabei ein ähnliches Aufreinigungsmuster wie bereits bei Staufen-1 gesehen, d. h., Rec-V5 wurde in den Überständen 1 bis 3 und 5 nachgewiesen (siehe Abbildung 22 B), was bedeutet, dass das Kerntransportprotein über die Bindung an HMM APOBEC3G Granula spezifisch co-aufgereinigt wurde.

5.3 Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zum Nachweis von tagged oriHERV-K113 in der HMM APOBEC3G Granula

5.3.1 Bindespezifität der verschiedenen HERV-K113 Primerkonstellationen

Die Entwicklung einer RT-qPCR Methode für den Nachweis von tagged oriHERV-K113 ist entscheidend, um Effekte spezifisch ohne zelluläre HERV-Hintergrundsignale nachweisen zu können.

Der tagged oriHERV-K113 Vektor besitzt eine Mutationsstelle zwischen der 5`LTR und der Gag-Sequenz. Die rückwärts gerichteten Primer wurden so konstruiert, dass diese Primer die mutierte Sequenz enthalten (Primer reverse Mut-2 bis -4) und somit nur an die tagged oriHERV-K113-Sequenz und nicht an den Wildtyp binden sollten (siehe Abbildung 14). Für alle Primerkonstellationen wurde der gleiche vorwärtsgerichtete Primer verwendet, der an die Wildtyp HERV-K113 Sequenz bindet.

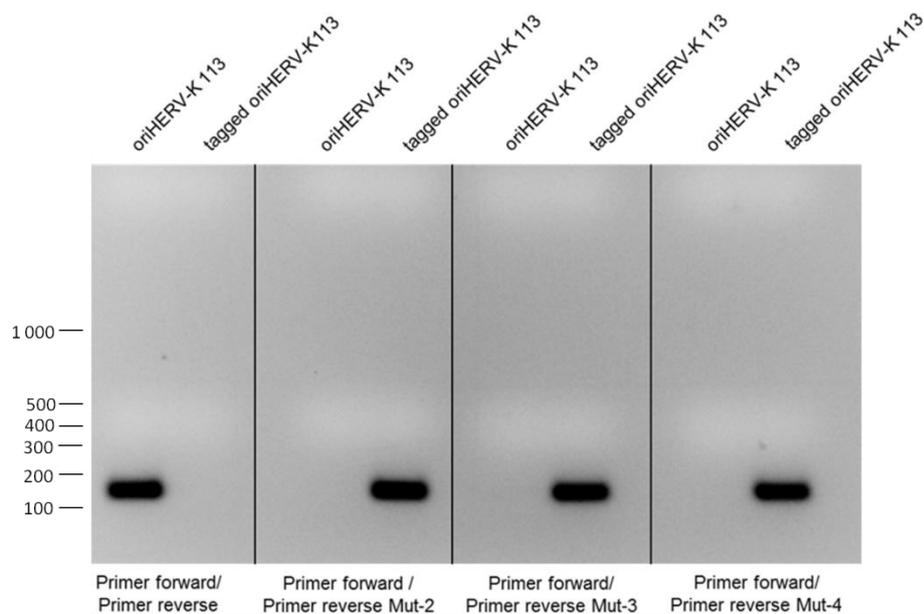


Abbildung 23: Darstellung der Spezifität von den verschiedenen Primerkonstellationen an oriHERV-K113 und tagged oriHERV-K113: Primerpaare: Primer forward/reverse, Primer forward/reverse Mut-2, Primer forward/reverse Mut-3, Primer forward/reverse Mut-4, PCR-Reaktion und Auftrennung der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese.

Aus diesem Experiment geht hervor, dass alle drei rückwärtsgerichteten Primer mit der enthaltenen mutierten Sequenz spezifisch an die tagged oriHERV-K113 Sequenz binden, sodass kein HERV Hintergrundsignal in der RT-qPCR detektierbar sein sollte (siehe Abbildung 23).

5.3.2 Effizienzanalyse der tagged oriHERV-K113 Primerpaare

Nach der Spezifitätsanalyse wurde die Effizienzanalyse durchgeführt. Dafür wurde eine dekadische Verdünnungsreihe des tagged oriHERV-K113 Plasmids angefertigt und die jeweiligen CT-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen mittels qRT-PCR detektiert. Aus den CT-Werten und Konzentrationen in Kopien/ μ l lassen sich für die Standardkurve eine Regressionsgerade, eine Effizienz und ein Bestimmtheitsmaß für die verschiedenen Primerkonstellationen ermitteln. Die Effizienz (E) der Standardkurve wird mit Hilfe der Steigung (m) der erhaltenen Standardkurve berechnet ($E = 10^{-1/m} - 1$) und sollte 100 % \pm 5 % betragen. Aus der Effizienz kann geschlossen werden, ob pro Zyklus eine Verdopplung der Amplifikation erfolgte.

Tabelle 21: Darstellung der Ergebnisse für die tagged oriHERV-K113 Standardreihe im Konzentrationsbereich von 10^3 bis 10^6 Kopien/ μ l für die verschiedenen Primerkonstellationen (Primer forward/reverse Mut-2, Mut-3 und Mut-4) mit Angabe der Effizienz, Regressionsgeraden und Bestimmtheitsmaß; Ergebnisse wurden über eine qRT-PCR ermittelt.

Standardkurve für HERV-K113 (10^3 bis 10^6 Kopien/ μ l)	Primer forward/ Primer reverse Mut-2	Primer forward/ Primer reverse Mut-3	Primer forward/ Primer reverse Mut-4
Effizienz	90,1 %	100,2 %	88,8 %
Regressionsgeraden	$y = -3,583 \cdot \log(x) + 43,78$	$y = -3,318 \cdot \log(x) + 41,70$	$y = -3,642 \cdot \log(x) + 40,53$
Bestimmtheitsmaß R^2	0,966	0,995	0,982

Die Primerkonstellation Primer forward/reverse Mut-3 besitzt die beste Effizienz von 100,2 % gegenüber dem Primerpaar forward/reverse Mut-2 mit 90,1 % und dem Primerpaar forward/reverse Mut-4 mit 88,8 % im Konzentrationbereich von 10^3 bis 10^6 Kopien/ μ l (siehe Tabelle 21), sodass für die Quantifizierung der nachfolgenden Experimente (Nachweis von HERV-K113 RNA in der HMM APOBEC3G Granula) dieses Primerpaar verwendet wurde.

5.3.3 Ermittlung des HERV-K113 Hintergrundsignals in HEK-293T- und Tera-1-Zellen

In diesem Experiment wurden aus HEK-293T- und Tera-1-Zellen die zelluläre RNA isoliert und über eine Duplex-RT-qPCR auf das Vorhandensein von GAPDH und HERV untersucht. Dafür wurden die HERV-FAM und GAPDH-HEX Fluoreszenzsignale mit den Primerpaaren HERV forward/reverse Mut-3 und GAPDH 66-forward/291-reverse detektiert.

