



ANALYSE UND QUANTIFIZIERUNG DER FRÜHEN EINTRITTSPHASE DER HERV-K VIREN IN DIE ZELLE

BACHELORARBEIT

Technische Universität Dresden
Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
Fachrichtung Biologie

Angefertigt am

Robert-Koch-Institut Berlin
Fachgebiet 18: HIV und andere Retroviren

zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science (B. Sc.)

eingereicht von
Henriette Schwotzer

Betreuer/Gutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert

Betreuer/Gutachter: Prof. Dr. Christian Dahmann

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	erworbenes Immunschwäche Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare (Einheit für die Genomgröße)
CA	Capsid Protein
Ct	Schwellenwert
DMEM	Zellkulturmedium (<i>Delbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	Verstärkt grünfluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescence protein)
<i>egfp</i>	EGFP-Gen
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Env	virales Hüllprotein (<i>envelope protein</i>)
<i>env</i>	Env-Gen
ERV	Endogene Retroviren
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FBS	Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
g	Zentrifugalkraft
Gag	Gruppen-spezifisches Antigen
<i>gag</i>	Gag-Gen
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
kb	Kilobasenpaar (=1.000 bp)
LB _{amp} – Medium	LB – Medium mit Ampicillin, LB = <i>lysogeny broth</i> (nach G. Bertani)
LTR	<i>long terminal repeats</i>
Luc	Luciferase
MA	Matrixprotein
min	Minuten
mM	Millimolar
MMTV	Maus-Mamatumorvirus
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
Mock	Scheinbehandlung von Reaktionen
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
orico	original codonoptimiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd

PERT	<i>PCR-enhanced reverse transcriptase</i>
<i>pol</i>	Polymerase/RT/RNaseH-Gen
<i>pro</i>	Protease-Gen
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds/revolutions per minute</i> , Einheit für die Drehzahl; Zentrifuge)
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Einheiten (<i>Units</i>)
U3	unique 3'
U5	unique 5'
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
VLP	virusartige Partikel (<i>virus-like particle</i>)
Δ	Delta, ohne
®	eingetragenes Warenzeichen
™	Trademark
°C	Grad Celsius
μm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	2
1.1 Genomischer und struktureller Aufbau von Retroviren am Beispiel von HIV-1.....	4
1.2 Genomorganisation	5
1.3 Replikationszyklus von Retroviren am Beispiel von HIV-1	6
1.4 Endogene Retroviren (ERV)	7
1.5 HERV-K (HML-2).....	8
1.6 HERV-K113	8
2. Materialien und Methoden	9
2.1 Materialien	9
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	14
2.2.2. Zellkultur.....	17
2.2.3 Immunbiochemische Methoden	19
3. Ergebnisse.....	22
3.1 Produktion von Virus-like-Particles (VLPs)	22
3.2 oricoGagCherry.....	25
3.2 Produktion von Virus like Particels (VLPs) mit oricoGagCherry	27
3.3 Virusproduktion und Charakterisierung	30
3.4 FACS	34
4. Diskussion	39
4.1 oricoGagCherry.....	39
4.2 Virusproduktion und Charakterisierung	40
4.4 FACS	42
Quellenverzeichnis	44
Danksagung	46
Selbstständigkeitserklärung	47

Abbildungsverzeichnis

Abb.: 1 Phylogenetischer Stammbaum der Retroviren.....	3
Abb.: 2 Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel von HIV-1 (Modrow et al., 2010)	4
Abb.: 3 provirale Genomstruktur von HIV-1	5
Abb.: 4 Schema des retroviralen Replikaionszyklus (Knipe et al., 2006).....	6
Abb.: 5 Aufbau der HERV-K113 Reporterkonstrukte	23
Abb.: 6 p27 Konzentration verschiedener HERV-K113 Konstrukte.....	23
Abb.: 7 Ergebnisse des Luciferase-Assays.	24
Abb.: 8 Restriktionsverdau des oricoGagCherry -Plasmids	25
Abb.: 9 Transfizierte HEK-293T Zellen	26
Abb.: 10 p27 Konzentration bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen	27
Abb.: 11 C _T -Werte und Standardkurve der real-time PCR	28
Abb.: 12 Gemessene RT-Aktivität über den PERT	29
Abb.: 13 Darstellung der Konzentration des Capsidproteins (p27) von HERV-K113.....	31
Abb.: 14 RT-Aktivität der Konstrukte gemessen über einen PERT-Assay	32
Abb.: 15 p27 Konzentration bei Zugabe von VSV-G bzw. VSV-G _{mut}	33
Abb.: 16 RT-Aktivität bei Zugabe von VSV-G bzw. dessen VSV-G _{mut}	34
Abb.: 17 Ergebnisse des FACS nach einer Infektionszeit von 30 min.....	35
Abb.: 18 Ergebnisse des FACS nach einer Infektionszeit von 4 h	36
Abb.: 19 Ergebnisse des FACS von den Kontrollproben	36
Abb.: 20 Overlay der FACS-Ergebnisse;	37
Abb.: 21 Overlay der FACS-Ergebnisse; Vergleich zwischen VSV-G und VSV-G _{mut}	38

Tabellenverzeichnis

Tab.: 1 Laborgeräte	9
Tab.: 2 Verbrauchsmaterialien	10
Tab.: 3 Software	10
Tab.: 4 Chemikalien und Reagenzien	11
Tab.: 5 Enzyme	11
Tab.: 6 Größenstandards.....	11
Tab.: 7 Puffer	12
Tab.: 8 Primärantikörper	12
Tab.: 9 Sekundärantikörper	12
Tab.: 10 Kommerzielle Kits	12
Tab.: 11 kompetente Bakterienzellen	12
Tab.: 12 Zelllinien	13
Tab.: 13 Nährmedien.....	13
Tab.: 14 Plasmide	13
Tab.: 15 Primer, Sonden und Template.....	13
Tab.: 16 verwendete Restriktionsenzyme mit ihren dazugehörigen Puffern, Inkubationszeit und Temperatur während eines Restriktionsverdaus.....	16
Tab.: 17 Ansatz eines Restriktionsverdaus	17

Zusammenfassung

Der frühe Eintrittsprozess der HERV-K Viren weist noch zahlreiche Fragen auf. Endgültige Untersuchungen in Bezug auf den Entry-Prozess konnten noch nicht getroffen werden. Daher sind Fragen über die Kinetik des intrazellulären Transports oder die Bildung replikationskompetenter Viren nicht endgültig geklärt.^{[1][2]} Durch die Rekonstruktion einer möglichen Wildtypsequenz durch Rückmutationen und einer Codonoptimierung wurde die Expression viraler Proteine verstärkt.^[3] Basierend auf der viralen Wildtypsequenz soll, im Rahmen dieser Arbeit, der Entry-Prozess mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Proteine verfolgt werden. Es handelt sich dabei um ein mit mCherry markiertes oricoGag. Die Auswertung erfolgt dabei durch das FACS und durch lichtmikroskopische Untersuchungen. Fluoreszenzmarkierte Proteine sind für Untersuchungen von viralen Proteinen und intrazellulären Strukturen gut geeignet.

Die Herstellung von fluoreszenzmarkierten reifen und unreifen virus-like particles sollte die Unterschiede während des Eindringens in die Wirtszelle aufzeigen. Reife VLPs werden durch die Protease gebildet, zerfallen, wenn sie in das Cytoplasma gelangen, sehr schnell. Der Vermutung, ob unreife VLPs länger im Cytoplasma bestehen können, sollte nachgegangen werden. Zusätzlich sollten Untersuchungen über die Eintrittsphase durch das infektiöse Glycoprotein VSV-G und der nicht infektiösen Mutante VSV-G_{mut} erfolgen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass fluoreszenzmarkierte VLPs erzeugt werden können. Die Ausbeute an fluoreszenzmarkierte VLPs, in denen keine Protease enthalten ist, konnte in nicht ausreichenden Mengen produziert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Mutante des VSV-G Hüllprotein, welches zur Pseudotypisierung benutzt wurde, dieses Glycoprotein funktionslos macht. Mittels ELISA und PERT konnten die VLP-Präparationen mit einander verglichen werden. Dadurch war es möglich die definierte Menge an VLPs mit einem funktionellen Env bzw. der Kontrolle mit nicht-infektiösem Env, für Infektionsversuche einzusetzen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensität mit VSV-G über einen bestimmten Zeitpunkt verstärkt wird, während es bei VSV-G_{mut} zu keinen Änderungen gekommen ist.

1. Einleitung

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) bezeichnet membranumhüllte Viruspartikel deren Genom aus einzelsträngiger (+)-RNA besteht. Während des Replikationszyklus kommt es zu dem kennzeichnenden Schritt der reversen Transkription. Durch dieses charakteristische Enzym, reverse Transkriptase, sind die Viren in der Lage ihre RNA über ein einzelsträngiges DNA-Intermediat in doppelsträngige DNA umzuschreiben, wodurch die Integration in das Wirtsgenom ermöglicht wird. Die integrierte Virus-DNA wird als Provirus bezeichnet und dient als Template der mRNA-Synthese. Dieser Vorgang widerspricht dem damals geltendem zentralen Dogma des unidirektionalen Flusses der genetischen Information (DNA → RNA → Protein) und war für die Benennung dieser Virusfamilie (*Retroviridae*; „retro“ = lat.: rückwärts, zurück) ausschlaggebend. Die Entdeckung der reversen Transkriptase erfolgte 1970 durch Howard M. Temin, Satoshi Mizutani und David Baltimore.^[4]

Taxonomisch lassen sich die *Retroviridae* in zwei Unterfamilien einteilen – die *Spumavirinae* und die *Orthoretrovirinae*. Letztere bestehen aus den sechs Genera α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren und *Lentiviren* (Abb.: 1). Die Unterscheidung der Subtypen erfolgt dabei durch die Besonderheiten während des Verlaufs der Infektion und den daraus resultierenden Erkrankungen, sowie den morphologischen und genetischen Unterschieden der Viren. Lentiviren lösen langsam fortschreitende Erkrankungen aus und sind zudem für eine z.T. lang andauernde Latenzphase bekannt (lat.: *lentus* = langsam). Bekannte Vertreter der Lentiviren sind die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2. Die *Spumavirinae* umfassen nur das eine Genus der Spumaviren wozu die humanen Spumaretroviren (HRSV) zählen. Die Einteilung der Retroviren basiert auf der Analyse der Virusmorphologie, ihrer Wirtsspezifität und Pathogenese, sowie auch auf Sequenzierungen vollständiger Genome in Bezug auf Sequenzverwandtschaften.^[4]

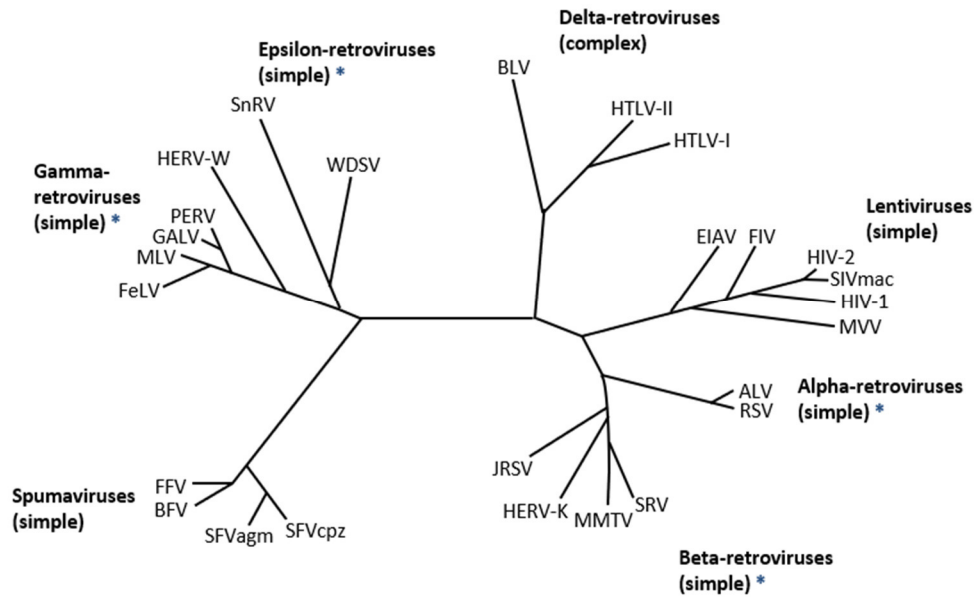


Abb.: 1 Phylogenetischer Stammbaum der Retroviren

Alle sieben Gattungen der Retroviridae und ihre Vertreter. Mit einem Stern gekennzeichnete Untergruppen besitzen neben exogenen auch endogene Vertreter (Abbildung modifiziert, aus: Weiss, 2006)

Weiterhin kann man die Familie auf Grund ihrer Übertragung unterteilen. Der Gentransfer kann nicht nur horizontal (als freigesetztes Partikel) sondern auch vertikal (in die nächste Generation) erfolgen. Die vertikale Übertragung ist jedoch nur möglich, wenn sich das Genom der Proviren in die Keimbahnzellen integriert hat. Man unterscheidet daher zwischen endogenen und exogenen Retroviren. Endogene Retroviren haben sich in das Wirtsgenom integriert und werden über die Keimbahn von der Parental- an die Tochtergeneration übertragen. Exogene Retroviren werden horizontal, von einem Organismus zum anderen, übertragen und besitzen in ihrem Genom alle Informationen, um den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln zu durchlaufen. Dies ist ein entscheidender Unterschied zwischen endogenen und exogenen Retroviren, da die endogene Form meist inaktiviert vorliegt.^[4]

Retrovirusinfektionen kommen häufig bei Wirbeltieren vor, bei denen sie unterschiedliche Krankheiten hervorrufen können. Diese umfassen harmlose Infektionserkrankungen, neurologische Defekte, sowie auch Tumorerkrankungen die lebensbedrohlich für Menschen und Tiere werden können. Zu den bekanntesten Vertretern gehören die humanen Immundefizienzviren, welche die erworbene Immunschwäche AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) auslöst.^[4]

1.1 Genomischer und struktureller Aufbau von Retroviren am Beispiel von HIV-1

Die infektiösen Partikel der unterschiedlichen Retroviren besitzen einen sehr ähnlichen Aufbau und haben einen Durchmesser von ca. 100 nm. Das Capsid ist von einer Hüllmembran (*envelope*) umgeben und leitet sich von der Cytoplasmamembran ab. Im Capsid befindet sich das Virusgenom in Form von zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen.^[4]

An der Hüllmembran sind die transmembranen und externen Glykoproteine gp120 und gp41 verankert, welche als Vorläuferproteine gebildet werden. Innerhalb der Membran befinden sich die netzartig miteinander verbundenen Matrixproteine (p17), die durch Myristinsäure mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden sind. Im Zentrum des Viruspartikels befindet sich das Capsid, bestehend aus den Capsidproteinen (p24), und wird durch das Link-Protein (p6) mit der Hüllmembran verbunden. Im Inneren des Capsids sind zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA in Positivstrang-Orientierung als Virusgenom vorhanden, die mit den Nucleocapsidproteinen (p7) komplexiert sind.^[4]

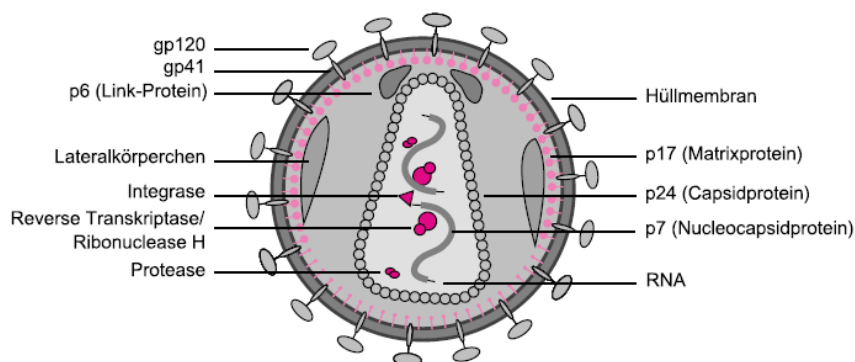


Abb.: 2 Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel von HIV-1 (Modrow et al., 2010)

