



ROBERT KOCH INSTITUT



**Universität Potsdam**

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Ernährungswissenschaft

# **Restriktion von HERV-K(HML-2) durch IFI-16**

**Masterarbeit**

zur Erlangung des Titels Master of Science im Studienfach Ernährungswissenschaft

vorgelegt von

**Antonia Zumblick**

aus Westerland/ Sylt

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

Berlin, 26. Juli 2019

## **Gutachter**

- 1.** Prof. Dr. Norbert Bannert  
Robert Koch-Institut, FG18: HIV und andere Retroviren
- 2.** Dr. rer. nat. H. Rawel  
Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Potsdam



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>14</b>
3.1	Retroviren.....	14
3.1.1	Aufbau.....	15
3.1.2	Replikation.....	16
3.1.3	Humane endogene Retroviren.....	17
3.2	Virale Restriktionsfaktoren.....	20
3.2.1	IFI-16.....	20
<b>4</b>	<b>Zielstellung.....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
5.1	Material.....	25
5.1.1	Zelllinien.....	25
5.1.2	Bakterienstämme.....	25
5.1.3	Enzyme.....	25
5.1.4	Primer.....	25
5.1.5	Antikörper.....	26
5.1.6	Konstrukte/ Plasmide.....	27
5.1.7	Puffer, Medien und Reagenzien.....	28
5.1.8	Kits.....	30
5.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	30
5.1.10	Geräte.....	31
5.1.11	Software.....	31
5.2	Methoden.....	32
5.2.1	Methoden in der Zellkultur.....	32
5.2.1.1	Auftauen.....	32
5.2.1.2	Aussäen.....	32
5.2.1.3	Splitten.....	32
5.2.1.4	Kultivierung.....	33
5.2.1.5	Einfrieren.....	33

5.2.1.6	Transfektion .....	33
5.2.1.7	Präparation der Zellüberstände.....	34
5.2.1.8	Präparation der Zelllysate .....	34
5.2.2	DNA-Analytik .....	34
5.2.2.1	Transformation .....	34
5.2.2.2	Plasmidpräparation .....	34
5.2.2.3	DNA-Konzentration .....	35
5.2.2.4	Gel-Elektrophorese .....	35
5.2.2.5	Mutagenese .....	35
5.2.2.6	Sequenzierung nach Sanger.....	37
5.2.3	Protein-Analytik.....	38
5.2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	38
5.2.3.2	Western Blot .....	38
5.2.3.3	Luciferase-Aktivität.....	39
5.2.3.4	p27 ELISA.....	39
5.2.3.5	Bestimmung der RT-Aktivität .....	40
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
6.1	IFI-16 führt zur Restriktion von HERV-K113.....	43
6.2	Mutationen in den GC-Boxen des LTR-Promotors reduzieren nicht die Aktivität der 5'LTR von HERV-K113.....	57
6.3	Sp1 Cotransfektion hebt die Hemmung durch IFI-16 nicht auf.....	58
6.4	Die Kernlokalisierungssequenz ist essenziell für die virale Restriktion durch IFI-16 .....	59
6.5	IFI-16 inhibiert die Partikelproduktion des HERV-K Molekularklons nicht mehr, wenn der Molekularklon zu einem früheren Zeitpunkt transfiziert wurde .....	60
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>71</b>
<b>A</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>B</b>	<b>Anlagen.....</b>	<b>A</b>