Tabelle 22: Fluoreszenz-CT-Wert für das HERV-FAM und GAPDH-HEX Signal für die zelluläre RNA aus den HEK-293T- und den Tera-1-Zellen mit einer Konzentration von 250 ng für die Primerpaare HERV-forward/reverse Mut-3 und GAPDH-66-forward/291-reverse, die in einer Duplex qRT-PCR ermittelt wurden.

CT-Werte	HEK-293T-Zell-RNA	Tera-1-Zell-RNA
HERV-FAM-Signal	-	-
GAPDH-HEX-Signal	18,9	16,9

Es konnte kein HERV-FAM-Signal für die HEK-293T- und Tera-1-Zell-RNA jedoch ein GAPDH-HEX-Signal von 18,9 für die HEK-293T- bzw. 16,9 für die Tera-1-Zell-RNA nachgewiesen werden (siehe Tabelle 22). Es kann also davon ausgegangen werden, dass mit diesem Primerpaar: HERV forward/reverse Mut-3 keine humanen endogenen Retroviren im Hintergrund detektiert werden.

5.3.4 Quantitativer Nachweis von HERV-K(HML-2) RNAs in der HMM APOBEC3G Granula von HEK-293T-Zellen

Nach der Etablierung der RT-qPCR Methode zum quantitativen Nachweis von HERV-K(HML-2) RNAs wurde in einem nächsten Schritt die aufgereinigte HMM APOBEC3G Granula auf das Vorhandensein von HERV-K113 RNA untersucht. Um Signale von kontaminierenden tagged oriHERV-K113 Plasmiden von echten RNA Signalen unterscheiden zu können, wurden die RT-qPCRs sowohl mit als auch ohne vorherige reverser Transkription durchgeführt. In der Tabelle 23 sind die jeweiligen CT-Werte von vier unabhängigen Aufreinigungen für die HERV-FAM- und die GAPDH-HEX-Fluoreszenzsignale mit und ohne reverser Transkription (RT) dargestellt.

Tabelle 23: Duplex RT-qPCR der tagged oriHERV-K113 RNA aus 4 unabhängigen TAP HMM APOBEC3G Aufreinigungen: Nach der TAP-Aufreinigung wurde ein DNase Verdau und eine RNA-Extraktion aus der HMM APOBEC3G durchgeführt, um anschließend die RNA-Konzentration über die RT-qPCR zu messen. Dargestellt sind CT-Werte sowohl mit/ohne vorheriger RT-Schritt für HERV-K(HML-2) RNA (HERV-FAM-Signal-fett) und GAPDH RNA (GAPDH-HEX-Werte in Klammern). Rot markiert sind Vektoren, die bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurden.

CT-Werte	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
	HERV-FAM-Signal (GAPDH-HEX-Signal)		HERV-FAM-Signal (GAPDH-HEX-Signal)		HERV-FAM-Signal (GAPDH-HEX-Signal)		HERV-FAM-Signal (GAPDH-HEX-Signal)	
	Mit RT	Ohne RT	Mit RT	Ohne RT	Mit RT	Ohne RT	Mit RT	Ohne RT
Ansatz 1: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, Rec- V5, Staufen- Flag	28,5 (23,4)	NoCt (NoCt)	28,7 (23,8)	37,4 (35,9)	33,2 (25,5)	39,4 (38,1)	30,9 (21,4)	38,8 (35,4)
Ansatz 2: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, pBud, Staufen-Flag	30,2 (24,87)	NoCt (NoCt)	23,4 (23,1)	35,6 (34,3)	34,2 (26,0)	NoCt (38,2; NoCt)	32,54 (23,8)	35,1 (NoCt; 36,9)
Ansatz 3: pNTAP-A3G, pBSK, Rec- V5, Staufen- Flag	38,5; NoCt (27,3)	37,4; NoCt (NoCt)	NoCt (24,1)	NoCt (36,6)	NoCt (26,6)	NoCt (NoCt)	40,0; NoCt (26,7)	39,6; 39,9 (NoCt)
Ansatz 4: pNTAP, tagged oriHERV, Rec- V5, Staufen- Flag	NoCt; 39,8 (34,0)	39,4; NoCt (NoCt)	35,4 (36,8)	35,7 (NoCt)	39,3 (33,6)	39,9 (39,5)	36,2 (31,2)	35,4 (NoCt)
Ansatz 5: A3G-CFP, tagged oriHERV, Rec- V5, Staufen- Flag	36,9 (35,6)	36,4 (NoCt)	37,2 (33,4)	NoCt (NoCt)	NoCt (32,7)	NoCt (NoCt)	38,5 (36,3)	38,8 (NoCt)

Der Nachweis von HERV-K(HML-2) RNA in aufgereinigter HMM APOBEC3G Granula war in allen vier Parallelversuchen reproduzierbar. Auch im Vergleich zu den verschiedenen Ansätzen konnten ähnliche Unterschiede im RNA-Gehalt festgestellt werden. Im Ansatz 1 Parallelaufreinigung 1 wurden beispielsweise ein HERV-FAM-Fluoreszenzsignal mit einem CT-Wert von 28,5 und ein GAPDH-CT-Wert von 23,4 mit reverser Transkription (RT) gemessen (siehe Tabelle 23). Im Ansatz ohne Rec (2) waren die CT-Werte mit 30,2 für HERV-K(HML-2) und 24,9 für GAPDH etwas höher, was bedeutet, dass insgesamt weniger RNA gemessen wurde. Diese Fluoreszenz-Signale stammten ausschließlich von RNA, die zusammen mit der HMM APOBEC3G Granula aufgereinigt wurde, da ohne RT weder für GAPDH noch für HERV-K(HML-2) Signale messbar waren.

Der Ansatz ohne tagged oriHERV-K113 (3) diente als Negativkontrolle, da in dieser Kontrolle kein tagged oriHERV-K113 Plasmid in die Zellen transfiziert wurde. Dies spiegelte sich in den CT-Werten wieder, da in dieser Kontrolle ein HERV CT-Wert von 38 (mit und ohne RT) nachgewiesen wurde und dieser sich an der Nachweis-

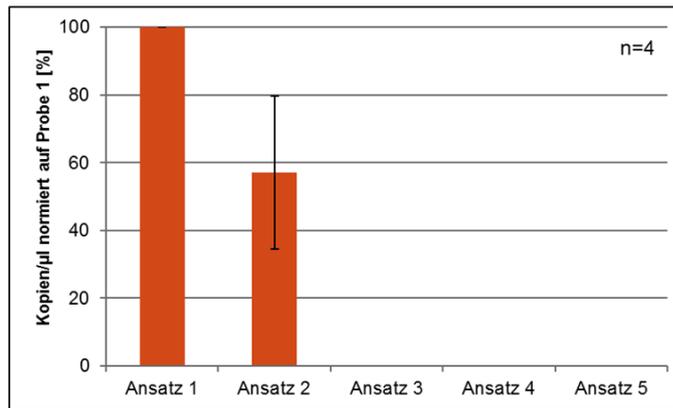
grenze von 38 befand, obwohl für GAPDH ein CT-Wert von 27,3 (mit RT) gemessen wurde. Dies zeigt, dass HMM APOBEC3G Granula aufgereinigt, aber keine tagged oriHERV-K113 RNA darin enthalten war.