Capsid-, Matrix-, Nucleocapsid- sowie Link-Proteine gehören zu den gruppenspezifischen Antigenen (Gag-Proteinen), welche vom *gag*-Gen exprimiert werden. Im Viruspartikel sind auch die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease integriert, welche eine wichtige Bedeutung im Replikationszyklus der Viren haben. Die reverse Transkriptase (RT) dient der Transkription viraler RNA in DNA. Die Integration der Virus-DNA in die Wirts-DNA beruht auf der enzymatischen Aktivität der Integrase. Das Enzym Protease kann durch hydrolytische Spaltung der Polypeptidkette die Virus-Proteine in ihre funktionelle Form überführen.^[4]

1.2 Genomorganisation

Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA und umfasst 7-12 kb. Die provirale, genomische Grundstruktur der Retroviren besteht aus den vier Genen *gag*, *pro*, *pol* und *env*. *Gag* (group specific antigen) codiert für das Hauptstrukturprotein, welches nach späterer Reifung die inneren Kernproteine bildet. Wird das Gag-Protein nur allein exprimiert führt dies zur Bildung von nicht-infektiösen, unreifen Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs). Das *pro*-Gen (protease) ist für die Synthese der Protease verantwortlich, wodurch das Gag-Protein in seine Matrix-, Capsid-, und Nucleocapsid-Untereinheit prozessiert werden kann. Dadurch kommt es zu dem Prozess der Partikelreifung. Die viralen Proteine Reverse Transkriptase, Integrase und RNaseH werden von dem *pol*-Gen (polymerase) codiert. Das *env*-Gen (envelope) beinhaltet die Informationen zur Bildung viraler Glycoproteine der Virushülle. Am 5'- und 3'- Ende werden die Virusgene von LTRs (Long Terminal Repeats) begrenzt. Sie bestehen aus der U3-, R- und U5-Region und besitzen regulatorische Funktionen der Genexpression wie zum Beispiel Promotor- und Enhancerelemente. Neben den vier oben beschriebenen Hauptgenen besitzen komplexe Retroviren wie HIV oder HTLV, noch weitere akzessorische Gene, die beispielsweise essentielle regulatorische Gene darstellen und die Replikation verstärken können. Der Replikationszyklus von komplexen Retroviren bringt Proteine mit sich, die mit den zellulären Proteinen interagieren und dadurch auch die Replikation verstärken können.^{[5][6]}

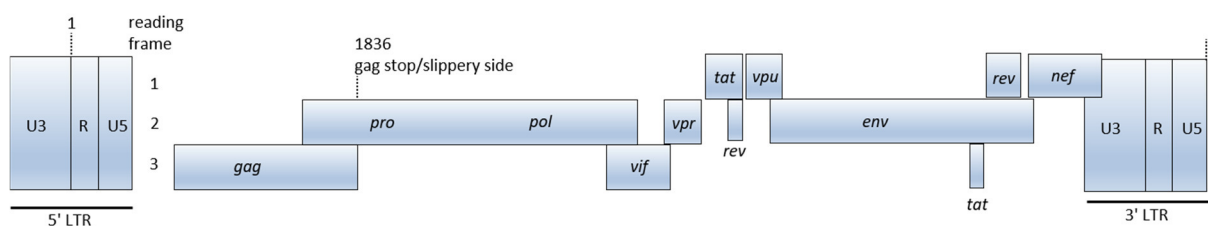


Abb.: 3 provirale Genomstruktur von HIV-1

(Abbildung modifiziert aus „Etablierung eines sensitive n quantitativen Nachweises proviraler HIV-1 – DNA zur Lokalisation der HIV-1 – Reservoirs“; modifiziert nach Shioda, 1989)

1.3 Replikationszyklus von Retroviren am Beispiel von HIV-1

Durch die Anheftung des Retrovirus an die Wirtsmembran beginnt die Infektion. Dabei kommt es zu einer spezifischen Bindung zwischen den viralen Hüllproteinen (Env) mit den Oberflächenrezeptoren der Zielzelle und die Fusion zwischen Virus- und Wirtszellmembran findet statt. Das Nucleocapsid und somit die Reverse Transkriptase, Protease, Integrase und RNaseH gelangen in das Cytoplasma. Man nimmt an, dass die Capsidstruktur aufgelöst wird (uncoating), wodurch die reverse Transkriptase das virale RNA-Genom in DNA umschreiben kann. Eine an das Virusgenom gebundene tRNA dient dabei als Primer. Da die reverse Transkriptase keinen Mechanismus zur Kontrolle der Lesegenauigkeit besitzt, entsteht eine hohe Fehlerrate innerhalb der Transkriptionsprodukte. Daraus resultiert eine große genetische Variabilität der Proviren. Mithilfe des Matrixproteins p17 und eines weiteren Proteins (Vpr) ist der Transport der DNA durch die Kernporen in den Zellkern möglich. Die virale DNA wird nach dem Transport durch die Integrase in das Wirtsgenom integriert und liegt je nach Aktivitätszustand der Zelle latent vor oder wird transkribiert. Das Virus liegt nun als Provirus vor. Abhängig vom Virustyp binden die verschiedenen zellulären Faktoren in der U3-Region der 5'-LTR, wodurch die Transkription durch den zellulären RNA-Polymerase II-Komplex durchgeführt wird. Es entstehen virale mRNA-Moleküle, die der Translation der Gag-, Pro-, Pol- und Env-Vorläuferproteine dienen oder ungespleißten Vollängen RNAs, die in der späteren Zyklusphase als RNA-Genome in Viruspartikel verpackt werden.^[7] Durch die Knospung an der Zellmembran wird das unreife Viruspartikel freigesetzt und kann zum infektiösen Virus reifen, wodurch neue Zellen infiziert werden können.

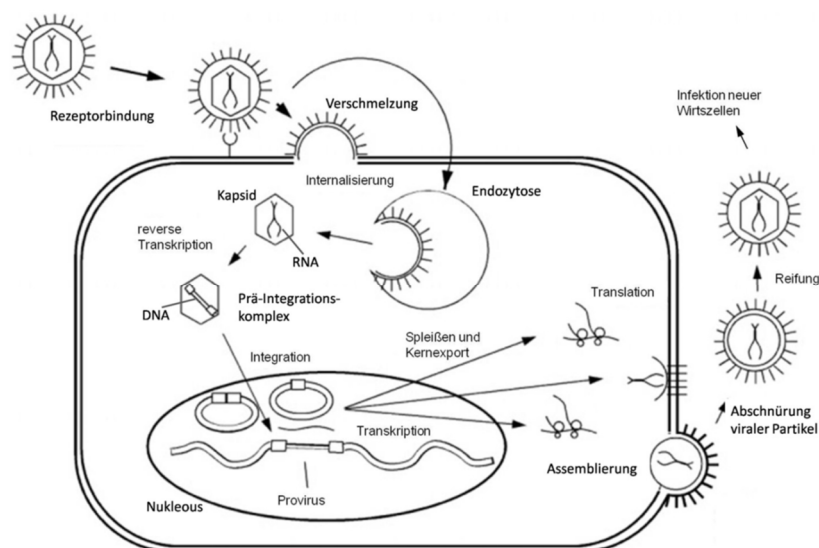


Abb.: 4 Schema des retroviralen Replikationszyklus (Knipe et al., 2006)

1.4 Endogene Retroviren (ERV)

Die Übertragung von Retroviren kann entweder exogen (horizontale Übertragung) durch Bildung neuer infektiöser Viruspartikel erfolgen, oder endogen (vertikal) erfolgen. Bei der endogenen Übertragung werden die Proviren als Bestandteil der DNA von Keimbahnzellen von der Parental- an die Tochtergeneration weitergegeben. Endogene Retroviren sind somit in allen somatischen Zellen inseriert. Retrovirale Proviren, die den Ursprung heutiger humaner endogener Retroviren bilden, haben sich vor Millionen von Jahren in das Genom des Menschen eingebaut.^[3] Auf Grund des Selektionsdrucks und Anhäufungen von Mutationen, Rekombinationen und Deletionen ist der Großteil dieser Viren nicht mehr replikationskompetent und liegt teilweise nur fragmentiert vor. Nur wenige endogenen Retroviren besitzen noch ein vollständiges Genom.

Im Zusammenhang mit der systematischen Sequenzierung des humanen Genoms durch das Human Genom Sequencing Consortium 2001 stellte sich heraus, dass dieses zu ca. 8 % aus Sequenzen besteht, die sich endogenen Retroviren bzw. LTR-Elementen zuordnen lassen.^[8] Die Entdeckung von replikationskompetenten Retroviren in Mäusen, Schafen und anderen Säugern, die in Verbindung mit einigen Formen von Krebs assoziiert sind, sind Grund für die Forschung und Identifizierung neuer Humanen Endogenen Retroviren (HERVs).

Einige tierische Retroviren können sowohl exogene als auch endogene Retroviren ausbilden. Dazu gehören zum Beispiel das Porcine Endogene Retrovirus (PERV) oder auch das Feline Leukämievirus (FeLV) in Katzen.^[9] Mithilfe bioinformatischer Analysen und Genom-Datenbanken werden die meisten HERVs bzw. ihre Reste identifiziert. Jedoch besitzen nur wenige dieser Proviren einen intakten offenen Leserahmen für die Hauptproteine Gag, Pol und Env. Trotz der großen Anzahl an inaktiven Proviren ist die Expression von mRNA und Proteinen in verschiedenen HERV-Sequenzen in humanen Geweben nachweisbar. Zudem gibt es viele Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Autoimmun-Krankheiten und dem Vorhandensein bestimmter endogener Retroviren vermuten lassen.

1.5 HERV-K (HML-2)

Die HERV-K Familie gehört zu den β -Retroviridae und zählt zu den jüngsten und am besten erhaltene Proviren. Die Integration der HERV-K Familie erfolgte vor ca. 30 Millionen Jahren in die Keimbahnzellen.

Auf Grund von Sequenzhomologien im *pol*-Gen wird sie in sechs Gruppen unterteilt, HML 1-6. Durch die Ähnlichkeit des Virus zu dem „mouse mammary tumor“ (MMTV) resultierte der Name „human MMTV like“, kurz HML. Charakteristisch für diese Familie ist eine Primerbindestelle, die mit einer tRNA für die Aminosäure Lysin komplexiert vorliegt, weshalb der Einbuchstaben-Code für Lysin, das K, an den Namen angefügt wurde.^[6] Diese Gruppe ist sehr gut untersucht. Es gehören etwa 90 Proviren zu ihr, die weitestgehend vollständig und somit intakt sind.^[10] Daher ist die Bildung von retroviralen Proteinen und Viruspartikeln möglich. HERV-K besitzt ein *rec*-Gen, das regulatorisch zur Expression der viralen Proteine beiträgt. Es stellt ein funktionelles Homolog zu dem *rev*-Gen des HIV, dem *rex* des HTLV und dem *rem*-Gen des MMTV dar.^[11] Im Gegensatz zu den simplen Retroviren, welche keine akzessorischen Proteine besitzen, hat HERV-K solche.

1.6 HERV-K113

Das zuletzt integrierte und damit „jüngste“ Provirus ist das HERV-K113. Der Zeitpunkt der ersten Integration wird vor ca. 2 Millionen Jahre geschätzt. Das Provirus liegt auf Chromosom 19p13.11 und noch nicht gänzlich im humanen Genom fixiert.^[12] Während das Provirus bei der kaukasischen Bevölkerung eher selten vorkommt, ist es innerhalb der afrikanischen Abstammung mit 30 % recht häufig zu finden.^[13] Es besitzt vollständige Leserahmen für alle beschriebenen viralen Gene, die aber in den bekannten Sequenzen durch Mutationen inaktiv gemacht worden sind. Es ist denkbar das aufgrund vom Polymorphismus ein replikationskompetentes HERV-Provirus innerhalb der humanen Population existiert. Bislang ist es jedoch noch niemandem gelungen ein funktionelles HERV-K(HML-2) Provirus zu entdecken, welches im Stande ist infektiöse Viruspartikel zu bilden.^{[14][15]} Durch Sequenzvergleiche verschiedener HERV-K Familien war es möglich eine Konsensussequenz zu entwerfen, wodurch HERV-Partikel gebildet werden konnten. Diese Virionen sind infektiös und können in das Wirtsgenom integrieren, aber eine Replikation war noch nicht nachweisbar.^{[16][17]}

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Tab.: 1 Laborgeräte

Geräte	Hersteller
BD LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences
Centifuge 5810R	Eppendorf
Centrifuge 5415D	Eppendorf
CFX96™ Real-Time System C1000	Bio-Rad
Eclipse TS 100 Mikroskop	Nikon
Ecotron (Inkubationsschüttler)	INFORS HT
Geldokumentationsanlage	PHASE GmbH
Herasafe™ KS12	Thermo Fisher Scientific
Julabo TW20 (Wasserbad)	Julabo
Labotect C200 Inkubator	Labotect (Labor – Technik – Göttingen)
NanoDrop Spektrophotometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Nunc Flow AURA PCR (Sterilbank)	Nunc GmbH & Co. KG
Paraformaldehyd (PFA)	Nicky Norley, Robert Koch-Institut
Power Pac™ Basic (Elektrophorese Stromversorgung)	Bio-Rad
PR 803 (Feinwaage)	Mettler Toledo
Sprout™ (Tischzentrifuge)	Heathrow Scientific
Sterilbank Thermo HeraSafe™	Kendro
Tecan Sunrise ELISA reader	Tecan
Tube-Strip Picofuge™	Stratagene®
Ultrazentrifuge Optima-L100K	Beckmann Coulter, Deutschland
Ultrazentrifugenrotor SW32Ti	Beckmann Coulter, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific industries
Wide mini-sub® Cell GT (Gelelektrophoresekammer)	Bio-Rad
Zeiss ID03 Mikroskop	Zeiss
Zellzähler Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab.: 2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Centrifuge Tubes	Beckman Coulter
Culture Tubes	Simport
Nunc 96-well Platte	Thermo Fisher Scientific
PCR SingleCap 8er-SoftStrips	Biozym Scientific
Zellkulturflasche	TPP (Techno Plastic Products AG)
Zellkulturschalen	TPP (Techno Plastic Products AG)
Zellkulturtestplatten	TPP (Techno Plastic Products AG)
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	TPP (Techno Plastic Products AG)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	SPL Life Sciences

2.1.3 Software

Tab.: 3 Software

Software	Hersteller
Bio-Rad CFX Maestro	Bio-Rad
EasyReader (ELISA Software)	entwickelt von Dr. S. Norley, RKI
FlowJo	FlowJo, LLC
Geneious R10	Geneious
Nanodrop ND-1000 v3.8.1	Molecular Dynamics/ Amersham Bioscience Nanodrop, Wilmington, USA

2.1.4 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Tab.: 4 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Agarose	Peglab, Deutschland
Brilliant Master Mix	Agilent, USA
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckman Coulter GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid	Roche, Schweiz
FKS	Biochrom, Deutschlande
Glycerin, 100 %	Carl Roth GmbH, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Deutschlande
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co.KG, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 10 %	BioRad, USA
OPD (5 mg)	Sigma
PEI	Anja Wolf, Robert Koch-Institut
Penicillin/Streptavidin, 100x	Biochrom AG, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA), Fraction V, 96 %	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Sucrose (D+)Saccharose)	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Trypsin (0.25 %)/EDTA (0.2 %)	Biochrom AG, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Biochrom, Deutschlande
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Deutschland

Tab.: 5 Enzyme

Enzym	Hersteller
BamHI	New England Biolabs Inc., USA
Knpl	New England Biolabs Inc., USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific
Sacl	New England Biolabs Inc., USA
Sfil	New England Biolabs Inc., USA

Tab.: 6 Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
Gene Ruler 100 bp Ladder Plus	Fermentas GmbH, Deutschland
Gene Ruler 1 kb Ladder Plus	Fermentas GmbH, Deutschland