# I Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zelllinien, Ursprung und Zellkulturmedium.....	25
<b>Tabelle 2:</b> Bakterienstämme.....	25
<b>Tabelle 3:</b> Enzyme.....	25
<b>Tabelle 4:</b> Primer und ihre Sequenzen.....	26
<b>Tabelle 5:</b> Antikörper .....	26
<b>Tabelle 6:</b> Konstrukte und Plasmide.....	27
<b>Tabelle 7:</b> Medien.....	28
<b>Tabelle 8:</b> Puffer und deren Zusammensetzung.....	28
<b>Tabelle 9:</b> Reagenzien und Chemikalien.....	29
<b>Tabelle 10:</b> Kits.....	30
<b>Tabelle 11:</b> Verbrauchsmaterialien.....	30
<b>Tabelle 12:</b> Geräte.....	31
<b>Tabelle 13:</b> Software .....	31
<b>Tabelle 14:</b> PCR-Reaktionsansatz für die Mutagenese.....	36
<b>Tabelle 15:</b> Cycler-Bedingungen Mutagenese-PCR.....	36
<b>Tabelle 16:</b> PCR Reaktionsansatz für die Sequenzierung.....	37
<b>Tabelle 17:</b> Cycler-Bedingungen Sequenzierungs-PCR.....	37
<b>Tabelle 18:</b> Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE....	38
<b>Tabelle 19:</b> Mastermix Pipettierschema für den PERT Assay.....	41
<b>Tabelle 20:</b> Cycler-Bedingungen PERT Assay.....	41

## II Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Phylogenie der Retroviren .....	14
<b>Abbildung 2:</b> Aufbau eines Retroviruspartikels .....	15
<b>Abbildung 3:</b> RNA-Genom eines infektiösen Viruspartikels .....	16
<b>Abbildung 4:</b> Integrierte Provirus-DNA .....	16
<b>Abbildung 5:</b> Retroviraler Replikationszyklus .....	17
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung des IFI-16 Proteins .....	21
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung der Unterformen von IFI-16A, IFI-16B und IFI-16C .....	21
<b>Abbildung 8:</b> Schema PERT Assay .....	41
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung von oriHERV-K113 .....	43
<b>Abbildung 10:</b> Western Blot von IFI-16 in den Zelllysaten von 293T Zellen nach der Transfektion mit oriHERV-K113 .....	44
<b>Abbildung 11:</b> IFI-16 reduziert die virale Partikelproduktion von oriHERV-K113 und oriST_HERV-K113 in 293T Zellen .....	45
<b>Abbildung 12:</b> IFI-16 reduziert die virale Partikelproduktion von oriHERV-K113 und oriST_HERV-K113 in HeLa und Sk-mel-28 Zellen .....	46
<b>Abbildung 13:</b> Absteigende Konzentration von IFI-16 führt zum Anstieg der viralen Partikelproduktion von oriHERV-K113 in Zellkulturüberständen von 293T Zellen ....	47
<b>Abbildung 14:</b> Schematische Darstellung von oricoGPP .....	47
<b>Abbildung 15:</b> Schematische Darstellung von HERV-KconGFP .....	48
<b>Abbildung 16:</b> Western Blot von IFI-16 in den Zelllysaten von 293T Zellen nach der Cotransfektion von oricoGPP und HERV-KconGFP .....	49
<b>Abbildung 17:</b> IFI-16 reduziert nicht die Partikelproduktion von HERV-KconGFP und oricoGPP .....	50
<b>Abbildung 18:</b> Cotransfektion von oricoGPP mit IFI-16 führt zu keiner Veränderung der p27 Capsidprotein Expression .....	51
<b>Abbildung 19:</b> Schematische Darstellung von HERV-KconGPP .....	51
<b>Abbildung 20:</b> IFI-16 reduziert nicht die Partikelproduktion von HERV-K Moleklarklonen mit einem CMV Promotor und der RU5 Region der 5'LTR .....	52
<b>Abbildung 21:</b> IFI-16 reduziert nicht die virale Partikelproduktion von HERV-K Moleklarklonen mit einem CMV Promotor und der RU5 Region der 5'LTR .....	53
<b>Abbildung 22:</b> Schematische Darstellung von CMV-RU5_oriSTHERV-K113 .....	53
<b>Abbildung 23:</b> Restriktionsverdau vom CMV-RU5_oriSTHERV-K113 Plasmid .....	54