In den Ansätzen ohne pNTAP-A3G (4) und mit A3G CFP (5) wurden für die tagged oriHERV-K(HML-2) RNAs entweder kein Signal oder nur in Form von kontaminierender Plasmid-DNA gemessen. Außerdem verminderte sich die GAPDH-CT-Werte im Vergleich zum Ansatz 1 deutlich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass keine HMM APOBEC3G Granula aufgereinigt wurde.

Im nachfolgenden Schritt sollen quantitative Unterschiede in der HERV-K(HML-2) RNA Level in den verschiedenen Ansätzen festgestellt werden. Dafür wurden für die verschiedenen Aufreinigungen die Kopienzahl/µl mit und ohne RT bestimmt. Die Kopienzahl/µl mit RT enthält die RNA und DNA Konzentration und ohne RT nur die DNA Kontaminationen. Deswegen wurde die Kopienzahl/µl ohne RT von der mit RT subtrahiert, um nur die RNA Konzentration in den jeweiligen Ansätzen zu erhalten. Anschließend wurde diese Kopienzahl/µl pro Versuch auf die Probe 1 normiert, um die Versuche untereinander vergleichbar zu gestalten.

Tabelle 24: Ermittlung der quantitativen Unterschiede im HERV-K(HML-2) RNA Levels in der HMM APOBEC3G Granula aus den HEK-293T-Zellen: Angabe der Kopienzahl/µl und daraus resultierender prozentualer Anteil bezogen auf Ansatz 1 für die unabhängigen Versuche mit der Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler für die HEK-293T-Zellen. Für die Kontrollansätze (2-5) sind in Rot die Vektoren markiert, die bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurden.

Kopien/µl	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert \pm Standardfehler
Prozentuale Anteil bezogen auf Ansatz 1					
Ansatz 1: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, Rec-V5, Staufen-Flag	2251 100 %	2546,04 100 %	398,58 100 %	3290,42 100 %	100 % \pm 0 %
Ansatz 2: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, pBud, Staufen- Flag	639,87 28,43 %	3152,34 123,8 %	188,1 47,17 %	914,5 27,8 %	56,8 % \pm 22,78 %
Ansatz 3: pNTAP-A3G, pBSK, Rec-V5, Staufen-Flag	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 % \pm 0 %
Ansatz 4: pNTAP-B, tagged oriHERV, Rec-V5, Staufen-Flag	0 0 %	5,06 0,20 %	1,54 0,39 %	0 0 %	0,15 % \pm 0,09 %
Ansatz 5: A3G-CFP, tagged oriHERV, Rec-V5, Staufen-Flag	0 0 %	7,41 0,29 %	0,25 0,06 %	2,14 0,07 %	0,11 % \pm 0,06 %



pNTAP-A3G	+	+	+	-	-
tagged oriHERV-K113	+	+	-	+	+
Rec V5	+	-	+	+	+
Staufen-1-Flag	+	+	+	+	+
A3G CFP	-	-	-	-	+

Abbildung 24: grafische Darstellung der Mittelwerte der normierten Kopienzahl/ μ l mit Angabe des Standardfehlers für HEK-293T-Zellen für $n=4$

Durch die Normierung wurde der Ansatz 1 auf einen Wert von 100 % festgesetzt. In dem Ansatz ohne Rec (2) war der RNA-Gehalt in der HMM APOBEC3G Granula auf 57,28 % \pm 22,58 % erniedrigt (siehe Tabelle 24 und Abbildung 24). Weder im Ansatz ohne tagged oriHERV-K113 (3) noch im Ansatz ohne pNTAP-A3G (4) und mit A3G CFP (5) war ein signifikantes HERV-K(HML-2) RNA-Signal messbar (0 % für den Ansatz 3, 0,15 % \pm 0,09 % für den Ansatz 4 und 0,18 % \pm 0,06 % für den Ansatz 5 (siehe Tabelle 24)).

Es wurden für die HEK-293T-Zellen vier unabhängige Experimente durchgeführt, um den positiven Rec-Effekt durch die Co-Transfektion des codonoptimierten Rec zu zeigen. Nur im zweiten Versuch im Ansatz 2 wurde eine erhöhte HERV-K113 RNA Konzentration in der HMM APOBEC3G Granula gegenüber dem Ansatz 1 gemessen (siehe Tabelle 24). Alle weiteren Versuche zeigten den positiven Effekt durch die Co-Transfektion von Rec, d. h., dass durch die zusätzliche intrazelluläre Produktion von Rec im Ansatz 1 konnte mehr HERV-K(HML-2) RNA in das Zytoplasma transportiert und somit in der HMM APOBEC3G Granula gegenüber dem Ansatz 2 nachgewiesen werden.

5.3.5 Quantitativer Nachweis von HERV-K(HML-2) RNA in der HMM APOBEC3G Granula in Tera1-Zellen

Tera-1 ist eine Teratokarzinomzelllinie, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie natürlicherweise HERV-K(HML-2) RNAs, Proteine und Partikeln exprimieren [53]. Um die in HEK-293T-Zellen gemessenen Effekte in einem „natürlicheren“ System zu überprüfen, wurden die Aufreinigungen in Tera-1-Zellen wiederholt. Die Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Duplex-RT-qPCR nach der Extraktion der RNA der aufgereinigten HMM APOBEC3G Granula aus den Tera-1-Zellen. Der CT-Wert wurde sowohl mit als auch ohne vorherige reverser Transkription bestimmt und es wurden zwei Parallelexperimente für die verschiedenen Ansätze durchgeführt.

Tabelle 25: Ergebnisse der Duplex RT-qPCR der tagged oriHERV-K113 RNA aus 2 unabhängigen TAP HMM APOBEC3G Aufreinigungen aus den Tera1-Zellen: Nach der TAP-Aufreinigung wurde ein DNase Verdau und eine RNA-Extraktion aus der HMM APOBEC3G durchgeführt, um anschließend die RNA-Konzentration über die RT-qPCR zu messen. Dargestellt sind CT-Werte sowohl mit/ohne vorheriger RT-Schritt für HERV-K(HML-2) RNA (HERV-FAM-Signal-fett) und GAPDH-RNA (GAPDH-HEX-Werte in Klammern). Rot markiert sind Vektoren, die bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurden.