2.1.5 Puffer

Tab.: 7 Puffer

Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
1x Reporter Lysis Buffer	Promega Corporation, Madison, USA
5x Sequenzierpuffer	Robert-Koch-Institut, Deutschland
Carbonat/ Bicarbonat Puffer	Sigma
CutSmart® Buffer	New England Biolabs Inc., USA
NEBuffer 1.1	New England Biolabs Inc., USA
NEBuffer 3.1	New England Biolabs Inc., USA
PBS	Robert Koch-Institut, Deutschland
Phosphat Citrat Puffer	Sigma
TAE, 1x	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 7.2

2.1.6 Antikörper

Tab.: 8 Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
Herma 7	Boller et al., 2007
K140 p5B	Hohn et al., 2016

Tab.: 9 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-Mouse, JR Dye, 800 CW	Licor
Anti-Rabbit	Sigma

2.1.7 Kommerzielle Kits

Tab.: 10 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, USA Sigma
PolyFect Transfektionsreagenz	Qiagen GmbH, Deutschland
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Deutschland
TURBO DNA-free™ Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.8 Kompetente Bakterienzellen

Tab.: 11 kompetente Bakterienzellen

Bakterienzellen	Hersteller
One Shot Top 10 chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Ivrogen

2.1.9 Zelllinien

Tab.: 12 Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Nährmedium
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM

2.1.10 Nährmedien

Tab.: 13 Nährmedien

Medium	Zusammensetzung/Zusätze
DMEM	FCS (10 %) L-Glutamin (1 %) Penicillin/Streptomycin-Lösung (1 %)
Einfriermedium für eukaryotische Zellen	90 % FKS 10 % DMSO
LB-Medium	Ampicillin (50µg/ml)
S.O.C-Medium	97 % SOB-Medium 1 % Teile Mg-Mix 2 % Teile Glucose

2.1.11 Plasmide

Tab.: 14 Plasmide

Plasmide	Bezogen von
CMVoriEGFP	Hohn et al., 2014
CMVoriLuc_ΔBgl-2	Dr. O. Hoh, n.p.
CMVoriLuc	Dr. O. Hoh, n.p.
oricoGagCherry	Anja Zimmermann, FG18, n.p.
oricoGag-V5	Anja Wolf, FG18
oricoGPP	George et al., 2011
oricoRec	Hanke et al., 2012
VSV-G	Addgene, LGC Standards Teddington, UK
VSV-G _{mut}	Addgene, LGC Standards Teddington, UK

2.1.12 Primer, Sonden und Template

Tab.: 15 Primer, Sonden und Template

Primer	Sequenz/Hersteller
CMV_fwd	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
Horie2010_PERT-F	TCCTGCTCAACTTCCTGTGCGAG
Horie2010_PERT-R	CACAGGTCAAACCTCCTAGGAATG
MS2 RNA-Template	Sigma-Aldrich
MS2-PERT_Horie-Pro	Sigma-Aldrich
oricoFor3	CAAGAAGGGCAAGCACTGG

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode zur exponentiellen Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen. Durch die enzymatische Aktivität der Polymerase werden Nukleotide zu einer langen Kette als Kopie der Template-Sequenz polymerisiert. Mit Hilfe spezifischer Primer wird der Startpunkt der Reaktion festgelegt und der zu vervielfältigende Bereich wird begrenzt.

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgt nach der Sanger-Coulson Methode, die auch als Kettenabbruchverfahren bekannt ist. Vor der eigentlichen Sequenzierung muss die DNA amplifiziert werden, wobei das Verfahren der PCR genutzt wird. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Applied Biosystems™ Big Dye.

Die Datengewinnung und die Durchführung der oben aufgeführten Methode wurde in einem speziellen Sequenzierlabor des Robert-Koch-Instituts durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt über das Programm Geneious.

Agarose-Gelelektrophorese

Das analytische Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese dient der Kontrolle, Aufreinigung und Identifikation von Nukleinsäuren nach Größe und Ladung. Das Agarosepulver wird mit 1x TAE-Puffer zu einer 0,8-1,5 %igen Agaroselösung aufgeköcht. Das Verhältnis der Agarose richtet sich nach der Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente, je größer die zu erwartenden Fragmente sind, desto weniger Agarosepulver wird verwendet. Der Lösung wird Ethidiumbromid hinzugegeben. Ethidiumbromid ist eine interkalierende Substanz und bindet während der Auftrennung im elektrischen Feld an die DNA, wodurch deren Visualisierung unter UV-Licht ermöglicht wird. Vor dem Auftragen der Proben werden diese mit einem

Ladepuffer versetzt und bei einer Spannung von 40-120 V über einen Zeitraum von 30 min – 1 h in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Durch das Mitführen eines Größenstandards (Tab.: 6) ist eine Zuordnung und Größenbestimmung der Fragmente möglich. Nach der Auftrennung können die Fragmente durch einen UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden und durch ein Kamerasystem können die Ergebnisse festgehalten werden.

Transformation

Um Plasmid-DNA übertragen und amplifizieren zu können, werden chemisch-kompetente *E. coli* Zellen per Hitzeschock transformiert. Die Plasmide wurden wie vom Hersteller beschrieben in „One Shot Top 10“ *E. coli* transformiert.

Vom Protokoll abweichend (One Shot TOP10 Competent Cells – Thermo Fisher Scientific) wird ein Zentrifugationsschritt über 5 min bei 200 g eingeführt um sämtliche Bakterien austreichen zu können.

Bakterienanzucht und Plasmidisolierung

Zur Amplifikation von Plasmiden werden chemisch kompetente *E. coli* „One Shot Top 10“ Zellen verwendet. Die Plasmide werden in diese transformiert, angeschüttelt und ausplattiert (siehe 2.2.1.4). Am nächsten Tag können die Einzelkolonien gepickt und in einer Starterkultur inkubiert werden. Diese besteht aus 2 ml LB-Medium, komplementiert mit Kanamycin oder Ampicillin und der gepickten Kolonie. Der Ansatz wird bei 37 °C und 200 rpm mehrere Stunden angeschüttelt. Über Nacht werden 200 ml LB-Medium, versetzt mit dem jeweiligen Antibiotikum, und der Starterkultur in einem Schikanekolben bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Die anschließende Plasmidisolierung erfolgt nach den Herstellerangaben mittels „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“.^[18]

Aufgrund der Nutzung verschiedener Zentrifugen wurde das Protokoll wie folgt abgeändert:

1. 4.700 g für 30 min (anstatt 6.000 g für 15 min)
5. 11.000 g für 45 min (anstatt 20.000 g für 30 min) und 11.000 g für 15 min (anstatt 20.000 g für 15 min)
10. 11.000 g für 30 min (anstatt 15.000 g)
11. 11.000 g für 10 min (anstatt 15.000 g)

Glycerolstock

Um den Klonierungsprozess für häufig verwendete Plasmide zu beschleunigen, können Glycerolstocks angelegt werden. Von der Über-Nacht-Kultur werden dafür vor Beginn der Plasmidisolierung 500 µl Bakterienlösung abgenommen. Die Lösung wird mit 500 µl 86 %igem Glycerol vermischt und bei -80 °C gelagert.

Quantifizierung der isolierten DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt über ein Spektrometer (NanoDrop1000). Hierbei erfolgt die automatische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Zur Absorptionsmessung der DNA wird 1 µl eluierter DNA eingesetzt. Um die Reinheit der Probe bestimmen zu können, wird der Koeffizient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm berechnet. Der Koeffizient von aufgereinigter DNA sollte zwischen 1,8 bis 2,0 liegen.

Restriktionsverdau

Ein restriktionsverdau kann zur Überprüfung einer DNA-Präparation genutzt werden. Hierbei wird die Plasmid-DNA durch bestimmte Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Fragmente können im Anschluss durch eine Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden und mit Vorlagen verglichen werden. Die Nutzung der Enzyme ist abhängig von den Schnittstellen des verwendeten Plasmids. Je nach dem welches Enzym genutzt wird muss der Puffer, die Inkubationstemperatur und die Inkubationszeit entsprechend angepasst werden. Der durchgeführte Restriktionsverdau setzte sich aus den folgenden Enzymen, Puffern, Inkubationstemperaturen und -zeiten zusammen.

Tab.: 16 verwendete Restriktionsenzyme mit ihren dazugehörigen Puffern, Inkubationszeit und Temperatur während eines Restriktionsverdau

Restriktionsenzym	Puffer	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
BamHI	NEBuffer 3.1	1 h	37 °C
SacI + KpnI	NEBuffer 1.1	1 h	37 °C
SfiI	CutSmart Buffer	1 h	50 °C
SfiI + BamHI-FH	CutSmart Buffer	1 h	37 °C

Die Zusammensetzung zwischen den Komponenten kann wie folgt aussehen:

Tab.: 17 Ansatz eines Restriktionsverdau

Komponente	Volumen
Enzym	1 μ l
Puffer	2,5 μ l
Plasmid-DNA	1 μ g
destilliertes Wasser	auf 25 μ l auffüllen

2.2.2. Zellkultur

Kultivierung von Zelllinien

Die verwendete humane Zelllinie HEK-293T wird in DMEM, in 150 cm² Zellkulturflaschen steril kultiviert und passagiert. Die Kultivierung erfolgt in einem Brutschrank bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 96 %.

Bei dem Arbeiten mit Zellen müssen sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank eingehalten werden. Das Passagieren der Zellen wird je nach Zelldichte alle 2-3 Tage durchgeführt.

Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl ist insbesondere für Transfektionen wichtig, da man eine gewisse Konzentration an Zellen aussäen muss, um die gewünschten Ergebnisse zu erhalten. Zwei verschiedene Varianten wurden während der Experimente angewendet um die Zellzahl bestimmen zu können.

Zum einen erfolgte die Bestimmung mittels Zellcounter. Hierbei werden 10 μ l der Zellsuspension (nach ablösen und resuspendieren der Zellen) in eine 10 ml Isoton-Lösung gegeben, es folgt im Gerät eine Zählung der enthaltenen Partikel und eine Ausgabe über die Größenverteilung der Partikel.

Zum anderen kann die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt werden. Dafür wird die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Membran lebender Zellen zurückgehalten wird, tote Zellen mit poröser Zellmembran sind für diesen Farbstoff permeabel und verfärben sich blau. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

kann so, im Gegensatz zu der Zählung des Coulter Counter, die Lebendzellzahl ermittelt werden.

Berechnung der Zellzahl nach Neubauer:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{Fläche (mm}^2\text{)} \cdot \text{Kammertiefe (mm)} \cdot \text{Verdünnung}}$$

Transfektion von tierischen Zellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen, in diesem Fall in 293T-Zellen. Die Transfektion kann frühestens einen Tag nach dem Aussäen im Kulturgefäß erfolgen, damit eine gute Adhärenz der Zellen am Untergrund gewährleistet ist.

Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Mit Hilfe von in Wasser gelöstem linearem PEI $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n$, einer chemischen Reagenz, kann ebenso eine Transfektion durchgeführt werden. PEI bildet aufgrund seiner positiven Ladung Komplexe mit negativ geladener Plasmid-DNA aus. Zellen können diese Komplexe dann endozytotisch aufnehmen.

Die benötigte Plasmid-DNA wird in basalem Medium (ohne Zusätze von Seren oder Antibiotika) verdünnt. Anschließend erfolgt die PEI-Zugabe in einem Verhältnis zur DNA von 3:1. Die Reagenzien werden sorgfältig vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation gibt man das Reagenz vorsichtig auf die Zellen und inkubiert diese wieder. Nach 8-16 h bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C erfolgt ein Mediumwechsel.

Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation (UZ) dient der Anreicherung und Aufreinigung von viralen Partikeln aus dem Überstand transfizierter Zellen. Dies erfolgte für 3 h bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge „Optima-L100K“ von Beckmann unter Verwendung eines SW32Ti-Rotors, der für Geschwindigkeiten bis 32.000 rpm genutzt werden kann.

Vor der Zentrifugation wird Überstand mit einem 0,45 µm Filter gefiltert. 5 ml Sucrose werden in speziellen Zentrifugen-Tubes von Beckman vorgelegt und der gefilterte Überstand wird

langsam dazugegeben, damit die Phasen erhalten bleiben. Mit einer Feinwaage werden die Gewichte der einzelnen Proben austariert.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Röhrchen kurz über Kopf zum Abtropfen aufgestellt. Mit 300 µl PBS wird das Viruspellet resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 Immunbiochemische Methoden

Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften und Kombinationen an Oberflächenproteinen mittels Fluoreszenz analysieren. Durch das Binden verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper oder fluoreszierender Proteine an Oberflächen- oder auch intra-zelluläre Proteine lassen sich verschiedene Zelltypen identifizieren. Über dieses Verfahren können schließlich Gemische verschiedener Zelltypen sortiert werden, was dann als FACS (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung) bezeichnet wird und eine Art der Durchflusszytometrie ist.

FACS

Einen Tag vor der Zellsortierung werden normale 293T-Zellen ausgesät. Diese können dann mit den vorbereiteten Proben infiziert werden, welche ein fluoreszierendes Protein besitzen. Dadurch wird eine Detektion ermöglicht. Je nach Experiment können die Konzentrationen der aufgetragenen Proben oder die Inkubationszeitpunkte variieren.

Die Zellen werden infiziert und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und die Zellen werden mit warmen DMEM gewaschen. 100 µl Trypsin/EDTA werden auf die Zellen gegeben und für kurze Zeit inkubiert. Mit DMEM wird die Reaktion gestoppt und die Zellen werden mit einer Endkonzentration von 0,5 % PFA fixiert. Die Proben können über Nacht im dunklen Kühlschrank aufbewahrt werden oder gleich im Anschluss gemessen werden. Die Messung erfolgt dabei durch ein Cytometer.

Enzym linked Immunosorbend Assay ELISA

ELISA ist eines der wichtigsten immunbiochemischen Verfahren zum Nachweis von Antikörpern. Der Nachweis basiert dabei auf einer enzymatischen Farbreaktion der Enzymgekoppelten Antikörper.

p27 Capture ELISA

Zur Quantifizierung der Viruslast im Zelllysat und Virusüberstand dient der p27 ELISA. Er dient zum Nachweis des Capsidproteins des humanen endogenen Retrovirus K113. Der Antikörper HERMA 7 wird in einem Carbonatpuffer verdünnt (1:100). Eine 96-well Mikrotiterplatte (Nunc, USA) wird damit über Nacht bei 4 °C gecoatet (50 µl/well). Diese Platte wird dreimal mit PBST gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird diese mit 200 µl/well PM geblockt. Die Proben werden durch Zugabe von Tween-20 für eine 0,02 % Endkonzentration für 10 min bei RT inaktiviert und 50 µl/well der Proben werden aufgetragen und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Platten werden dreimal mit PBST gewaschen. Der primäre Antikörper α -Capsid HERV-K wird in PMT verdünnt (1:500) und die Mikrotiterplatte mit 50 µl/well für 1h bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird der sekundäre Antikörper α -Rabbit in PMT verdünnt (1:2500) und die Mikrotiterplatte mit 50 µl/well wird wieder für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgt ein abschließender Waschschrift. Zum Schluss wird eine 5 mg OPD (o-Phenylenediamine) Tablette und 12 µl 30 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in 12,5 ml Phosphat-Citrat Puffer pH 5.0 gelöst. 50 µl/well werden auf die Mikrotiterplatte gegeben. Die Reaktion wird nach 10-15 min mit 25 µl/well 5 %iger Schwefelsäure gestoppt. Die OD-Werte werden bei 492 nm im Microplate Reader Sunrise (ELISA Reader) gemessen.