<b>Abbildung 24:</b> IFI-16 reduziert nicht die RT-Aktivität von CMV-RU5_oriSTHERV-K113.....	54
<b>Abbildung 25:</b> IFI-16 hemmt nicht die GFP Expression von der CMV-GFP Kasette im <i>env</i> -Bereich von HERV-KconGFP .....	55
<b>Abbildung 26:</b> IFI-16 hemmt nicht die GFP Expression von der CMV-GFP Kasette im <i>env</i> -Bereich von HERV-KconGFP bei der Cotransfektion von HERV-KconGFP und HERV-KconGPP .....	56
<b>Abbildung 27:</b> IFI-16 reduziert nicht die CMV Promotor getriebene Luciferase-Aktivität.....	56
<b>Abbildung 28:</b> Mutationen in den GC-Boxen des LTR-Promotors reduzieren nicht die Aktivität der 5'LTR von HERV-K113.....	58
<b>Abbildung 29:</b> Sp1 Cotransfektion hebt die Hemmung durch IFI-16 nicht auf .....	59
<b>Abbildung 30:</b> Einfluss von verschiedenen Mutationen des IFI-16 Proteins auf die RT-Aktivität von oriST_HERV-K113.....	60
<b>Abbildung 31:</b> Einfluss von verschiedenen Zeitpunkten der Transfektion von IFI-16 nach der Transfektion von oriST_HERV-K113.....	61

### III Abkürzungsverzeichnis

AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
APOBEC3	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide like 3</i>
aq. dest.	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Delbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>env</i>	virales Genom für Hüllproteine
FKS	fetales Kälberserum
g	Zentrifugalkraft
Gag	Gruppen-spezifische Antigene
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Herma 7	<i>Human endogenous retrovirus monoclonal antibody 7</i>
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HML-2	<i>Human mouse mammary tumor virus like-2</i>
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
IFI-16	Interferon-induzierbares Protein 16
LB	<i>lysogeny brot</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
MNDA	<i>myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal
OPD	o-Phenylenediamin Dihydrochlorid
orico	original codon-optimiert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PERT	<i>qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase</i>
Pol	retrovirales Genom für enzymatische Aktivitäten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>

RT	Reverse Transkriptase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TRIM5 $\alpha$	<i>tripartite motif 5<math>\alpha</math></i>
tRNA	Transfer-RNA
VSV-G	Hüllprotein des <i>Vesicular stomatitis Virus</i>

# 1 Zusammenfassung

Das humane Genom besteht zu etwa 8 % aus viralen Erbinformationen von Retroviren. Die Viren haben im Laufe der Evolution die Vorfahren des Menschen fortwährend infiziert und werden seither vertikal über die Keimbahnzellen vererbt. Durch Mutationen und Deletionen können sich jedoch keine infektiösen und replikationsfähigen Viren mehr bilden. Ein Vertreter der HERV-K(HML-2) Familie, das HERV-K113, ist in der Lage virale Partikel zu bilden, jedoch sind auch diese nicht replikationsfähig. Zudem besitzt HERV-K113 offene Leserahmen für die viralen Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass in Krankheiten wie Krebs, Autoimmunkrankheiten und neurologischen Störungen die Aktivität von humanen endogenen Retroviren erhöht ist und die endogenen Retroviren womöglich zur Entstehung dieser Krankheiten beitragen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Interferon-induzierbare Protein (IFI)-16 auf verschiedene Viren eine hemmende Wirkung hat und somit als Restriktionsfaktor agiert.