CT-Werte	Versuch 1		Versuch 2	
	HERV-FAM-Signal (GAPDH-HEX-Signal)		HERV-FAM-Signal (GAPDH-HEX-Signal)	
	Mit RT	Ohne RT	Mit RT	Ohne RT
Ansatz 1: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, Rec- V5, Staufen- Flag	33,6 (30,9)	NoCt (39,9; NoCt)	32,8 (29,3)	39,3 (NoCt; 38,4)
Ansatz 2: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, pBud , Staufen-Flag	34,6 (31,9)	NoCt (NoCt)	34,2 (31,4)	36,5 (NoCt; 39,7)
Ansatz 3: pNTAP-A3G, pBSK , Rec-V5, Staufen-Flag	NoCt (30,64)	NoCt (NoCt)	NoCt (32,93)	NoCt (NoCt)
Ansatz 4: pNTAP , tagged oriHERV, Rec- V5, Staufen- Flag	NoCt; 37,5 (35,5)	NoCt (NoCt)	38,3 (34,92)	38,1 (NoCt)
Ansatz 5: A3G-CFP , tagged oriHERV, Rec- V5, Staufen- Flag	NoCt (35,9)	NoCt; 39,3 (NoCt)	NoCt; 40,0 (34,6)	NoCt; 39,5 (NoCt)

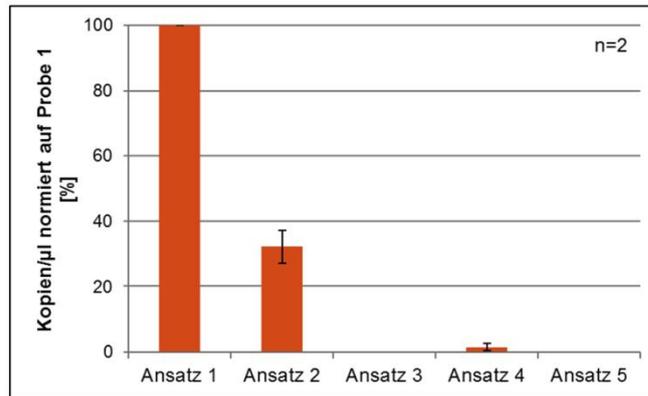
Die Resultate der HEK-293T-Zellen (siehe Tabelle 23) bestätigten sich in den Tera-1-Zellen (siehe Tabelle 25), d. h. es wurden tagged oriHERV-K113 und GAPDH RNA sowohl im Ansatz 1 als auch im Ansatz ohne transfizierten orico Rec (2) nachgewiesen. Im Ansatz ohne tagged oriHERV-K113 (3) wurde kein HERV-FAM- aber

ein GAPDH-HEX-Fluoreszenzsignal detektiert, was zeigt, dass tagged oriHERV-K113 RNA nicht falsch positiv detektiert wurde. Im Ansatz ohne pNTAP-A3G (4) und mit A3G CFP (5) wurden entweder nur tagged oriHERV-K113 Plasmid Verunreinigen oder keine HERV-FAM-Fluoreszenzsignale detektiert. Die GAPDH-HEX-Fluoreszenzsignale reduzierten sich gegenüber den Ansätzen 1, 2 und 3.

Anschließend wurde wie bei den HEK-293T-Zellen die Kopienzahl/ μ l für die verschiedenen Ansätze und Versuche bestimmt. Diese Kopienzahl/ μ l wurde bezogen auf den Ansatz 1 mit Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehlers normiert.

Tabelle 26: Darstellung der quantitativen Unterschiede der HERV-K113 RNA Levels in der HMM APOBEC3G Granula aus den Tera-1-Zellen: Angabe Kopienzahl/ μ l und daraus resultierender prozentualer Anteil bezogen auf Ansatz 1 für die zwei unabhängigen Versuche mit Angabe des Mittelwertes \pm Standardfehler für die Tera-1-Zellen. Für die Kontrollansätze (2-5) sind in Rot die Vektoren markiert, die bezogen auf den Ansatz 1 ausgetauscht wurden.

Kopien/ μ l	Versuch 1	Versuch 2	Mittelwert \pm Standardfehler
prozentuale Anteil bezogen auf Ansatz 1			
Ansatz 1: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, Rec-V5, Staufen-Flag	392,1	752,98	
	100 %	100 %	100 % \pm 0 %
Ansatz 2: pNTAP-A3G, tagged oriHERV, pBud, Staufen-Flag	166,75	295,95	
	25,3 %	39,3 %	32,32 % \pm 4,94 %
Ansatz 3: pNTAP-A3G, pBSK, Rec-V5, Staufen-Flag	0	0	
	0 %	0 %	0 % \pm 0 %
Ansatz 4: pNTAP-B, tagged oriHERV, Rec-V5, Staufen-Flag	10,97	0	
	3,3 %	0 %	2,35 % \pm 1,18 %
Ansatz 5: A3G-CFP, tagged oriHERV, Rec-V5, Staufen-Flag	0	0	
	0 %	0 %	0 % \pm 0 %



pNTAP-A3G	+	+	+	-	-
tagged oriHERV-K113	+	+	-	+	+
Rec V5	+	-	+	+	+
Staufen-1-Flag	+	+	+	+	+
A3G CFP	-	-	-	-	+

Abbildung 25: grafische Darstellung der Mittelwerte der normierten Kopienzahl/ μ l mit Angabe des Standardfehlers für die Tera-1-Zellen für $n=2$

Durch die Normierung erhielt der Ansatz 1 einen Wert von 100 %. Im Ansatz ohne Rec (2) hat das Fehlen des co-transfizierten codonoptimierten Rec Proteins eine Reduzierung der tagged oriHERV-K113 RNA Gehaltes auf 32,32 % \pm 4,94 % zur Folge (siehe Abbildung 25 und Tabelle 26). Dies ist interessant, weil die Tera-1 Zellen epigenetisch Rec produzieren und sie somit das Fehlen des co-transfizierten codonoptimierten Rec ausgleichen könnten. Aber da das endogene Level an Rec wahrscheinlich gegenüber dem co-transfizierten orico Rec zu gering war, wurde trotzdem im Ansatz 2 gegenüber dem Ansatz 1 eine Verminderung der HERV-K(HML-2) RNA Konzentration in der HMM APOBEC3G Granula detektiert. Im Ansatz ohne tagged oriHERV-K113 (3) und im Ansatz mit A3G CFP (5) wurde keine tagged oriHERV-K113 RNA nachgewiesen. Im Ansatz ohne pNTAP-A3G (4) wurden nur tagged oriHERV-K113 RNA-Verunreinigungen von 2,35 % \pm 1,18 % detektiert. Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die HERV-K(HML-2) RNA unter zellulären Stressbedingungen ein Bestandteil der HMM APOBEC3G Granula ist, sodass nachfolgend die Proteintranslation bzw. Partikelproduktion inhibiert sein könnte.