PERT-Assay

Um die enzymatische Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) detektieren zu können, wurde der PERT-Assay durchgeführt. Die Grundlage dieses Assays bildet eine quantitative real-time PCR. Es ist ein linearer Zusammenhang zwischen dem Schwellenwert (CT) und der Anzahl an Viruspartikeln nachgewiesen worden, sodass die Quantifizierung der RT von Retroviren ermöglicht wird.^[19]

Ein Mastermix wird angesetzt der aus zwei Primern, einer fluoreszierenden Sonde, einem RNA-Template und einem Brilliant Mastermix (Agilent) besteht. Die Proben werden lysiert und

für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser versetzt. In einer 96-Well Platte wird der Mastermix mit den Proben vermischt. Die qPCR wurde mit dem CFX96™ Real-Sytem von Bio-Rad durchgeführt.

Luciferase-Assay

Ein Biolumineszenz hervorrufendes Gen dient als Reporter im Luziferase-Assay und kann quantitativ im Luminometer gemessen werden. Dem Luziferase-Assay ging immer die Infektion mit Firefly Luziferase-Reporterviren voraus. Die Menge an Firefly Luziferase im Zelllysat ist proportional zur gemessenen Lichtemission. Dadurch können indirekt Rückschlüsse auf die Transkriptionsrate des Reportergens und somit auch auf die Infektionsrate gezogen werden. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen mittels 100 µl 1x Reporter Lysis Buffer (Promega Corporation, Madison, USA) lysiert. 10 µl des Lysates wurde auf eine 96 Well-Luminometer-Platte pipettiert. Die weitere Durchführung und die Messeinstellungen des Luminometers entsprachen den Promega-Herstellerangaben.

3. Ergebnisse

Nach der Expression viraler Struktur- und Funktionsproteine assemblieren Komplexe Retroviren zu viralen Partikeln im Cytoplasma oder an der Zellmembran der infizierten Zellen. Hierbei reicht das Polystrukturprotein Gag der Retroviren aus, um virusartige Partikel (VLPs) zu generieren.^[20] Wenn jedoch während der Assemblierung auch die virale Protease in die Partikel eingebaut wird, so erfolgt nach deren Freisetzung die Reifung durch die Prozessierung des Polystrukturproteins Gag in die einzelnen viralen Strukturproteine.^[17]

HERV-K(HML-2) zählt zu den komplexen Retroviren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten fluoreszenzmarkierte virale Partikel generiert werden, die für die Untersuchungen geeigneter Methoden zur Messung des Entry genutzt werden können.

Für lichtmikroskopische Untersuchungen der HERV-K(HML-2) Assemblierung, Reifung und Freisetzung können markierte Fluoreszenzproteine genutzt werden um virale Proteine und intrazelluläre Strukturen zu untersuchen.^[21] Dies hat den Vorteil, dass die markierten Proteine nach ihrer Expression dauerhaft sichtbar sind, ohne sie durch Immunfluoreszenz anfärben zu müssen.

3.1 Produktion von Virus-like-Particles (VLPs)

Für die Generierung eines funktionalen HERV-K113 Molekularklons wurde die vollständige Sequenz des HERV-K113 Elements auf Chromosom 19p13.11 in einen Plasmidvektor kloniert.^[12] 25 nicht synonyme postinsertionale Mutationen in den *env*, *rec* und *gag-pro-pol* offenen Leserahmen des HERV-K113 Elements wurden identifiziert und durch gezielte Mutagenese revertiert. Daraus resultiert die postulierte Sequenz des ehemaligen originalen (ori) exogenen Virus „oriHERV-K113“ (Abb.: 5) in dem pBSK Vektor (Stratagene), welches trotzdem nur eine geringe Expressionsrate aufwies (Abb.: 6). Um eine stärkere Produktion sowie die Möglichkeit zur Pseudotypisierung von viralen Partikeln zu ermöglichen, wurde das Konstrukt weiter modifiziert. Um die Expression viraler Proteine zu verstärken wurde die U3-Promotorregion der viralen 5'LTR durch die Promotosequenz des Cytomegalovirus ausgetauscht.^{[3][22]}

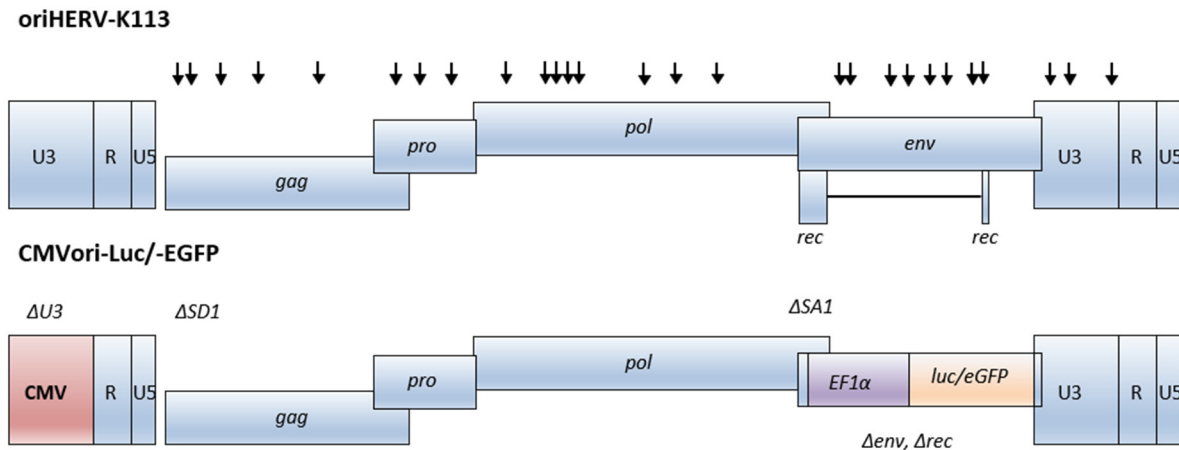


Abb.: 5 Aufbau der HERV-K113 Reporterkonstrukte

Die Pfeile kennzeichnen die postinsertionalen Mutationen die revertiert wurden. (Modifiziert aus Hohn et. al 2013)

Für die Herstellung pseudotypisierter HERV-K113-Partikel wurden die bereits vorhandenen Reporterkonstrukte CMVoriLuc, CMVoriEGFP und CMVoriLuc_ΔBgl-2 verwendet. Bei diesen Konstrukten wurde das *env* deletiert. An diese Stelle wurde je nach Konstrukt entweder ein Luziferase- oder *enhanced green fluorescent protein* (eGFP)-Gen kloniert. Dadurch wurde auch der akzessorische *rec*-Leserahmen entfernt. Der „*human elongation factor 1α*“ (EF1α)-Promotor erzeugt eine effiziente Proteinexpression in eukaryotischen Zellen, wodurch die Expression der Reportergene angetrieben wird. Das Konstrukt CMVoriLuc_ΔBgl-2 leitet sich aus dem beschriebenen CMVoriLuc ab. Hier wurde ein 4,4 kb großes Fragment zwischen den beiden Bgl-2 Schnittstellen in *gag* und *pol* deletiert. Dadurch wird zum einen die zu verpackende virale RNA verkleinert, aber auch die Information für Gag-pro-pol Proteine deletiert.

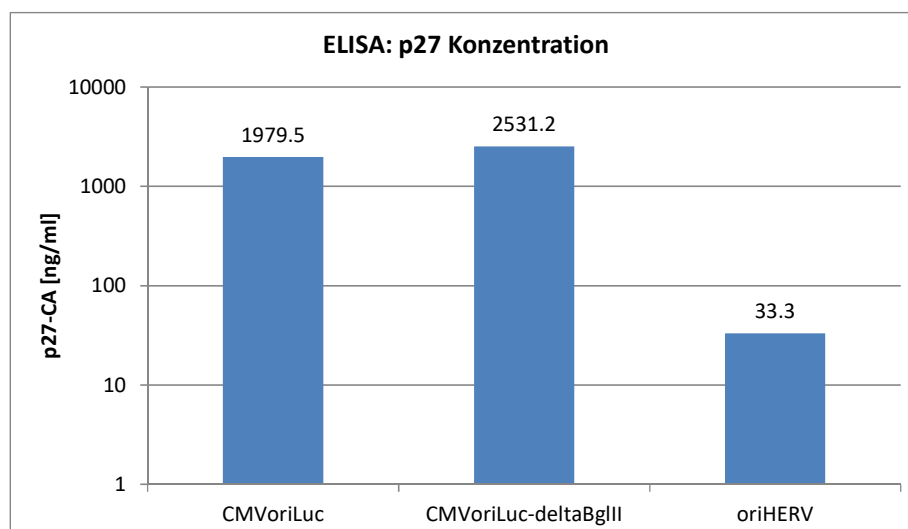


Abb.: 6 p27 Konzentration verschiedener HERV-K113 Konstrukte.

Vergleich zwischen der Konzentration an Capsidprotein und den eingesetzten HERV-K113 Konstrukten

Anhand der Ergebnisse des ELISAs (Abb.: 6) erkennt man die Unterschiede zwischen den beschriebenen Konstrukten. Die geringe Expressionsrate von „oriHERV“ ist ersichtlich, sowie auch die Steigerung der Expression durch die durchgeführten Modifikationen. Das Konstrukt CMVoriLuc_ΔBgl-2 erreicht eine mehr als 70fach erhöhte Expression zum oriHERV-K113-Konstrukt. Zur Herstellung von HERV-K113 Reporterviren bzw. Virus like particles (VLPs), wurden HEK-293T Zellen mit verschiedenen Plasmiden cotransfiziert. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden verschiedene Konstrukte in unterschiedlichen Ausführungen hergestellt. Dafür wurden zusätzlich zu den Reporterkonstrukten Rec (oricoRec), codonoptimiertes gag-pro-pol (oricoGPP), VSV-G bzw. eine mutierte Variante von VSV-G, oricoGag-V5 und oricoGagCherry cotransfiziert. Die Deletion des *env* erlaubt den Einbau eines anderen Hüllproteins, in diesem Fall VSV-G bzw. dessen Mutante. VSV-G soll den Entry-Prozess um den Faktor 1000 verstärken, während die Mutante diesen Prozess gänzlich hemmen soll (Abb.: 7) Das Rec besitzt eine ähnliche Funktion wie das Rev von HIV und ist für den Transport der mRNA aus dem Nukleus in das Cytoplasma erforderlich. Das oricoGPP dient einer erhöhten Expression der strukturellen Proteine und erhöht die Produktion reifer VLPs.^[23]

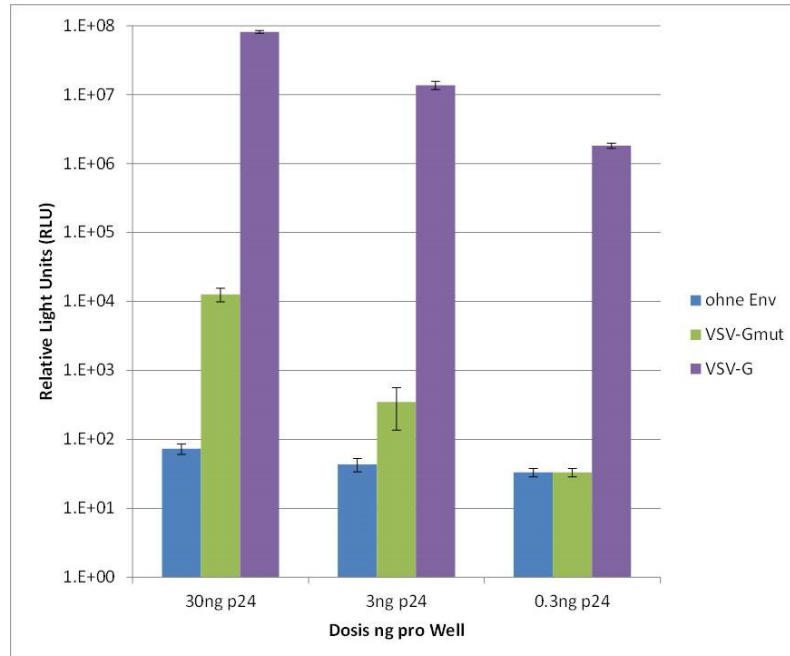


Abb.: 7 Ergebnisse des Luciferase-Assays.

Die Ergebnisse liefern Informationen in Bezug auf das Entry verschiedener Hüllproteine und unterschiedlichen Konzentrationen des eingesetzten HIV-1 Reportervirus, gemessen anhand des p24 Proteins

Durch die Durchführung eines Luciferase-Assays konnte die Annahme bestätigt werden, dass das Entry durch VSV-G stark erhöht wird und die Mutante diesen Prozess hemmt. Das Entry wird durch die VSV-G Mutante nicht vollständig unterbunden, es handelt sich dabei aber um

keinen spezifischen Entry, der auch nur bei hohen Konzentrationen messbar ist und ist dadurch zu vernachlässigen.

3.2 oricoGagCherry

Für diese Arbeit wurde das Konstrukt oricoGagCherry verwendet, welches von Anja Zimmermann zur Verfügung gestellt wurde. Das Konstrukt besitzt am N-terminalen Ende anstatt der 5' LTR einen CMV_{ie}-Promotor wodurch die Expression verstärkt wird.^{[3][23]} Die oricogag Sequenz wurde in den Fluoreszenzvektor pmCherry-N1 inseriert. Für alle kommenden Versuche wurde auf die codonoptimierte HERV-K(HML-2)-Sequenz zurückgegriffen, die durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde.

Zunächst wurde das zur Verfügung gestellte oricoGagCherry Plasmid durch eine Transformation in chemisch kompetenten E. coli „One Shot Top 10“ Zellen vervielfältigt. Die anschließende Plasmidisolierung erfolgte nach den Angaben in Abschnitt 2.2.1.5. Die verwendeten Agarplatten und Medien wurden mit Kanamycin komplementiert, da auf dem oricoGagCherry eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum codiert ist.

Um die Korrektheit des Plasmids überprüfen zu können, wurde ein Restriktionsverdau mit den aufgeführten Enzymen aus Tab.: 17 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese.

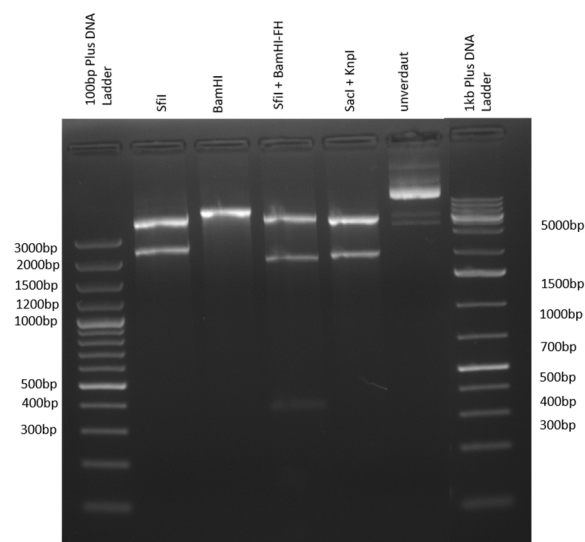


Abb.: 8 Restriktionsverdau des oricoGagCherry -Plasmids

In einem 1,5 %igen Agarosegel wurde der Restriktionsverdau durchgeführt. Zur Größenbestimmung und Zuordnung der Fragmente wurden die Größenstandards: Gene Ruler 100 bp Ladder Plus und Gene Ruler 1 kb Ladder Plus verwendet.

Die Größe des Vektors beträgt 6,7 kb. Die zu erwartenden Banden liegen für den einfachen Verdau mit SfiI bei 2,2 und 4,4 kb und für den doppelten Verdau mit BclI + KpnI bei 2 und 4,7 kb, sowie für SfiI mit BamHI-FH bei 360 bp, 1,9 und 4,4 kb. Durch die Banden auf der richtigen Höhe konnte die Integrität der Schnittstellen bestätigt werden und somit auch das Plasmid als oricoGagCherry bestätigt werden (Abb.: 8).

Zusätzlich zu dem Restriktionsverdau wurde das Plasmid auch in seiner Sequenz kontrolliert. Dies erfolgte mit Hilfe der DNA-Sequenzierung. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Geneious. Das Ergebnis stimmte mit den Erwartungen überein.