Die postinsertionalen Mutationen in der HERV-K113 Sequenz wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ausfindig gemacht und mittels Mutagenese revertiert. Dies ermöglicht es, dass HERV-K113 als Moleklarklon in seiner vermutlich ursprünglichen Form beim Zeitpunkt der Infektion des Menschen untersuchen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkung von IFI-16 auf die Viruspartikelproduktion nach Transfektion von Moleklarklonen untersucht werden. Als Indikator für die Viruspartikelproduktion wird die Aktivität der Reversen Transkriptase herangezogen, die in Ab- oder Anwesenheit von IFI-16 bestimmt wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Viruspartikelproduktion von HERV-K113 durch IFI-16 stark gehemmt wird. Wurde im Moleklarklon jedoch der U3-Bereich der LTR-Region oder die gesamte LTR-Region mit einem CMV Promotor ausgetauscht, konnten diese nicht mehr gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die RU5-Region des Virusgenoms entscheidend für die hemmende Wirkung von IFI-16 ist, sondern auch der U3-Bereich und somit die gesamte LTR-Region am 5'-Ende. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kernlokalisierungssequenz des IFI-16 Proteins essenziell für die Restriktion von HERV-K113 ist. Die Ergebnisse legen nahe, dass IFI-16 seine hemmende Wirkung auf die virale Partikelproduktion von HERV-K113 im Zellkern ausübt.

## 2 Abstract

The human genome consists of approximately 8 % viral genetic information. These viruses infected the humans throughout the history of the humans and are transmitted vertical by the germline cells ever since. Due to mutations and deletions infectious and replicating virus can no longer be formed. HERV-K113 is a member of the HERV-K(HML-2) family and is able to form viral particles but still these particles are not infectious. Furthermore HERV-K113 owns open reading frames for the viral proteins. It was shown that in several diseases like cancer, autoimmune diseases and neurological disorders human endogenous retroviruses are more active and that these retroviruses perhaps contribute to the development of these diseases. It was shown that the interferon-inducible protein (IFI)-16 has an inhibitory effect on some viruses and therefore acts as a restriction factor.

The postinsertional mutations in the sequence of the HERV-K113 had been identified and reverted by the workgroup. In this way it is possible to examine the HERV-K113 molecular clone in its presumably original form at the point of infecting the humans. The aim of this work is to examine the effect of IFI-16 on the viral particle production after the transfection of molecular clones. As an indicator for viral particle production the activity of the reverse transcriptase should be used and measured in the absence or presence of the IFI-16 protein.

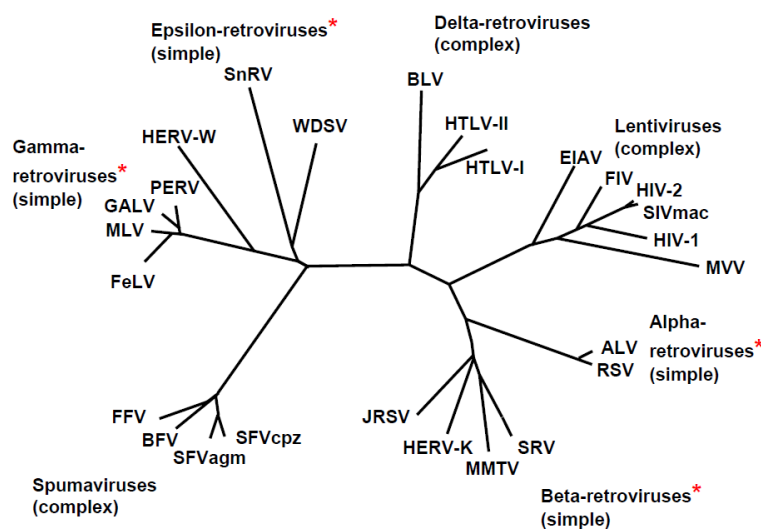
The results show a strong inhibition of the production of HERV-K113 virus-like particles in the presence of the IFI-16 protein compared to the absence of the protein. If the U3-region of the molecular clone was exchanged with a CMV promotor with the RU5-region still present, there was no inhibition of the viral replication through IFI-16 shown. Virus-like particles containing a CMV promotor instead of the entire LTR-region were not inhibited through the IFI-16 protein. These finding indicate that not only the RU5-region of the viral genome is responsible for the inhibitory effect of IFI-16 but the entire LTR-region consisting of the U3, R and U5 regions. In addition, it could be shown that the nuclear localization signal of the IFI-16 protein is essential for the restriction of HERV-K113. The results indicate that IFI-16 affects the viral replication cycle of HERV-K113 in the nucleus.