5.4 Einfluss von APOBEC3G auf die HERV-K113 Partikelproduktion

In diesem Experiment wurde der Einfluss von APOBEC3G auf die HERV-K(HML-2) Partikelbildung untersucht. Da HERV-K113 RNA in der HMM APOBEC3G Granula nachgewiesen wurde, müsste mit steigenden APOBEC3G Konzentrationen auch eine Verminderung der HERV-K113 Partikelbildung messbar sein. Dafür wurden die HEK-293T-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen an APOBEC3G von 0 bis 0,5 μg zusammen mit tagged oriHERV-K113, Rec-V5 und Staufen-1-Flag transfiziert. Anschließend wurden die Überstände im ELISA auf p27 Gag untersucht. Zusätzlich wurden in den Zelllysaten GAPDH nachgewiesen, um zytotoxische Effekte ausschließen zu können.

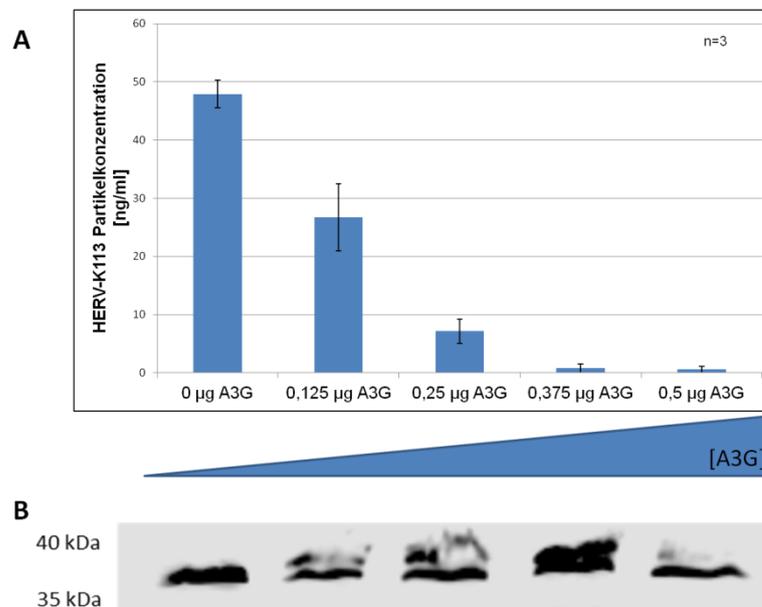


Abbildung 26: Darstellung der Konzentration von HERV-K113 Partikeln bei unterschiedlichen APOBEC3G Konzentration in den HEK-293T-Zellen: HEK-293T-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte mit unterschiedlichen Konzentrationen an pNTAP-A3G und pNTAP-B zusammen mit tagged oriHERV-K113, Rec-V5 und Staufen-1-Flag transfiziert. A) HERV-K113 Partikelkonzentrationsbestimmung wurde mittels einem p27 ELISA bei steigenden APOBEC3G Konzentrationen im Zellüberstand nachgewiesen. Mit dem blauen Dreieck ist die Zunahme an APOBEC3G Konzentrationen dargestellt. B) GAPDH-Nachweis in den HEK-293T-Zelllysaten für die unterschiedlichen APOBEC3G Konzentrationen. Der Primärer Antikörper Anti-GAPDH von Sigma wurde 1:2000 und der sekundärer Antikörper Anti-Maus 800CW von Li-Cor wurde 1:5000 eingesetzt.

Mit einer Erhöhung der APOBEC3G Konzentration wurde eine erniedrigte HERV-K113 Partikelkonzentration im Überstand gemessen (siehe Abbildung 26 A). Wenn kein APOBEC3G Protein in den HEK-293T-Zellen produziert wurde, lag die HERV-

K113 Partikelkonzentration bei $47,8 \pm 2,4$ ng/ml. Die Partikelkonzentration reduzierte sich schon bei einer APOBEC3G Transfektionsmenge von $0,125 \mu\text{g}$ auf $26,7 \pm 5,8$ ng/ml. Stärkere Erhöhungen führten zu stärkeren Inhibitionen ($0,25 \mu\text{g}$ A3G: $7,1 \pm 2,1$ ng/ml, $0,375 \mu\text{g}$: $0,75 \pm 0,75$ ng/ml; $0,5 \mu\text{g}$: $0,58 \pm 0,55$ ng/ml). Gleichzeitig wurde in den verschiedenen Zelllysaten (0 bis $0,5 \mu\text{g}$ APOBEC3G) als Kontrolle für gleichmäßige Zellzahlen GAPDH als zelluläres Wirtsprotein im Western-Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 26 B). Steigende APOBEC3G Proteinsynthese löst keinen zytotoxischen Effekt aus. Somit ist die verminderte HERV-K113 Partikelkonzentration spezifisch auf die erhöhte Menge des gebildeten APOBEC3G Proteins und damit auf eine verstärkte Granula-Bildung zurückzuführen, d. h., dass mit einer 2-fachen erhöhten APOBEC3G Konzentration eine ca. 3,8-fache Inhibition der HERV-K(HML-2) Partikelbildung erfolgte.

6. Diskussion

Die HMM APOBEC3G Granula ist ein Protein/RNA Komplex und enthält eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen und RNAs. In der Publikation von Chiu *et al.* 2006 wurde diese APOBEC3G Granula auf Proteine bzw. RNA Co-Faktoren untersucht [32]. Es erfolgte eine Einteilung der HMM APOBEC3G Granula Komponenten in Staufen-enthaltene RNA-Transport Granula, in Ro Ribnonukleoproteine, in Präspleißosom enthaltene Proteine (mit bspw. dem Importin- β Protein), und in Transkriptionsregulatorproteine [32].

Während der Tandem Affinitätsaufreinigung der HMM APOBEC3G Granula wurden neben dem APOBEC3G-Protein auch HERV-K(HML-2) Rec, Staufen-1 und G3BP Proteinen mit aufgereinigt. Durch den Nachweis von Staufen-1 und G3BP als assoziierte Proteine in der HMM APOBEC3G Granula wurde bewiesen, dass Stressgranula eng mit der HMM APOBEC3G Granula assoziiert ist.

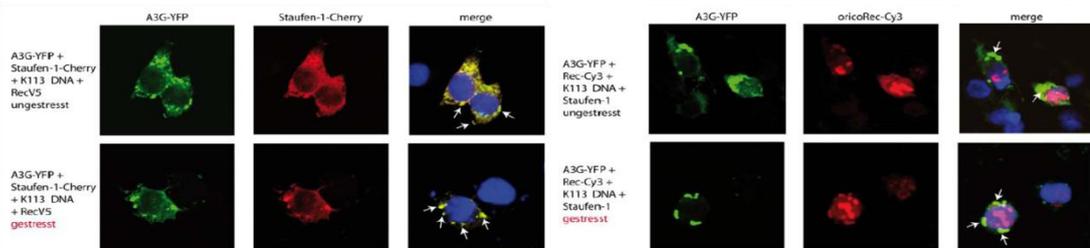


Abbildung 27: Rec/Staufen 1 Co-Lokalisation in HMM APOBEC3G Granula: Die HEK-293T-Zellen wurden entweder mit A3G YFP, Staufen-1-Cherry, HERV-K113 und Rec oder mit A3G YFP, Rec-cy3, HERV-K113 und Staufen-1 transfiziert. Diese transfizierten HEK-293T-Zellen wurden einerseits nicht gestresst und andererseits mit Natriumarsenit gestresst, um eine Co-Lokalisation von Rec und Staufen-1 in der HMM APOBEC3G Granula nachzuweisen, die mit einem Pfeil dargestellt wurden. [27]