Für eine Kontrolle der Expression wurde eine Transfektion durchgeführt. Eine erfolgreiche Transfektion sollte zur nachweisbaren Fluoreszenz führen. Dafür wurden HEK-293T Zellen ausgesät und mit oricoGagCherry transfiziert. Nach 24 h konnte die Fluoreszenz mit Hilfe eines Mikroskops festgestellt werden. Neben der eigentlichen Probe wurde ebenso eine Kontrolle mit EGFP und Stauken-Cherry transfiziert. Für dieses Experiment war das humane Stauken-1 Protein irrelevant, aber auf Grund seiner guten Expression von oricoGagCherry wurde es als Positivkontrolle mitgeführt. Während des Mikroskopierens konnte eine Überexpression der Luciferase bei Stauken-1 bestätigt werden.

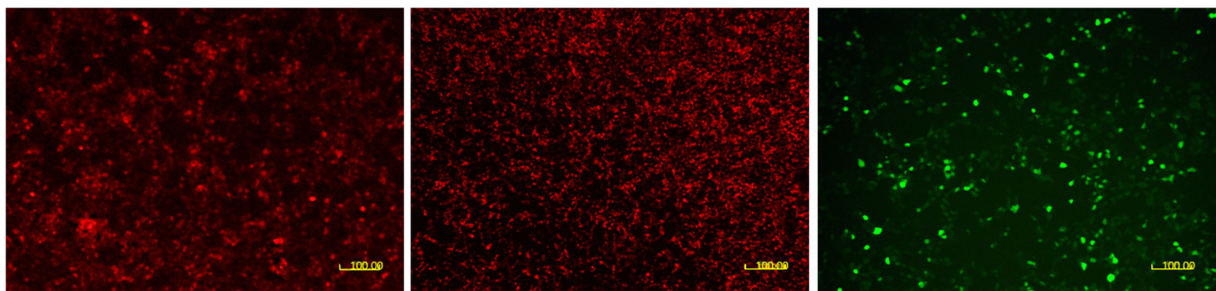


Abb.: 9 Transfizierte HEK-293T Zellen

Transfiziertes oricoGagCherry sowie Positivkontrollen nach 24 h.

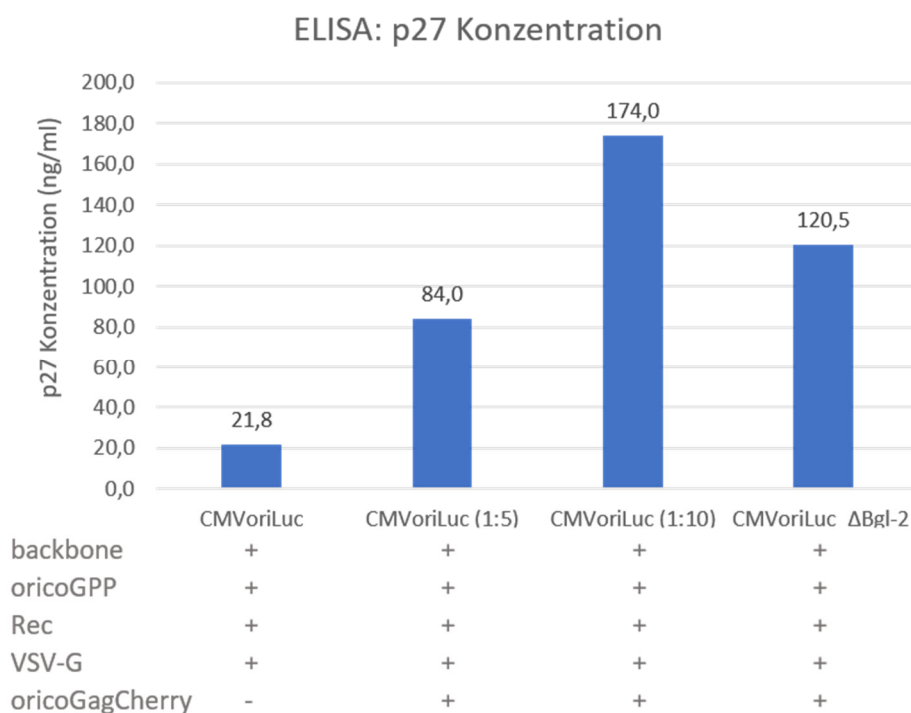
Von links nach rechts: oricoGagCherry (100-fache Vergrößerung); Positivkontrolle mit Stauken-Cherry (40-fache Vergrößerung); Positivkontrolle mit CMVoriEGFP (100-fache Vergrößerung)

Durch die durchgeführte Restriktionsanalyse, Sequenzierung und Transfektion (Abb.: 9) konnte nun sichergestellt werden, dass es sich um das richtige Plasmid handelt, welches das mit mCherry markierte oricoGag exprimiert. Daher konnten die folgenden Experimente mit dem isolierten Plasmid durchgeführt werden.

3.2 Produktion von Virus like Particels (VLPs) mit oricoGagCherry

Die Produktion von virus like particels (VLPs) erfolgte durch die Transfektion mit PEI. Für die Versuche wurden HEK-293T Zellen mit CMVoriLuc bzw. CMVoriLuc_ΔBgl-2, VSV-G, Rec, oricoGPP und oricoGagCherry transfiziert. Zunächst wurde ermittelt, welches Mischungsverhältnis zwischen oricoGPP und oricoGagCherry gewählt werden muss, um eine gute Expression fluoreszenzmarkierte VLPs zu erhalten. Aus bisherigen Arbeiten ist bekannt, dass eine alleinige Expression von oricoGagCherry dazu führt, dass die VLPs nicht korrekt assembliert werden können.^{[2][24]} Daher wurden die Verhältnisse 1:5 und 1:10 von oricoGagCherry und oricoGPP getestet. Nach der Transfektion wurde der Überstand abgenommen und für die Auswertung mittels ELISA und PERT verwendet.

Bei dem durchgeführten ELISA handelt es sich um einen, auf HERV zugeschnitten, p27 ELISA. Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann das Capsidprotein p27 nachgewiesen werden. Der ELISA wurde nach den Angaben in Abschnitt 2.2.3.2.1 durchgeführt.



*Abb.: 10 p27 Konzentration bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen
Dargestellt sind die verschiedenen Mischungsverhältnissen zwischen oricoGPP und oricoGagCherry. Unterschied ist auch in der Verwendung des Backbones zu sehen.*

Die p27-Konzentration ist bei dem Mischungsverhältnis von 1:10 mit 174 ng/ml am höchsten. Das Mischungsverhältnis von 1:5 weist mit 84 ng/ml eine geringere Konzentration auf. Die

geringste Konzentration von p27 wurde bei der Probe ohne oricoGagCherry detektiert (Abb.: 10).

Ein weiteres Maß für die Quantität der VLPs im Überstand kann über die RT-Aktivität in einem PERT-Assay gemessen werden. Für eine Quantifizierung musste zunächst eine Standardkurve erstellt werden. Bei dem Standard handelt es sich um eine rekombinante HIV-1 RT von der Firma CaviDi. Das rekombinante Enzym wurde in Zellkultur Medium (DMEM) in zwölf Stufen verdünnt um eine Standardreihe zu erhalten. Diese wird benötigt, damit die zu testenden Proben quantifiziert werden können. Für den PERT wurden die zu untersuchenden Proben und die Verdünnungen des Standards als technische Triplikate aufgetragen. Die Ergebnisse wurden durch eine real-time PCR gewonnen.

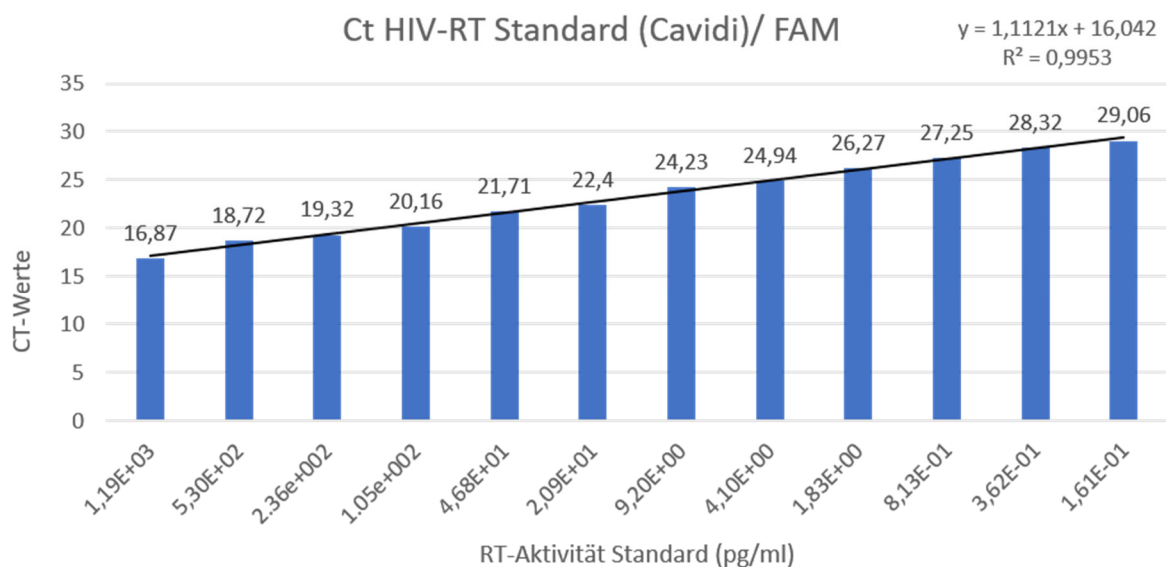


Abb.: 11 C_T -Werte und Standardkurve der real-time PCR

12 Verdünnungen der rekombinanten HIV-1 RT wurden als technische Triplikate aufgetragen

Mit einem Determinationskoeffizient (R^2) von 0,9953 und einer Effizienz von 99,53 % der real-time PCR ist der Standard für eine Auswertung der Proben geeignet (Abb.: 11).

Zusätzlich zu den Proben wurde auch Überstand von nicht transfizierten Zellen als negativ Kontrolle („Mock“) mit aufgetragen.

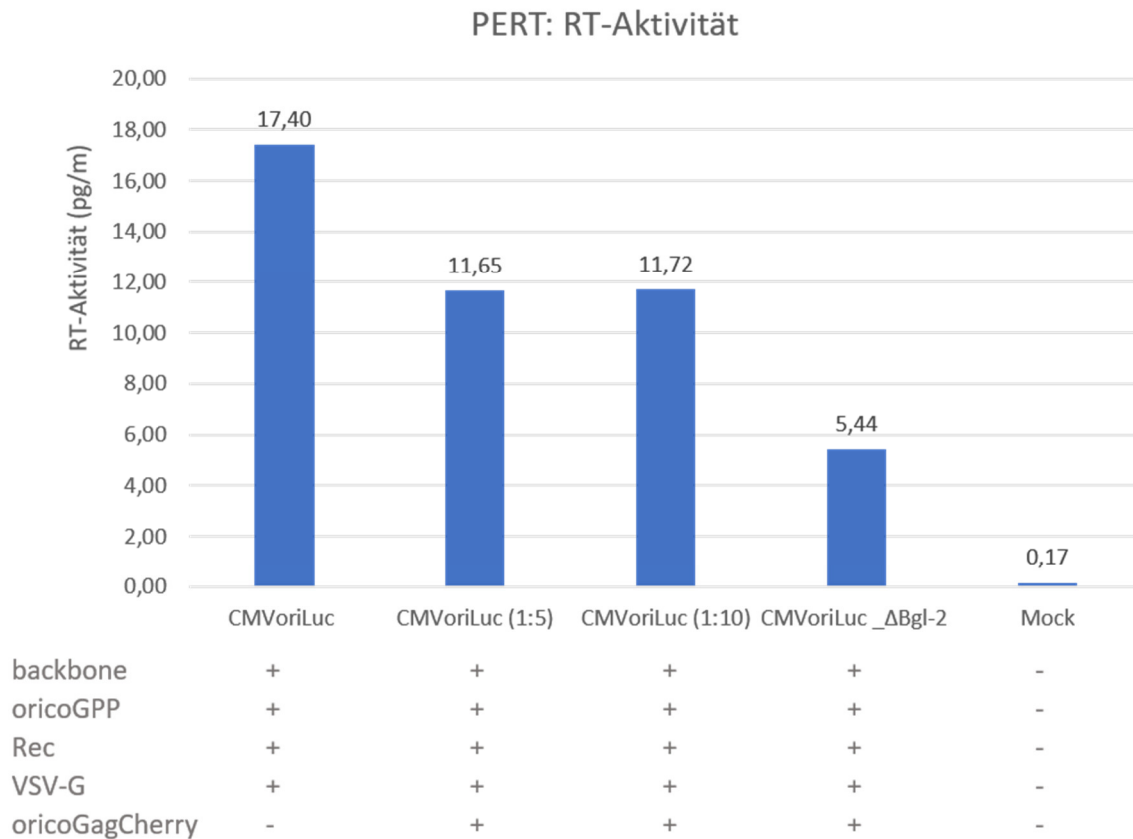


Abb.: 12 Gemessene RT-Aktivität über den PERT
RT-Aktivität bei verschiedenen Mischungsverhältnissen zwischen oricoGPP und oricoGagCherry

Anhand der Auswertung der Proben kann festgestellt werden, dass oricoGagCherry einen Einfluss auf die RT-Aktivität hat (Abb.: 12) In der Probe ohne oricoGagCherry liegt ein RT-Wert von 17,4 ng/ml vor, bei den Proben in denen oricoGagCherry in den VLPs eingebaut ist sinkt der Wert auf ca. 11 ng/ml. Generell sind die Werte für die Aktivität der RT sehr gering.

Im Vergleich der beiden Experimente wird deutlich, dass die RT-Aktivität, bei der Probe mit dem Mischungsverhältnis von 1:5, sehr der Aktivität der 1:10 Probe ähnelt (Abb.: 12), obwohl die Konzentration von p27 bei der 1:5 Probe deutlich geringer ist (Abb.: 10). Daraus lässt sich schließen, dass trotz geringer Konzentration an Capsidprotein eine vergleichbare RT-Aktivität gemessen werden konnte.

Die folgenden Experimente wurden mit einem Mischungsverhältnis von 1:5 zwischen oricoGagCherry und oricoGPP durchgeführt. Da sowohl die RT-Aktivität, als auch die

Konzentration an p27 bei der Probe mit dem CMVoriLuc_ΔBgl-2 Backbone nur sehr niedrige Ergebnisse lieferte, wurde dieses in den nachfolgenden Versuchen nicht weiter berücksichtigt. Zusätzlich zum Mischungsverhältnis wurde der Entry-Prozess zwischen VSV-G und VSV-G_{mut} im Vergleich ohne Env in einem Luciferase-Assay getestet (Abb.: 7).

Anhand dieses Experiments kann man erkennen, dass sich der Entry-Prozess bei Durchführung mit VSV-G_{mut} um vier log-Stufen verringert anstelle der Verwendung des originalen VSV-G. Bei einer Konzentration von 0,3 ng verhält sich die Mutante sogar genauso wie ohne Env, besitzt also fast gar keine Möglichkeit mehr des Entry.

3.3 Virusproduktion und Charakterisierung

Nach dem Festlegen des Mischungsverhältnisses erfolgte die Produktion von VLPs. Die Transfektion fand in T150 Zellkulturflaschen mit einer Konzentration von 22 µg DNA/Flasche statt.

Die Transfektion wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Der erste Ansatz bestand aus oricoGag, oricoGagCherry und VSV-G bzw. VSV-G_{mut}. Hierbei sollten keine reifen VLPs produziert werden, da zur abschließenden Reifung der Partikel die Protease benötigt wird. Da kein *prot* bei oricoGagCherry codiert wird, können die VLPs nicht reifen. Der zweite Ansatz beinhaltete ein Backbone (CMVoriEGFP), oricoGPP, oricoGagCherry und auch wieder VSV-G bzw. dessen Mutante. Hier sollten reife VLPs entstehen. Hintergrund dieser Differenzierung ist der schnellere Zerfall von reifen VLPs gegenüber unreifen VLPs im Cytoplasma der Empfängerzelle. Es sollte herausgefunden werden, ob unreife VLPs stabiler sind und somit länger im Cytoplasma existieren können, was zu einer besseren Detektion der erfolgreich infizierten Zellen im FACS führen könnte.