## 3 Einleitung

### 3.1 Retroviren

Retroviren bilden die Familie der *Retroviridae*. Vertreter dieser Familie sind umhüllte Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom, die die Ribonukleinsäure (RNA) in doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) umschreiben können. Dafür bilden und nutzen sie das Enzym *Reverse Transkriptase*. Liegt das virale Genom in Form von DNA vor, kann es in das Genom des Wirtes integriert werden und stellt das sogenannte „Provirus“ dar. [1-3]

Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, können Retroviren in Viren mit einfachem ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\varepsilon$ -Retroviren) und komplexem Genom ( $\delta$ -, *Lenti*-, *Spumaviren*) eingeteilt werden. Retroviren mit einfachem Genom besitzen die genetische Information für die gruppenspezifischen Antigene (Gag), enzymatische Proteine (Pol) und Glykoproteine (Env). Retroviren mit komplexem Genom bilden zusätzliche Proteine. [3, 4]



**Abbildung 1: Phylogenie der Retroviren.** [4]

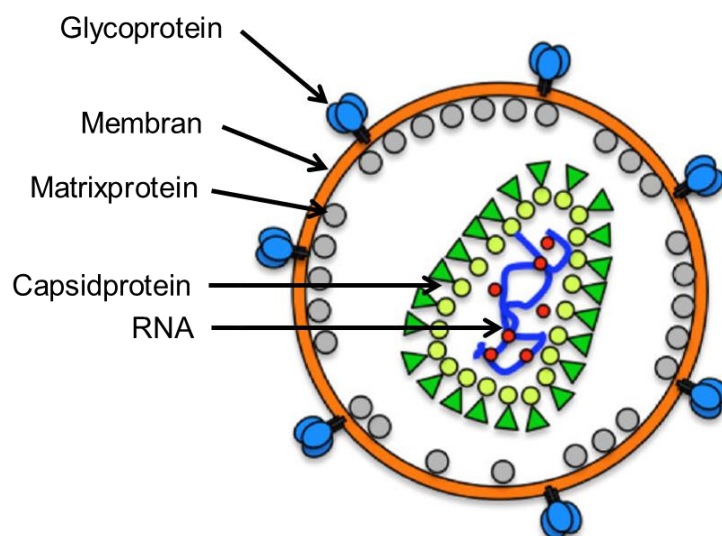
Außerdem unterscheidet man bei den Retroviren zwischen exogenen und endogenen Formen. Die exogenen Retroviren besitzen alle Informationen im Genom, die für den kompletten Infektionszyklus mit anschließender Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln nötig sind. Die Verbreitung ist von Organismus zu Organismus möglich. Endogene Retroviren sind in das Genom aller Zellen eines Organismus integriert und werden vertikal über Keimbahnzellen übertragen. Unter bestimmten Bedingungen kann die Produktion von exogenen, infektiösen Partikeln aktiviert werden. Die endogenen Retroviren sind genetisch meist nicht mehr vollständig, sodass oftmals nur die

*long terminal repeats* (LTR)-Regionen, die das Provirusgenom flankieren, erhalten sind. Diese Retroviren sind meist nicht mehr in der Lage infektiöse Viruspartikel freizusetzen. [1, 2]

Retroviren infizieren überwiegend Wirbeltiere und weisen eine hohe Wirtsspezifität auf. Bei einer Infektion können Symptome wie Immundefizienzen, neurologische Defekte und Tumorerkrankungen auftreten, aber auch harmlose Infektionsverläufe sind möglich. [1]