Darüber hinaus wurde in der Dissertation von Dr. Kirsten Hanke eine Assoziation von HERV-K(HML-2) Rec mit Staufen-1 und HMM APOBEC3G Granula nachgewiesen (siehe Abbildung 27) [27]. Der gemeinsame Nachweis von Rec und Staufen-1 in der HMM APOBEC3G Granula liefert einen sehr starken Hinweis darauf, dass Rec und Staufen-1 nach dem Export aus dem Zellkern mit der viralen HERV-K(HML-2) RNA assoziiert bleiben. Die Staufen-1 Ribonukleoproteinkomplexe fördern und dirigieren den Export spezifischer RNAs aus dem Zellkern zu den Endo-/Ribosomen für die Proteintranslation im Zytoplasma. In zellulären Stresssituationen, was beispielsweise oxidativer oder thermaler Stress aber auch die Expression von humanen endogenen Retroviren sein könnte, aggregieren Staufen-1 Ribonukleoproteinkomplexe zu Stressgranula [62], sodass die Translationsinitiationen dieser RNAs blockiert sind. Dafür werden dynamische Aggregate bestehend

aus 40S ribosomalen Untereinheiten, Translationsinitiations- und RNA-bindenden Faktoren gebildet [64]. Inwiefern die Ausbildung der Staufen-1 Stressgranula Auswirkungen auf die Translation der humanen endogenen Retroviren besitzt, ist bis jetzt noch nicht bekannt. Die Stressgranula fungiert als Übergangskompartiment zwischen translationsaktiven Polysomen, der HMM APOBEC3G Granula und den „P Bodies“, in denen aktiv RNAs abgebaut werden [61, 64]. Ein ausstehendes Experiment wäre nachzuweisen, ob die HERV-K(HML-2) RNA ein Bestandteil dieser Staufen-1 Stressgranula ist, um somit dem Beweis zu liefern, dass das ubiquitär vorkommende Staufen-1 Protein zusammen mit Rec im Zytoplasma wirklich an der viralen HERV-K(HML-2) RNA gebunden bleibt, aber auch ob HERV(HML-2) RNAs in einer Stresssituation innerhalb dieser Granula gebunden vorliegen und somit inhibiert werden.

Die Ursachen für die Ausbildung von HMM APOBEC3G Granula sind im Detail noch nicht verstanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass HMM APOBEC3G Granula bevorzugt unter Stressbedingungen ausgebildet wird. Es sind eine Vielzahl von sehr dynamischen Prozessen zwischen den einzelnen Proteinaggregationen wie Staufen-1 Granula, P-Bodies oder HMM APOBEC3G Granula beschrieben worden [64, 27]. In gestressten Zellen werden beispielsweise Staufen-1 Ribonukleoproteinkomplexe zu Stressgranula formiert und sind dabei eng mit der HMM APOBEC3G Granula assoziiert (siehe Abbildung 27) [27].

Um HERV-K(HML-2) RNA in der HMM APOBEC3G Granula nachzuweisen, wurde diese Granula lysiert, die RNA extrahiert und mittels Duplex RT-qPCR detektiert. In den Ansätzen 1 bis 5 wurden ähnliche/vergleichbare Resultate für die HEK-293T- und Tera1-Zellen nachgewiesen, d. h. HERV-K(HML-2) RNA konnte in der HMM APOBEC3G Granula im Ansatz 1 und 2 ohne Rec nachgewiesen werden. Die GAPDH RNA wird offensichtlich ebenfalls in der HMM APOBEC3G Granula gebunden, wodurch ein GAPDH RNA Nachweis einen quantitativen Hinweis auf das Vorhandensein von HMM APOBEC3G gibt.

Der RNA Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma bzw. in die HMM APOBEC3G Granula ist Rec abhängig, d. h. in Gegenwart von co-transfiziertem codonoptimiertem Rec war der Transport von HERV-K(HML-2) RNAs in die HMM APOBEC3G Granula effektiver. Das tagged oriHERV-K113 besitzt akzessorische Genabschnitte für die Bildung von Rec, sodass auch ohne zusätzliche Transfektion von orico Rec die HERV-K(HML-2) RNA in der HMM APOBEC3G Granula nachgewiesen werden konnte. Als Kontrolle für die Rec-Abhängigkeit der viralen RNA ist ein Experiment mit einer Rec-defizienten HERV-K113 Mutante denkbar, um nach-

zuweisen, dass durch das Fehlen des Rec Proteins der Transport von teilweise bzw. ungespleißter HERV-K(HML-2) RNAs in die HMM APOBEC3G Granula deutlich reduziert bzw. unmöglich ist. Ebenso könnte durch einen Stau-1 knockdown ebenfalls der Transport der viralen RNA in die HMM APOBEC3G Granula inhibiert werden, da die Stau-1/Rec Ribonukleoproteinkomplexe zum einen für den Transport aus dem Zellkern zu den Ribosomen wichtig sind und zum anderen Stau-1 mit HMM APOBEC3G eng assoziiert ist.

Eine verringerte Proteinexpression und eine Bindung von HERV-K(HML-2) RNAs in der HMM APOBEC3G Granula würden auch dazu führen, dass die HERV-K(HML-2) Partikelkonzentration in Gegenwart von HMM APOBEC3G vermindert wäre [27]. Das Titrationsexperiment bestätigt diese Hypothese, d. h., dass mit einer zweifachen erhöhten APOBEC3G Konzentration es zu einer ca. 3,8-fachen Inhibierung der HERV-K(HML-2) Partikelbildung kam. Diese Reduktion der HERV-K(HML-2) Partikelproduktion ist nicht auf zytotoxische Effekte durch die erhöhte APOBEC3G Proteinbildung zurückzuführen, da GAPDH in annähernd gleichen Konzentrationen im Zelllysat nachgewiesen wurde. Weiterführende Experimente stehen jetzt aus, um zu untersuchen, ob diese HERV-K(HML-2) Partikel virale RNAs enthalten und tatsächlich infektiös sind.