Um Virus produzieren zu können, erfolgte wieder die Transfektion mit PEI. Im Unterschied zu der ersten Transfektion wurde hier der Überstand nach 48 und 72 h geerntet. Die Proben wurden mithilfe einer UZ aufgereinigt, um eine höhere Konzentration an VLPs für die spätere Infektion zu erreichen. Neben der Produktion von Viren mit CMVoriEGFP, erfolgte auch die Produktion mit dem CMVoriLuc – Backbone.

Durch die Durchführung von PERT und ELISA sollte nachgewiesen werden, wie viel Virus die Empfängerzellen bilden können.

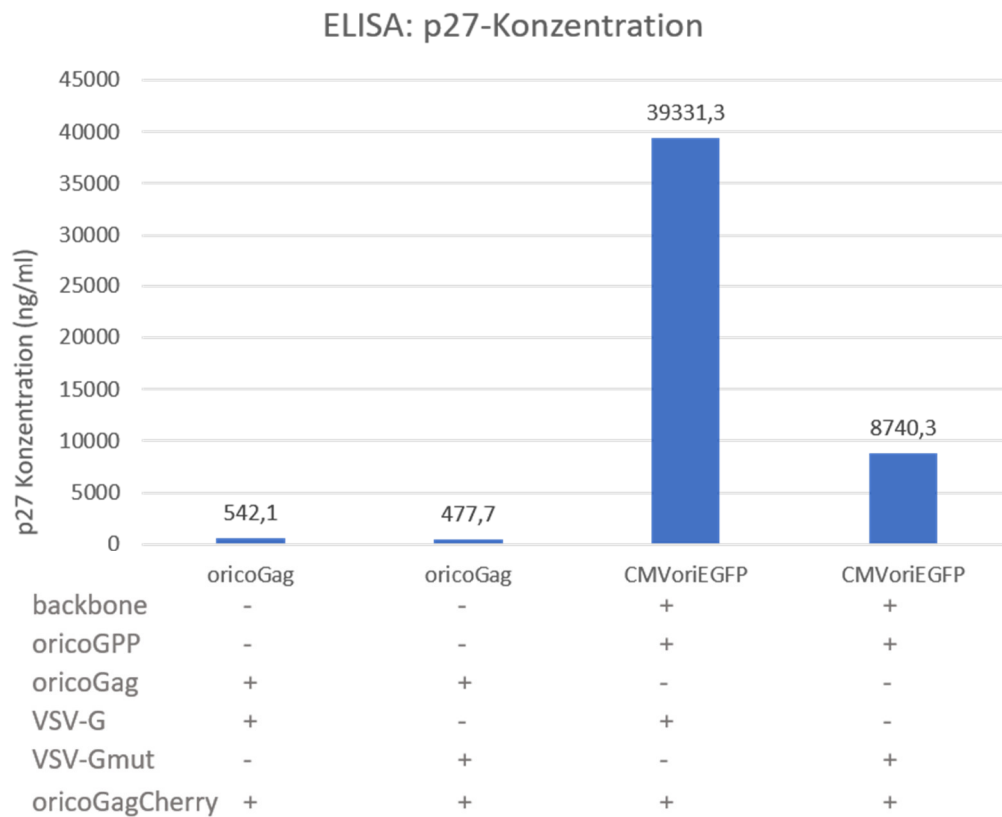


Abb.: 13 Darstellung der Konzentration des Capsidproteins (p27) von HERV-K113

Die gemessene Konzentration an p27 wird in diesem Diagramm dargestellt. Im Gegensatz zu den Proben 3 und 4 besitzen die Proben 1 und 2 kein Backbone und kein GPP.

Die Proben mit einem Backbone (CMVoriEGFP) weisen im Gegensatz zu den Proben ohne eine zu verpackende virale RNA, eine mindestens 15-fache höhere Konzentration an p27 auf (Abb.: 13). Der Unterschied zwischen VSV-G und dessen Mutante wird ebenso deutlich. Mit einer Konzentration von über 39.000 ng/ml weist Probe 3 (CMVoriEGFP, oricoGagCherry, oricoGPP und VSV) eine unerwartete, sehr hohe Konzentration auf. Die geringe Konzentration der Proben 1 und 2 weisen darauf hin, dass Gag alleine keine Partikel sezernieren kann. Die Konzentration von p27 ist bei den Proben mit CMVoriEGFP Backbone so hoch, da durch oricoGPP die Potease vorliegt und so reife Partikel gebildet werden, wodurch die Konzentration an Capsidprotein erhöht wird.

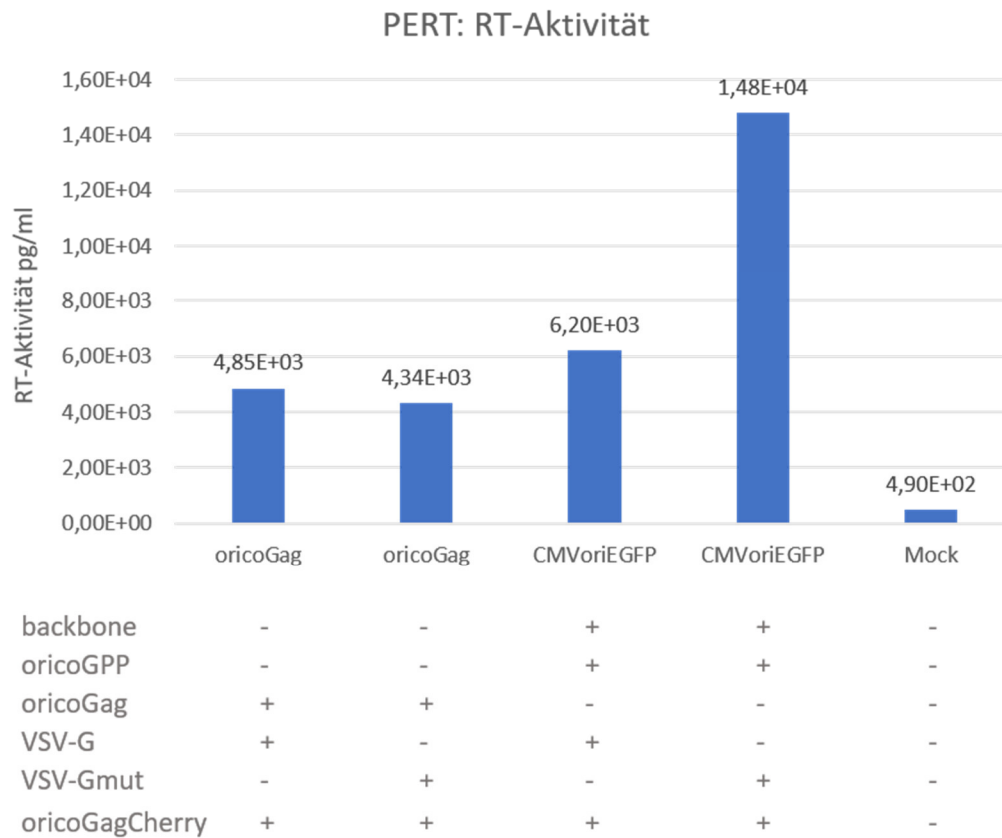


Abb.: 14 RT-Aktivität der Konstrukte gemessen über einen PERT-Assay

Die RT-Aktivität ist mit $1,48 \cdot 10^4$ pg/ml bei Probe 4 (CMVoriEGFP, oricoGagCherry; oricoGPP und VSV_{mut}) am stärksten (Abb.: 14). Die Differenz zwischen den Proben 3 und 4, deren Unterschied nur durch die Zugabe von VSV-G bzw. VSV-G_{mut} erreicht wird, besteht aus einer log-Stufe. Mit mehr als $1 \cdot 10^4$ pg/ml ist die Konzentration in Anwesenheit der Mutante deutlich höher.

Da die p27 Konzentration für die Produktion unreifer VLPs, im Gegensatz zu den Ansätzen für die Produktion reifer VLPs, so gering ist, wurden diese in den folgenden Transfektionsansätzen nicht weiter berücksichtigt.

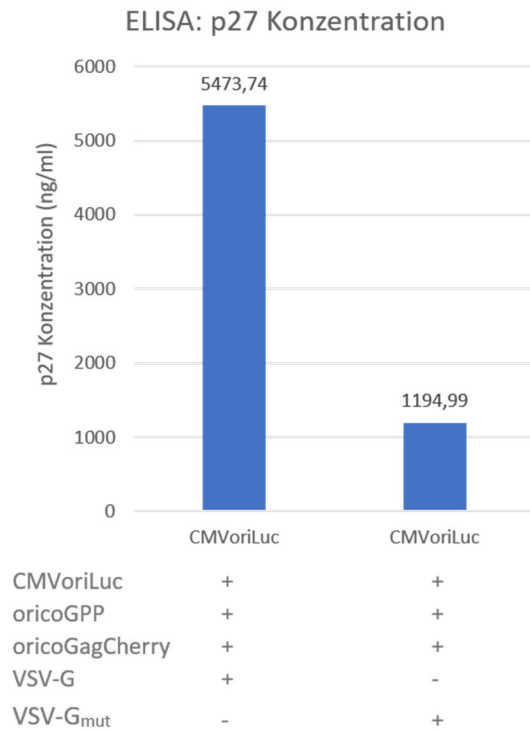


Abb.: 15 p27 Konzentration bei Zugabe von VSV-G bzw. VSV-G_{mut}

Durch die Verwendung von VSV-G im Vergleich der Mutante bei einem CMVoriLuc-Konstrukt zeigt die Veränderung innerhalb der p27 Konzentration (Abb.: 15). Mit über 5000 ng/ml besitzt das Konstrukt mit VSV-G eine 5-fach höhere Konzentration an p27 als das Konstrukt mit der Mutante.

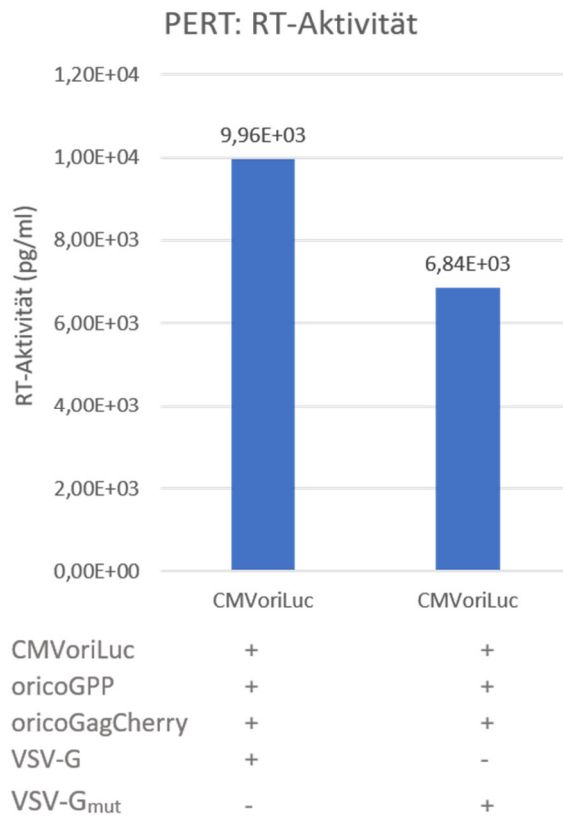


Abb.: 16 RT-Aktivität bei Zugabe von VSV-G bzw. dessen VSV-G_{mut}

Besonders auffällig ist die RT-Aktivität von CMVoriLuc mit VSV-G. Mit $9,96 \cdot 10^3$ pg/ml weist sie die höchste RT-Aktivität auf (Abb.: 16). Innerhalb der Auswertung von dem ELISA und PERT ist festzustellen, dass VSV-G_{mut} einen Einfluss auf die p27 Konzentration und die RT-Aktivität besitzt. (Abb.: 15, Abb.: 16)

3.4 FACS

Um Zellen nach einer Infektion mit den oben beschriebenen VLPs in Bezug auf die Intensität des fluoreszenzmarkierten Gag-Proteins untersuchen zu können, wurden die Proben durch ein Cytometer ausgewertet.

Dafür wurden Hek-293t Zellen einen Tag vor der Infektion ausgesät und dann über einen gewissen Zeitraum und mit einer bestimmten Viruskonzentration infiziert. Zwei verschiedene Konstrukte wurden dafür verwendet. Zum einen CMVoriLuc mit oricoGPP, oricoGagCherry und VSV-G, zum anderen der gleiche Ansatz aber anstelle von VSV-G wurde die nicht infektiöse Mutante von VSV-G verwendet. Die Virusproduktion erfolgte in T150 Zellkulturflaschen, da für die Infektionsexperimente eine relativ hohe Konzentration an Virus benötigt wurde.

Für das FACS-Experiment wurden die Zellen, mit dem Ansatz mit VSV-G, mit Konzentrationen von 160 und 320 ng/ml infiziert. Für den Ansatz mit der Mutante reichte die Viruskonzentration nur aus um mit 160 ng/ml zu infizieren. Für die Analysen der Zellen nach der Infektion wurde die Infektion 30 min und 4 h nach Zugabe der VLPs gestoppt und die Zellen geerntet.

Um den an oricoGagCherry gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff mCherry maximal anregen zu können, benötigt man einen gelben bzw. grünen Laser, der Proben bis zu einer Wellenlänge von 610 nm anregen kann. Für den „LSR II Flow Cytometer“ war jedoch nur ein blauer Laser verfügbar, wodurch im Absorptionsspektrum nur 10 % erreicht wurden. Die Bedienung des FACS-Gerätes und die Auswertung mit der Software „FlowJo“ erfolgte durch Dr. Steve Norley. Es wurden 100.000 Zellen pro Probe analysiert.

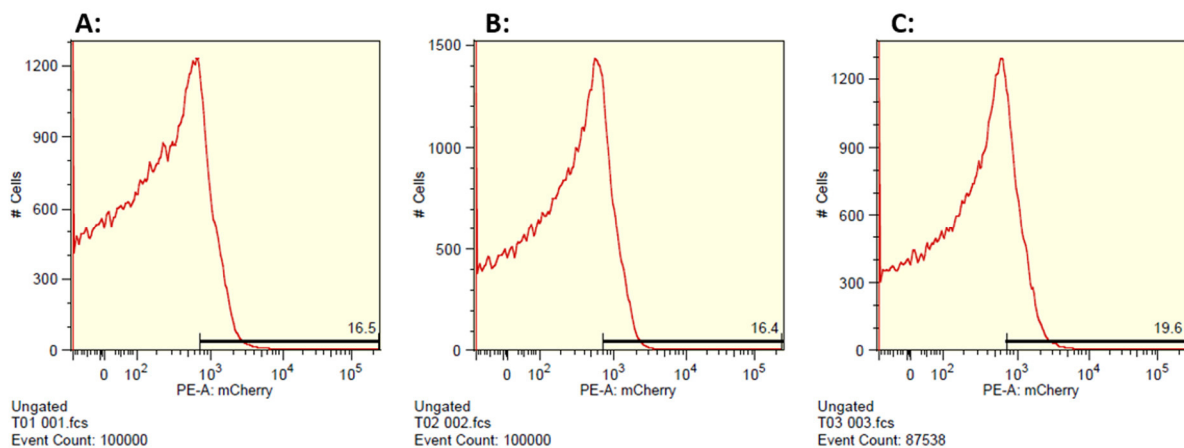


Abb.: 17 Ergebnisse des FACS nach einer Infektionszeit von 30 min

A) VSV-G Konstrukt; 160 ng B) VSV-G Konstrukt, 320 ng C) VSV-Gmut-konstrukt, 160 ng

Die rechts untenstehenden Zahlen spiegeln die Werte der positiven Fluoreszenz, ausgehend von der negativ Kontrolle, wieder.