Es wurden bereits Infektionsversuche bei HIV durchgeführt. Das besondere bei HIV ist das akzessorische Protein Vif („viral infectivity factor“). Vif interagiert mit dem APOBEC3G Protein [76]. Einerseits kann das Vif Protein nach APOBEC3G Interaktion die E3 Ubiquitin Ligase rekrutieren, sodass das APOBEC3G Protein über die E3 Ubiquitin Ligase polyubiquitinyliert wird [76]. Daraufhin wird das APOBEC3G Protein über den Ubiquitin proteasomalen Weg abgebaut [76]. Andererseits kann Vif die APOBEC3G Cytidin Deaminase Aktivität inhibieren, sodass die G zu A Hypermutationen reduziert werden. In verschiedenen Publikationen wurde nachgewiesen, dass APOBEC3G in die viralen Partikeln eingebaut werden können, sodass durch die Anwesenheit von APOBEC3G die Infektiosität der viralen Partikeln beeinflusst sein könnte. Um den Einfluss von APOBEC3G auf die Infektiosität der viralen Partikeln nachzuweisen, wurden verschiedene APOBEC3G Konzentrationen und entweder die provirale Sequenzen mit oder ohne Vif in die virusproduzierende Zelle transfiziert. Anschließend wurden die gebildeten viralen Partikeln normiert und die Infektiosität der viralen Partikeln bestimmt. Das Vif Protein kann die Abnahme der Infektiosität bei steigenden APOBEC3G Konzentrationen in den viralen Partikeln nicht vollständig aufheben. Wenn aber innerhalb der proviralen Sequenz kein Vif enthalten war und somit das virale Protein Vif nicht gebildet wurde, dann reduzierte

sich die Infektiosität der viralen Partikeln schon bei geringen APOBEC3G Konzentrationen erheblich. [75]

Aus diesem Experiment von Wang *et al.* kann vermutet werden, dass auch bei anderen Retroviren die Infektiosität der viralen Partikeln durch die Anwesenheit von APOBEC3G reduziert sein könnte. Die HERV(HML-2) Familie besitzt keine viralen Transkripte für das akzessorische Protein Vif, sodass schon bei geringen APOBEC3G Konzentrationen die Infektiosität der viralen Partikeln verringert sein sollte. Durch diese mögliche Reduzierung der Infektiosität der viralen Partikeln aber durch die nachgewiesene Verringerung der gebildeten viralen Partikeln durch die Anwesenheit des APOBEC3G Proteins wird die Integrität des humanen Genoms vor Re-Infektionen bzw. Re-Integrationen bewahrt.

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass HERV-K(HML-2) RNAs Bestandteil der HMM APOBEC3G Granula ist. Auch für andere endogene Retroelemente konnte eine Assoziation mit und Inhibition durch APOBEC3G gezeigt werden. Das antivirale APOBEC3G Protein ist normalerweise in den HMM APOBEC3G Granula konzentriert und die Bildung dieser Granula ist RNA vermittelt [17], sodass RNA für die Bildung dieser Granula entscheidend ist. Aus vorherigen Experimenten von anderen Forschungsgruppen ist bekannt, dass APOBEC3G bspw. die Retrotransposition von LINE- und ALU- Elementen, die zur Gruppe ohne LTR gehören, inhibieren [67]. Die Inhibition der Retrotransposition dieser endogenen Retroelemente erfolgt jedoch nicht ausschließlich über das APOBEC3G Protein allein, sondern auch auf einer zweiten Kontrollebene über die APOBEC3A und APOBEC3B Proteine [63]. Der Mechanismus der Inhibition durch APOBEC3A und APOBEC3B ist jedoch grundlegend anders [63]. Die Inhibition erfolgt im Gegensatz zu APOBEC3G nicht durch die Multimerisierung im Zytoplasma. Stattdessen wandern die Proteine in den Zellkern und inhibieren dort die Retrotransposition, dem Ort der reverse Transkription für LINE und ALU Elemente [63]. Darüber hinaus spielt die Restriktion der ALU-Sequenzen auf Ebene der HMM APOBEC3G Granula eine wichtige Rolle [32]. Für die Multimerisierung des APOBEC3G Proteins wird die N-terminale Domäne des APOBEC3G Proteins benötigt [67]. Koyama *et al.* 2013 haben nachgewiesen, dass die Aminosäureposition 24-28 innerhalb der CD1-Domäne für die Multimerisierung des APOBEC3G Proteins entscheidend ist [67]. Wenn diese Position mutiert ist, wird der inhibitorische Effekt des APOBEC3G Proteins gegenüber der ALU Retrotransposition aufgehoben [67]. Diese Anti-ALU-Aktivität des humanen APOBEC3G Proteins ist unabhängig von seiner Deaminaseaktivität (CD2-Domäne), da trotz Mutation in der Deaminase-Domäne ALU Retrotranspositionen erfolgen konnten [67].

Diese Ergebnisse wurden auch für die LINE-Elemente (L1-Retrotransposition) bestätigt [67]. Der Nachweis von HERV-K(HML-2) RNAs und Proteinen in der HMM APOBEC3G Granula ist daher ein sehr starkes weiteres Indiz für einen durch APOBEC3G-vermittelten globalen Restriktionsmechanismus gegenüber endogenen Retroelementen.

Literaturverzeichnis

- [1] Chiu YL. Biochemical fractionation and purification of high-molecular-mass APOBEC3G complexes. *Methods Mol Biol.* 2011. 718:185-206.
- [2] Malnati MS, Scaralatti G, Gatto F, Salvatori F, Cassina G, Rutigliano T, Volpi R, Lusso P. A universal real-time OCR assay for the quantification of group-M HIV-1 Proviral load. *Nat Protoc.* 2008. 3(7):1240-8.
- [3] Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M, Malim MH. Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol.* 2007. 81(5):2165-78.
- [4] Hanke K, Liedgens L, Fiddeke K, Wamara J, Kurth R, Bannert N. Staufen-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production. *J Virol.* 2013. 87(20):11019-30.
- [5] Kedersha N, Tisdale S, Hickman T, Anderson P. Real-time and quantitative imaging of mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.* 2008. 448: 521-52.
- [6] Hanke K, Chudak C, Kurth R, Bannert N. The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). *Int J Cancer.* 2013. 132(3):556-67.
- [7] Eckwahl MJ, Telesnitsky A, Wolin SL. Host RNA Packaging by Retroviruses: A Newly Synthesized Story. *MBio.* 2016. 7(1):e02025-15.
- [8] <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/240101.pdf>
- [9] Hohn O, Mostafa S, Norley S, Bannert N. Development of an antigen-capture ELISA for the detection of the p27-CA protein of HERV-K(HML-2). *J Virol Methods.* 2016. 234:186-92.
- [10] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CU013310.1>

- [11] Groom HC, Andersn EC, Lever AM. Rev: beyond nuclear export. *J Gen Virol*. 2009. 90(Pt 6):1303-18.
- [12] Bogerd HP, Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2006. 34(1):89-95.
- [13] Nisole S, Stoye JP, Saïb A. TRIM family proteins: retroviral restriction and anti-viral defence. *Nat Rev Microbiol*. 2005. 3(10):799-808.
- [14] Bannert N, Kurth R. The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006. 7:149-73.
- [15] http://viralzone.expasy.org/all_by_species/66.html
- [16] Henriët S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart JC, Marquet R. Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009. 73(2):211-32.
- [17] Chiu YL, Greene WC. APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009. 364(1517):689-703.
- [18] Chiu YL, Greene WC. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Rev. Immunol*. 2008. 26:317-53.
- [19] Miki T, Takano K, Yoneda Y. The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct*. 2005. 30(2):51-6.
- [20] Koito A, Ikeda T. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Front Microbiol*. 2013. 4:28.
- [21] Gramberg T, Sunseri N, Landau NR. Accessories to the crime: recent advances in HIV accessory protein biology. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2009. 6(1):36-42.