Nach einer Infektionszeit von 30 min waren kaum Unterschiede festzustellen. Weder zwischen den gleichen Konstrukten, aber mit unterschiedlicher Konzentration, noch zwischen VSV-G und VSV-G_{mut}. Die Intensität lag bei allen drei Proben bei ca. $4 \cdot 10^3$ (Abb.: 17)

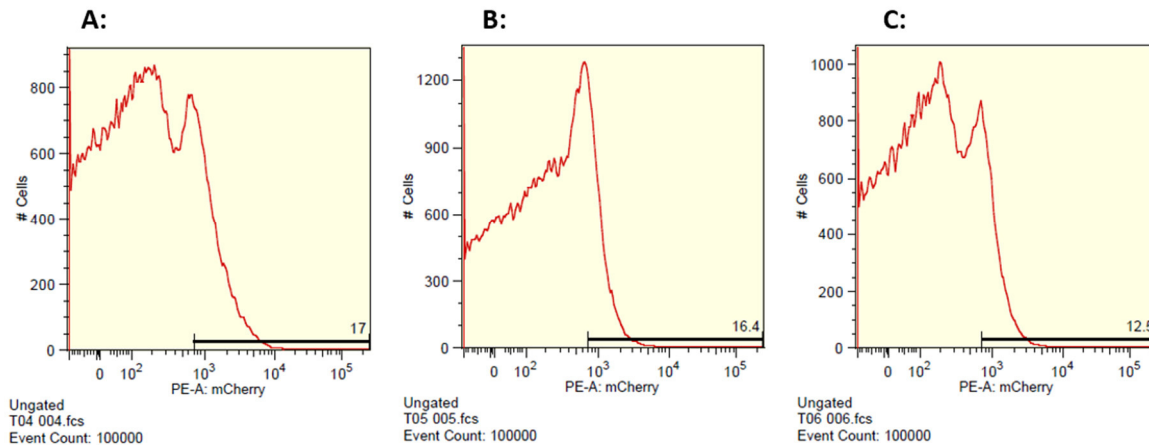


Abb.: 18 Ergebnisse des FACS nach einer Infektionszeit von 4 h

A) VSV-G Konstrukt; 160 ng B) VSV-G Konstrukt, 320 ng C) VSV-Gmut-konstrukt, 160 ng

Die rechts untenstehenden Zahlen spiegeln die Werte der positiven Fluoreszenz, ausgehend von der negativ Kontrolle, wieder.

Nach 4 h waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Konstrukten erkennbar. Bei den Proben, welche mit 160 ng infiziert wurden, haben sich so genannte „Schultern“ ausgebildet. Die Intensität der Proben mit VSV-G stieg bis zu ca. $1 \cdot 10^4$ an. Die Intensität bei dem Konstrukt mit VSV-G_{mut} änderte sich nicht (Abb.: 18).

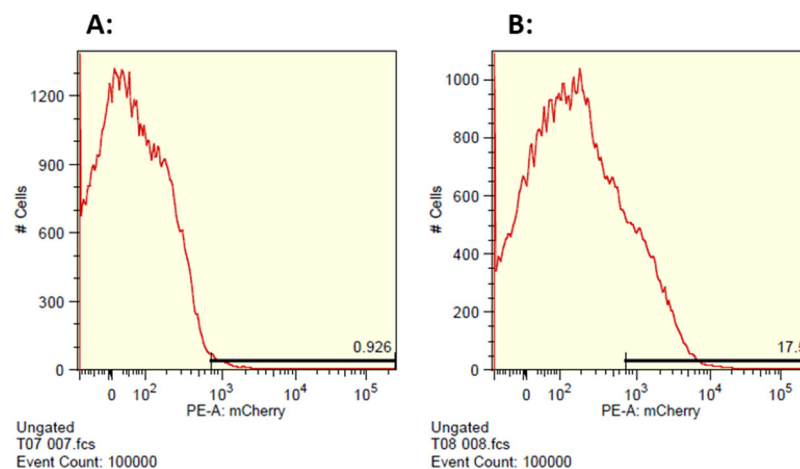


Abb.: 19 Ergebnisse des FACS von den Kontrollproben

A) Negativkontrolle durch Mock B) Zellen mit transfiziertem oricoGagCherry

Die rechts untenstehenden Zahlen spiegeln die Werte der positiven Fluoreszenz, ausgehend von der negativ Kontrolle, wieder.

Nach der Messung wurde eine Kompensation aller Proben durchgeführt um die Emission des Farbstoffes in anderen Kanälen zu verhindern und zu korrigieren. Mithilfe der negativ Kontrolle durch die Mock-Zellen konnte die Fluoreszenz ausgehend von oricoGagCherry analysiert werden (Abb.: 19). Die Prozentzahl ist in den Abbildungen zu finden.

Für die Auswertungen wurden jeweils die Proben mit gleicher Konzentration verglichen.

Die Proben, welche nach 30 min gemessen wurden weisen keine großen Unterschiede auf.

Anhand eines Überlagerungsbildes kann man feststellen, dass die Intensität zwischen VSV-G und VSV-G_{mut} keinen Unterschied gibt (Abb.: 20 A).

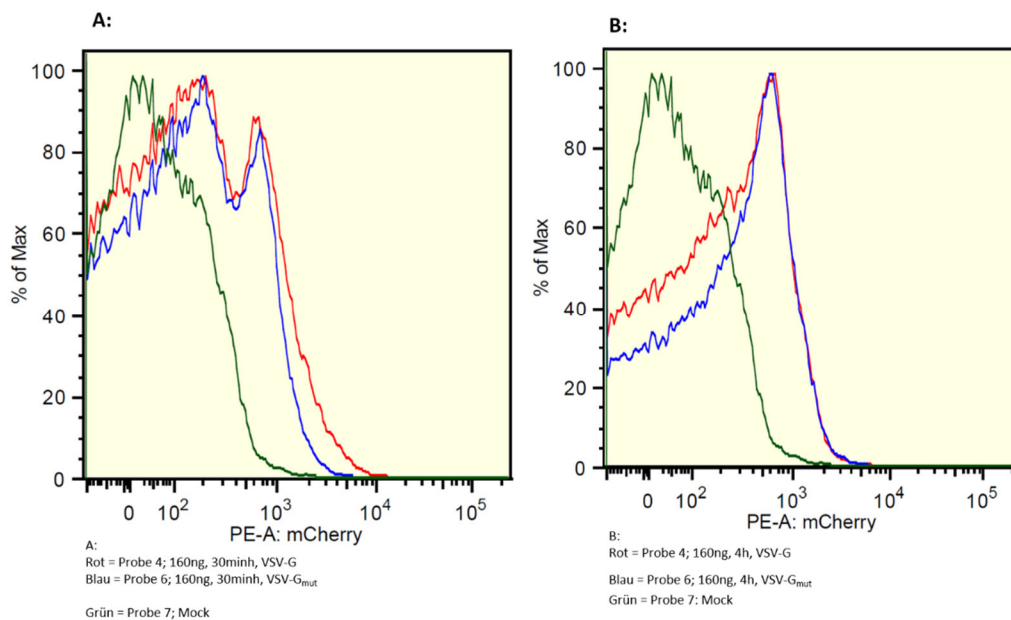


Abb.: 20 Overlay der FACS-Ergebnisse;

Vergleich zwischen VSV-G und VSV-G_{mut} zu den unterschiedlichen Zeitpunkten

A) 30 min nach der Infektion B) 4 h nach der Infektion Grün kennzeichnet Mock-Zellen

Im Gegensatz zu der Infektion nach 30 min können Unterschiede bei der 4 h Infektion beobachtet werden. Beide Proben weisen nach 4 h eine Art „Schulter“ auf (Abb.: 18 B). Man erkennt, dass die Intensität der Probe mit VSV, nach 4 h zugenommen hat. Von ca. $5 \cdot 10^3$ ist eine Steigerung bis zu $1 \cdot 10^4$ erkennbar. Bei dem Konstrukt mit der Mutante ist keine Veränderung der Intensität festzustellen. Jedoch kann ein Rückgang der positiv markierten Zellen festgestellt werden (Vergleich Abb.: 17 C, Abb.: 18 C). Hier ist der Wert von 19,6 % nach 30 min auf 12,5 % nach 4 h gesunken. Bei den Konstrukten mit dem funktionsfähigem VSV ist kaum ein Unterschied bzw. nur eine geringe Erhöhung der Prozentzahl an positiver Fluoreszenz feststellbar (Abb.: 17 A/B, Abb.: 18 A/B). Die Werte haben sich bei einer Konzentration von 160 ng von 16,5 % auf 17 % erhöht. Bei der doppelten Konzentration von 320 ng sind die Werte gleichgeblieben.

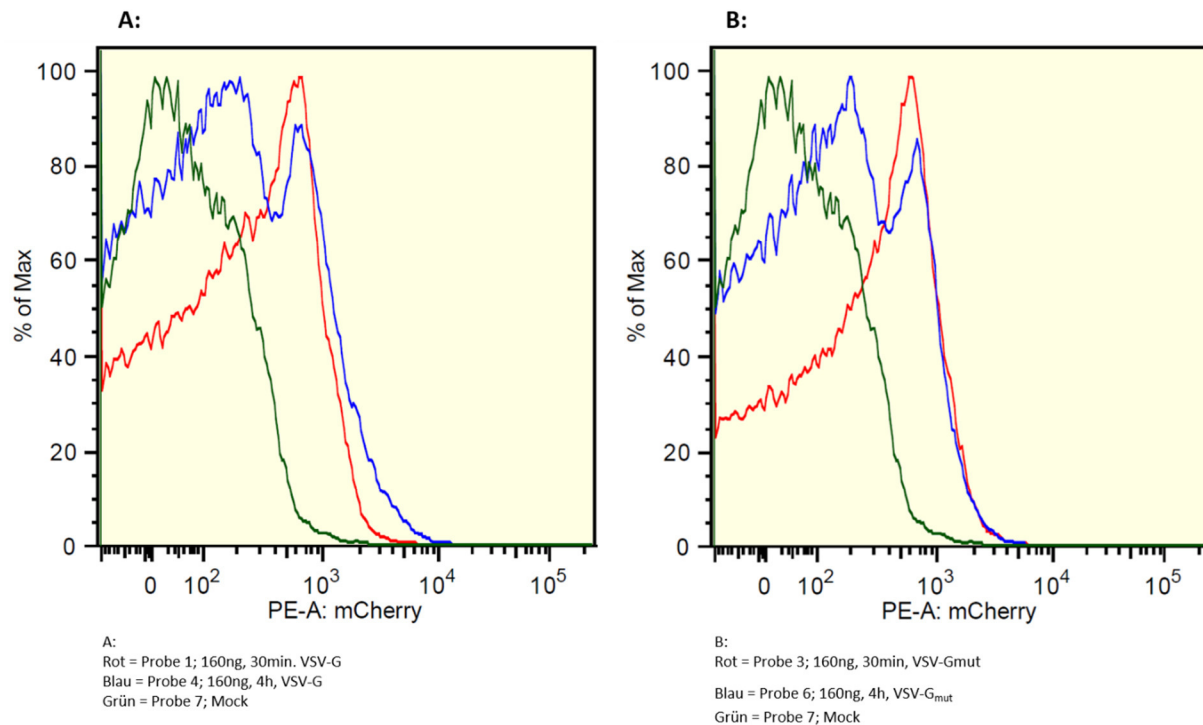


Abb.: 21 Overlay der FACS-Ergebnisse; Vergleich zwischen VSV-G und VSV-G_{mut}
 A) VSV-G nach 30 min (rot) und 4 h (blau) B) VSV-G_{mut} nach 30 min (rot) und 4 h (blau) Grün kennzeichnet Mock-Zellen

Anhand dieser Überlagerungsbilder wird der Anstieg der Intensität bei dem VSV-G Konstrukt während der unterschiedlichen Zeitpunkte verdeutlicht. Zu erkennen ist der Anstieg der Intensität von ca. $5 \cdot 10^3$ auf $1 \cdot 10^4$. Dies kann daran liegen, dass die Viren nach 30 min zum Großteil an die Zellen angeheftet sind und nur ein kleiner Teil schon in das Cytoplasma gelangt ist. Innerhalb der 4 h hat sich das Verhältnis zwischen den angehefteten Viren und den in das Cytoplasma eingedrungenen Viren verändert, sodass sich mehr Viren innerhalb der Zelle befindet. Dadurch wurde die Intensität der roten Fluoreszenz verstärkt (Abb.: 20 B).

Anhand von Abb.: 21 wird deutlich, dass sich die Intensität der VSV-G_{mut} Konstrukte nicht verändert hat bzw. die Konzentration sogar abgenommen hat. Insgesamt wurden verschiedene Effekte beobachtet. Was bei beiden Konstrukten gleichermaßen ausgebildet ist, ist die Fluoreszenz nach Zugabe der Viren auf die Zelle und Analyse nach 30 min. Das Anheften der Viren an die Zellen ist unabhängig von der Zugabe von VSV-G oder VSV-G_{mut} (Abb.: 20 A). Nach einer Infektionszeit von 4 h können Unterschiede zwischen den Konstrukten festgestellt werden. Die Steigerung der Intensität mit dem VSV-G Konstrukt können auf die Entry-Prozesse des Virus zurückgeführt werden. Mehrere Möglichkeiten können währenddessen eintreten. Zum einen kann das Virus durch Endosomen aufgenommen werden. Dort besitzen sie

unterschiedliche Halbwertszeiten, wodurch sie unterschiedlich schnell verdaut werden können. Zum anderen können sie aber auch in das Cytoplasma gelangen, wo sie auch verdaut werden können bzw. auf Grund der Ausbildung reifer Viruspartikel in sich zusammenfallen.

4. Diskussion

Studien zeigen, dass die Wildtypsequenz von HERV-K113 aufgrund von Mutationen nur eine schwache Expression viraler Proteine aufweist. Dies wird durch die geringe Freisetzung nicht funktioneller, viraler Partikel deutlich.^{[25][17]} Durch die Generierung von viralen Genomen, die auf der Konsensussequenz von bekannten HERV-K(HML-2) Proviren basieren und somit potentiell eine ehemalige exogene Form widerspiegeln, wurde gezeigt, dass die daraus resultierenden viralen Proteine zu virusartigen Partikeln assemblieren können.^{[15][16][26]} Durch die Generierung einer codonoptimierten möglichen Wildtypsequenz von HERV-K113 (oricoHERV-K113) konnte die Expression viraler Proteine, sowie auch die Freisetzung viraler Partikel gesteigert werden.^{[17][27]} Diese Sequenz bildet eine gute Grundlage zur Forschung an der frühen Eintrittsphase der HERV-K113 Viren. Hauptaugenmerk dieser Arbeit bildete die Identifikation geeigneter Methoden zur Messung des Entry.

4.1 oricoGagCherry

Das Vorläuferprotein Gag spielt für die Assemblierung und Freisetzung von Retroviren eine große Rolle. Ohne dieses Strukturprotein ist die Bildung viraler Partikel nicht möglich. Allein die Expression des Gag-Proteins führt *in vitro* zur Assemblierung virusartigen Partikeln (VLPs).^{[28][29][30]} Durch das Fehlen der viralen Protease sind die Partikel nicht replikationskompetent und verbleiben im unreifen Zustand. Da das Strukturprotein Gag den Großteil des Proteinanteils viraler Partikel ausmacht, bietet es eine gute Grundlage für die Generierung fluoreszenzmarkierter, viraler Partikel. Fluoreszenzmarkiertes Gag kann in die Partikel eingebracht werden. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass das Verhältnis zwischen markiertem und unmarkiertem Gag nicht zu hoch ist, da die Funktion des Polystrukturproteins beeinträchtigt werden kann.^{[31][2]}

Durch lichtmikroskopische Arbeiten können die zu untersuchenden Proteine direkt nach der Expression mittels Fluoreszenz *in vitro* detektiert werden.^[21] Fluoreszenzproteine eignen sich daher für kinetische Analysen. Bereits bei HIV-1 oder MLV konnten durch fluoreszenzmarkierte Proteine Einblicke in die retroviralen Replikationsprozesse wie

Transport, Assemblierung und Freisetzung viraler Partikel gewonnen werden.^{[29][32]} Es ist jedoch darauf zu achten, dass nicht alle Fluoreszenzproteine für solche Untersuchungen geeignet sind. Einige können toxisch auf die Zellen wirken, eine geringe Fotostabilität aufweisen oder das markierte Protein an seiner natürlichen Faltung hindern.^[33] Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzproteine EGFP und Cherry wirken nicht toxisch auf biologische Systeme. Im Gegensatz zu EGFP, weist Cherry nur eine halb so starke relative Helligkeit auf.^[24]

Damit eine fluoreszierende Detektion ermöglicht werden kann, ist ein bestimmtes Mischungsverhältnis erforderlich. Um keine tubulären Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche zu bilden, darf das Verhältnis zwischen oricoGFP und oricoGagCherry nicht zu hoch ausgewählt werden. Das Anlagern von mCherry an Gag führt zu einer veränderten Größe des Polyproteins wodurch sich während der Assemblierung tubuläre Strukturen bilden können. Daher wurden die Mischungsverhältnisse 1:5 und 1:10 innerhalb der Experimente untersucht. Die Ergebnisse lieferten keine allzu großen Unterschiede zwischen den beiden Mischungsverhältnissen. Daher wurde das 1:5 Verhältnis ausgewählt, wodurch mehr Cherry integrieren kann und eine erhöhte Fluoreszenz stattfinden kann.^[2]

Zusammenfassend muss darauf geachtet werden, dass ausreichend unmarkiertes Gag in VLPs inkorporiert wird damit die Funktionalität gewährleistet werden kann. Außerdem muss genügend fluoreszenzmarkiertes Gag eingebaut werden, um ein starkes und stabiles Fluoreszenzsignal zu erhalten. Im Vergleich zu anderen rotfluoreszierenden Proteinen besitzt mCherry eine sehr gute Fotostabilität obwohl die relative Helligkeit im Vergleich zu EGFP nur die Hälfte beträgt. Bei mStrawberry handelt es sich beispielsweise um ein rotfluoreszierendes Protein, welches im Gegensatz zu mCherry eine höhere relative Helligkeit besitzt, aber nur eine geringe Fotostabilität aufweist. mCherry ist daher für Markierungen mit roter Fluoreszenz eine gute Wahl.^[34]

4.2 Virusproduktion und Charakterisierung

Die Herstellung von unterschiedlichen Virus-like particles war Bestandteil dieser Arbeit. Es wurden reife und unreife VLPs hergestellt um den Entry-Prozess bei HERV-K113 besser nachvollziehen zu können. Der Versuch beinhaltete die Bildung von VLPs nur durch Gag-

Partikel, die mit VSV pseudotypisiert worden sind. In dem oricoGagCherry Konstrukt wird das Gen für die Protease nicht codiert, wodurch sich diese nicht ausbilden kann und die Reifung viraler Partikel nicht möglich ist. Es konnten daher nur unreife VLPs produziert werden. Experimentell konnte hier jedoch gezeigt werden, dass die Produktion der unreifen Virus-like particles sehr gering war. Die im ELISA gemessene p27-Konzentration war so niedrig, dass weitere Versuche mit den unreifen VLPs nicht zielführend gewesen wären, da nicht genügend Zellen hätten infiziert werden können (Abb.: 10). Man kann davon ausgehen, dass oriHERV-K113 Gag alleine keine Partikel sezernieren kann.

Da die Bildung von VLPs in Gag bei HIV-1 schon erfolgreich durchgeführt wurde, war die Annahme, dass dies auch in HERV-K113 möglich ist.^[35] Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bildung von VLPs alleine durch Gag jedoch nicht nachgewiesen werden.

Durch die Bildung unreifer VLPs sollte versucht werden, das Eindringen der Partikel in das Cytoplasma zu untersuchen. Reife virus-ähnliche Partikel zerfallen sehr schnell, wenn sie in das Cytoplasma gelangen. Daher sollte experimentell geprüft werden, ob Unterschiede zwischen den reifen und unreifen VLPs erkennbar sind. Es besteht die Annahme, dass unreife, nur durch Gag hergestellte Partikel stabiler sind, da sie weder Protease noch Polymerase beinhalten. Da die Bildung von unreifen VLPs durch Gag nicht möglich war, konnten innerhalb dieser Arbeit keine Ergebnisse dahingehend erzielt werden.

Bei der Herstellung reifer VLPs mithilfe eines Backbones bzw. einer verpackten RNA mit Psi-Side durch CMVoriEGFP und CMVoriLuc war es möglich eine hohe Produktion von VLPs zu bilden.^[36] Durch das Einbringen von oricoGPP konnten die VLPs auf Grund der Protease reifen. Hier sollte eine Unterscheidung zwischen VSV-G und VSV-G_{mut} erzielt werden. Die Auswahl von VSV-G beruht auf einer erhöhte Infektiosität. Während der durchgeführten Experimente konnte man eine Infektion fast aller Zellen ermöglichen. Durch das mutierte VSV (Addgene, LGC Standards Teddington, UK) sollte es während der Experimente zu keinem spezifischen Entry-Prozess kommen (Abb.: 7). Dadurch soll der Entry-Prozess bei HERV-K113 durch VSV-G im Vergleich besser verstanden und verdeutlicht werden. Die Verwendung von infektiösen und nicht infektiösen VLPs sollte eine Unterscheidung zwischen nur an der Zellmembran angehefteten, gegenüber den im späteren Verlauf der Infektion dann auch in das Cytoplasma eingetretenen, VLPs erlauben

4.4 FACS

Um die Unterschiede zwischen den Entry-Prozessen bei VSV-G und VSV-G_{mut} bestimmen zu können, wurden die Proben durch ein FACS gemessen und anschließend ausgewertet. Zwei verschiedene Zeitpunkte wurden ausgewählt um den Prozess auch zeitlich eingrenzen zu können, diese beziehen sich auf 30 min und 4 h. Bei VSV-G_{mut} sollte kein spezifischer Entry festgestellt werden, im Gegensatz zu VSV-G. Anhand von Abb.: 17, Abb.: 18 und Abb.: 19 können Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und den Intensitäten erfasst werden. Die Intensität der Konstrukte mit VSV-G erhöht sich (Abb.: 20) was durch verschiedene Effekte hervorgerufen werden konnte. Wenn die HEK-293T Zellen mit dem Virus infiziert werden, heftet sich dieses an die Zellmembran bevor es in die Zelle eindringen kann. Dieser Vorgang ist unabhängig von dem Einbau einer funktionalen Hüllproteins (VSV-G) oder eines nicht-infektiösen Glycoproteins (VSV-G_{mut}). Durch das VSV-G-vermittelte Entry können die VLPs in das Cytoplasma gelangen, wo sie unterschiedlich schnell verdaut bzw. abgebaut werden. Eine andere Möglichkeit ist der Eintritt in die Wirtszelle über Endosomen. VLPs, die in Endosomen gelangen besitzen unterschiedliche Halbwertszeiten, wodurch auch sie unterschiedlich schnell verdaut werden können. Anhand der fluoreszenzmarkierten Proteine kann der zeitliche Verlauf des Eintritts nachvollzogen werden.

Durch die Intensitätssteigerung der Fluoreszenz nach 4 h, ist davon auszugehen, dass die VLPs durch das VSV-G in die Zielzellen eindringen konnten und dort aber noch nicht verdaut worden sind. Im Gegensatz dazu wurde bei den Proben mit dem mutierten VSV ein Rückgang der prozentual gemessenen Fluoreszenz festgestellt. Das liegt vor allem daran, dass die VLPs nicht in die Zielzellen, auf Grund des verhinderten Entry, eindringen können und nur an der Zellmembran anheften. Der Grund für den Rückgang der Fluoreszenz ist darauf begründet, dass die VLPs verblassen bzw. die Anheftung nach 4 h minimalisiert ist und dadurch die Detektion von oricoGagCherry nicht mehr möglich ist.

Um detailliertere Ergebnisse zu erhalten, wäre die Auswahl mehrerer Infektionszeitpunkte von Vorteil. Durch Veränderungen der Infektionsdauer könnten mehr Ergebnisse in Hinblick auf die Entry-Prozesse gewonnen werden. Zusätzlich sollten Überlegungen erfolgen wie man der Verdauung bzw. dem Zerfall innerhalb des Cytoplasmas entgegenwirken könnte.

Die Verfügbarkeit eines blauen Lasers bildete eine Einschränkung der Messmethode. Die rote Fluoreszenz des mCherry wird bei einer Wellenlänge von 561 nm angeregt. Die vollständige Detektierung kann daher durch die Verwendung eines gelben bzw. grünen Laser erfolgen. In diesem Versuch stand keiner der beiden Laser zur Verfügung, wodurch ein blauer Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt wurde. Der Laser hat den Nachteil, dass er die Probe nicht vollständig detektieren kann. Es konnten daher 10 % des Absorptionsspektrums der Probe detektiert werden. Für Reproduktionsversuche sollten dieselben Experimente bei einer anderen Wellenlänge durchgeführt werden bzw. kann ein entsprechend anderes Fluorophor genutzt werden.

Die Verschiebung der Intensität könnte bei genauere zeitlicher Unterscheidung besser bestimmt werden bzw. wäre die Analyse und Bestimmung des Eintritts der Viren in die Zellen sehr viel genauer.

Eine genau Bestimmung, wieviel der angehefteten VLPs dann auch in das Cytoplasma gelangen und für wie lange das Capsid erhalten bleibt, würde zur weiteren Aufklärung der Infektionsprozesse der ehemaligen exogenen HERV beitragen.

Quellenverzeichnis

- [1] P. Kramer, V. Lausch, A. Volkwein, K. Hanke, O. Hohn, N. Bannert, *Virology* **2016**, *487*, 121–128.
- [2] A. Zimmermann, Intrazellulärer Transport, Assembly Und Egress Des Endogenen Betraretrovirs HERV-K113, **2014**.
- [3] K. Hanke, P. Kramer, S. Seeher, N. Beimforde, R. Kurth, N. Bannert, *J. Virol.* **2009**, *83*, 12790–12800.
- [4] S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, H. Schätzl, *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag, **2010**.
- [5] T. Shioda, H. Shibuta, **1990**, *48*.
- [6] O. Hohn, K. Hanke, N. Bannert, *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 246.
- [7] B. G. Luukkonen, W. Tan, S. Schwartz, *J. Virol.* **1995**, *69*, 4086–94.
- [8] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2011**, *409*, 860–921.
- [9] R. Löwer, J. Löwer, R. Kurth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 5177–5184.
- [10] R. P. Subramanian, J. H. Wildschutte, C. Russo, J. M. Coffin, *Retrovirology* **2011**, DOI 10.1186/1742-4690-8-90.
- [11] C. Magin-Lachmann, S. Hahn, H. Strobel, U. Held, J. Lower, R. Lower, *J Virol* **2001**, *75*, DOI 10.1128/JVI.75.21.10359-10371.2001.
- [12] G. Turner, M. Barbulescu, M. Su, M. I. Jensen-Seaman, K. K. Kidd, J. Lenz, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1531–1535.
- [13] A. R. Jha, S. K. Pillai, V. A. York, E. R. Sharp, E. C. Storm, D. J. Wachter, J. N. Martin, S. G. Deeks, M. G. Rosenberg, D. F. Nixon, et al., *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 2617–2626.
- [14] J. P. Stoye, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, DOI 10.1016/S0960-9822(01)00553-X.
- [15] M. Dewannieux, S. Blaise, T. Heidmann, *J Virol* **2005**, *79*, DOI 10.1128/JVI.79.24.15573-15577.2005.
- [16] Y. N. Lee, P. D. Bieniasz, *PLoS Pathog* **2007**, *3*, DOI 10.1371/journal.ppat.0030010.
- [17] N. Beimforde, K. Hanke, I. Ammar, R. Kurth, N. Bannert, *Virology* **2008**, DOI 10.1016/j.virol.2007.09.036.
- [18] QIAGEN, *Manuals* **2011**, 4–5.
- [19] A. Lovatt, J. Black, D. Galbraith, I. Doherty, M. W. Moran, A. J. Shepherd, A. Griffen, A. Bailey, N. Wilson, K. T. Smith, *J. Virol. Methods* **1999**, *82*, 185–200.
- [20] N. Jouvenet, S. J. D. Neil, C. Bess, M. C. Johnson, C. A. Virgen, S. M. Simon, P. D.

- Bieniasz, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, 2296–2310.
- [21] B. Brandenburg, X. Zhuang, **2007**, *5*, 1–23.
- [22] O. Hohn, K. Hanke, V. Lausch, A. Zimmermann, S. Mostafa, N. Bannert, *Viruses* **2014**, *6*, 4332–4345.
- [23] M. George, T. Schwecke, N. Beimforde, O. Hohn, C. Chudak, A. Zimmermann, R. Kurth, D. Naumann, N. Bannert, *Retrovirology* **2011**, *8*, 1–15.
- [24] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 905–909.
- [25] K. Boller, K. Schönfeld, S. Lischer, N. Fischer, A. Hoffmann, R. Kurth, R. R. Tönjes, *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 567–572.
- [26] K. Hanke, O. Hohn, L. Liedgens, K. Fidgeke, J. Wamara, R. Kurth, N. Bannert, *J. Virol.* **2013**, *87*, 11019–11030.
- [27] C. Chudak, N. Beimforde, M. George, A. Zimmermann, V. Lausch, K. Hanke, N. Bannert, *Retrovirology* **2013**, *10*, 1–14.
- [28] J. Vermeire, E. Naessens, H. Vanderstraeten, A. Landi, V. Iannucci, A. van Nuffel, T. Taghon, M. Pizzato, B. Verhasselt, *PLoS One* **2012**, *7*, DOI 10.1371/journal.pone.0050859.
- [29] N. Jouvenet, S. M. Simon, P. D. Bieniasz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 19114–19119.
- [30] D. R. Larson, M. C. Johnson, W. W. Webb, V. M. Vogt, *Pnas* **2005**, *102*, 15453–15458.
- [31] N. Jouvenet, P. D. Bieniasz, S. M. Simon, **2008**, *6*, 236–240.
- [32] N. M. Sherer, M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham, W. Mothes, *Traffic* **2003**, *4*, 785–801.
- [33] J. Wiedenmann, F. Oswald, G. U. Nienhaus, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 1029–1042.
- [34] D. W. Piston, R. E. Campbell, R. N. Day, M. W. Davidson, “Education in Microscopy and,” can be found under <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/anthozoafps.html>, **n.d.**
- [35] D. Gheysen, E. Jacobs, F. Deforesta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, M. Dewilde, *Cell* **1989**, *59*, 103–112.
- [36] J. A. Webb, C. P. Jones, L. J. Parent, J. A. Webb, C. P. Jones, L. J. Parent, I. Rouzina, **2013**, 1078–1088.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderen Dank gilt:

Prof. Dr. Norbert Bannert für die Ermöglichung der Durchführung meiner Bachelorarbeit am RKI im FG 18 „HIV und andere Retroviren“, sowie der Begutachtung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Christian Dahmann für die Begutachtung meiner Bachelorarbeit von Seiten der TU Dresden.

Dr. Oliver Hohn für die Unterstützung, Planung und Hilfestellung jeglicher Art.

Dr. Steve Norley für die Durchführung und Auswertung der FACS-Analyse.

Der gesamten Arbeitsgruppe des FG 18, welche mir zu jeder Zeit bei Fragen und Problemen behilflich waren und mir so den Einstieg in den Laboralltag erleichtert haben. Dabei möchte ich vor allem Anja Wolf meinen Dank aussprechen.

Meiner Familie, die mich während der gesamten Bearbeitungszeit unterstützt hat.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig, ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der von mir angegebenen Quellen angefertigt zu haben. Alle aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt.

Dresden, den 13.08.2018

Henriette Schwotzer