- [22] Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101 Suppl 2:14572-9.
- [23] Magin C, Löwer R, Löwer J. cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J Virol*. 1999. 73(11):9496-507.
- [24] Weiss RA. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 2006. 3:67.
- [25] http://www.hivandmore.de/news/Retrovir_Bulletin_03_2010.pdf
- [26] Hanke K, Hohn O, Liedgens L, Fideke K, Wamara J, Kurth R, Bannert N. Staufen-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production. *J Virol*. 2013. 87(20):11019-30.
- [27] Hanke K. Funktionelle Charakterisierung der HERV-K Proteine Env und Rec. Dissertation. 2010.
- [28] Boller K, Schönfeld K, Lischer S, Fischer N, Hoffmann A, Kurth R, Tönjes RR. Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol*. 2008. 89(Pt 2):567-72.
- [29] Suzuki Y, Craigie R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2007. 5(3):187-96.
- [30] Hohn O, Hanke K, Lausch V, Zimmermann A, Mostafa S, Bannert N. CMV-promoter driven codon-optimized expression alters the assembly type and morphology of a reconstituted HERV-K(HML-2). *Viruses*. 2014. 6(11):4332-45.
- [31] Chudak C, Beimforde N, George M, Zimmermann A, Lausch V, Hanke K, Bannert N. Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2). *Retrovirology*. 2013. 10:140.

- [32] Chiu YL, Witkowska HE, Hall SC, Santiago M, Soros VB, Esnault C, Heidmann T, Greene WC. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103(42):15588-93.
- [33] Beimforde N, Hanke K, Ammar I, Kurth R, Bannert N. Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology*. 2008. 371(1):216-25.
- [34] Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*. 1936. 84(2172):162.
- [35] Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev Invest Clin*. 2004. 56(2):126-9.
- [36] Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980. 77(12):7415-9.
- [37] Mc Clintock B. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1956. 21:197-216.
- [38] Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome Res*. 2002. 12(10):1455-65.
- [39] Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol*. 2001. 11(19):1531-5.
- [40] Lee YN, Bieniasz PD. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog*. 2007. 3(1):e10.

- [41] Moyes DL, Martin A, Sawcer S, Temperton N, Worthington J, Griffiths DJ, Venables PJ. The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics*. 2005. 86(3):337-41.
- [42] Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res*. 2005. 65(10):4172-80.
- [43] Boller K, Janssen O, Schuldes H, Tönjes RR, Kurth R. Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol*. 1997. 71(6):4581-8.
- [44] Bhardwaj N, Montesion M, Roy F, Coffin JM. Differential expression of HERV-K(HML-2) proviruses in cells and virions of the teratocarcinoma cell line Tera-1. *Viruses*. 2015. 7(3):939-68.
- [45] Begleitschein: Abcam Anti-APOBEC3G antibody (ab109727).
- [46] Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol*. 2003. 160(6):823-31.
- [47] Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*. 2007. 8(12):973-82.
- [48] Philipp Kramer. Untersuchung zum Hüllprotein und dem Tropismus des humanen endogenen Retrovirus K. Dissertation. 2011.
- [50] Hahn S, Ugurel S, Hanschmann KM, Strobel H, Tondera C, Schadendorf D, Löwer J, Löwer R. Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008. 24(5):717-23.

- [51] Sauter M, Roemer K, Best B, Afting M, Schommer S, Seitz G, Hartmann M, Mueller-Lantzsch N. Specificity of antibodies directed against Env protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res.* 1996. 56(19):4362-5.
- [52] Burmeister T, Ebert AD, Pritze W, Loddenkemper C, Schwartz S, Thiel E. Insertional polymorphisms of endogenous HERV-K113 and HERV-K115 retroviruses in breast cancer patients and age-matched controls. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004. 20(11):1223-9.
- [53] Boller K, König H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Löwer R, Löwer J, Kurth R. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology.* 1993. 196(1):349-53.
- [54] Johnson WE, Coffin JM. Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96(18):10254-60.
- [55] Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol.* 1995. 2(12):1075-82.
- [56] Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology.* 1987. 156(1):171-6.
- [57] Callahan R, Drohan W, Tronick S, Schlom J. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982. 79(18):5503-7.
- [58] Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, Heidmann T. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res.* 2006. 16(12):1548-56.
- [59] Lee YN, Bieniasz PD. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog.* 2007. 3(1):e10.

- [60] Wichroski MJ, Robb GB, Rana TM. Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog.* 2006. 2(5):e41.
- [61] Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell.* 2007. 25(5):635-46.
- [62] Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J.* 2004. 384(Pt 2):239-46.
- [63] Bogerd HP, Wiegand HL, Hulme AE, Garcia-Perez JL, O'Shea KS, Moran JV, Cullen BR. Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. 103(23):8780-5.
- [64] Anderson P, Kedersha N. RNA granules. *J Cell Biol.* 2006. 172(6):803-8.
- [65] Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci.* 2009. 122(Pt 4):563-73.
- [66] Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, Heidmann T, Schwartz O. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature.* 2005. 433(7024):430-3.
- [67] Koyama T, Arias JF, Iwabu Y, Yokoyama M, Fujita H, Sato H, Tokunaga K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. *PLoS One.* 2013. 8(12):e84228.
- [68] Khatua AK, Taylor HE, Hildreth JE, Popik W. Inhibition of LINE-1 and Alu retrotransposition by exosomes encapsidating APOBEC3G and APOBEC3F. *Virology.* 2010. 400(1):68-75.
- [69] Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology.* 2011. 8:90.

[70] Dewannieux M, Blaise S, Heidmann T. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *J Virol.* 2005. 79(24):15573-7.

[71] Jern P, Sperber GO, Blomberg J. Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology.* 2005. 2:50.

[72] Hanke K, Hohn O, Bannert N. HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep. *APMIS.* 2016. 124(1-2):67-87.

[73] https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae

[74] Hall, T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 1999. 41:95–98.

[75] Wang Y, Kinlock BL, Shao Q, Turner TM, Liu B. HIV-1 Vif inhibits G to A hypermutations catalyzed by virus-encapsidated APOBEC3G to maintain HIV-1 infectivity. *Retrovirology.* 2014. 11: 89.

[76] Fribourgh JL, Nguyen HC, Wolfe LS, DeWitt DC, Zhang W, Yu WX, Rhoades E, Xiong Y. Core Binding Factor Beta Plays a Critical Role by Facilitating the Assembly of the Vif-Cullin 5 E3 Ubiquitin Ligase. *J Virol.* 2014. 88(6): 3309–3319.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift der Verfasserin