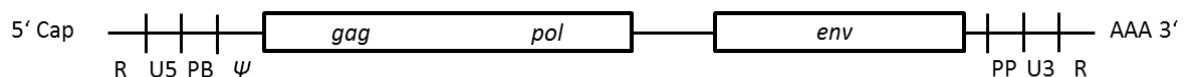
### 3.1.1 Aufbau

Ein Viruspartikel hat einen Durchmesser von ca. 100 nm. Im Inneren eines Viruspartikels befindet sich das Viruscapsid (*Core*), das aus Capsidproteinen (CA) aufgebaut ist. In dem Viruscapsid ist das Virusgenom in Form von einzelsträngiger RNA, die *Reverse Transkriptase* (RT), *Integrase* (IN) und *Protease* (PR) enthalten. Das Viruscapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, die einer Zytoplasmamembran ähnelt und die viralen Glykoproteine enthält. Die Link-Proteine stellen eine Verbindung zwischen Viruscapsid und Hüllmembran her. [1, 3]



**Abbildung 2: Aufbau eines Retroviruspartikels.** Modifiziert übernommen aus Zhang et al., 2015 [5]. Das Genom von Retroviren liegt in einzelsträngiger RNA mit einer Cap-Struktur am 5'-Ende und eine Polyadenylierung am 3'-Ende vor. Das Genom infektiöser Retroviren codiert für gruppenspezifische Antigene (Gag), enzymatische Aktivitäten (Pol) und Glykoproteine (Env). Die gruppenspezifischen Antigene (Gag) bilden die Strukturproteine, wie Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine. Das *Pol*-Gen codiert für die Enzyme Protease, Polymerase, Integrase und die Reverse Transkriptase. Das *env*-Gen codiert für die Hüllproteine, die in der Membran des Viruspartikels eingelagert sind.

gert sind. Das Genom von infektiösen Retroviren lässt sich in verschiedene Abschnitte unterteilen. Die R-Region (*redundant*) findet sich am 5'- und am 3'-Ende und besteht aus einer identischen Basenfolge. Die U5-Region (*unique*) befindet sich am 5'-Ende und enthält Sequenzen, die für die Integration des Provirus in das Zellgenom wichtig sind. An die U5-Region schließt die Primer-Bindestelle (PB) an. Darauf folgt die  $\Psi$ -Region, eine kurze Sequenzfolge, die für die Anlagerung des RNA-Genoms bei der Morphogenese von Bedeutung ist. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, folgen darauf die Sequenzen der codieren Gene für Gag, Pol und Env. Der nächste Abschnitt besteht aus dem Polypurintrakt (PP), der für die Synthese des DNA-Doppelstranges bei der reversen Transkription von Bedeutung ist. Anschließend folgt die U3-Region (*unique*), das Gegenstück zur U5-Region. Neben der Integration des Provirus ist die U3 Region essenziell für die Genexpression. [1, 2, 6]



**Abbildung 3: RNA-Genom eines infektiösen Viruspartikels.**

Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, bilden die U3-, R- und U5-Regionen am 5'- sowie 3'-Ende der integrierten Provirus-DNA die *long terminal repeats* (LTRs). Dies sind identische Sequenzfolgen an den beiden Enden des integrierten Provirusgenoms. Die LTRs enthalten Promotor- und Enhancer-Elemente und sind wichtig für die Kontrolle der retroviralen Genexpression. [1, 2]



**Abbildung 4: Integrierte Provirus-DNA.**

### 3.1.2 Replikation

Retroviren gelangen in das Zellinnere der Wirtszellen durch Anheftung der viralen Glykoproteine an spezifische Zelloberflächenrezeptoren der Zielzelle [3, 7]. Anschließend kommt es zur Verschmelzung der Zytoplasmamembran mit der Virushülle [1, 3]. Daraufhin bildet sich der *reverse Transkriptionskomplex* und die RT schreibt das einzelsträngige virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA um [1, 6]. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, geschieht die Reverse Transkription im Zytoplasma der Zielzelle und der synthetisierte DNA-Doppelstrang transloziert in den Zellkern [3, 7].



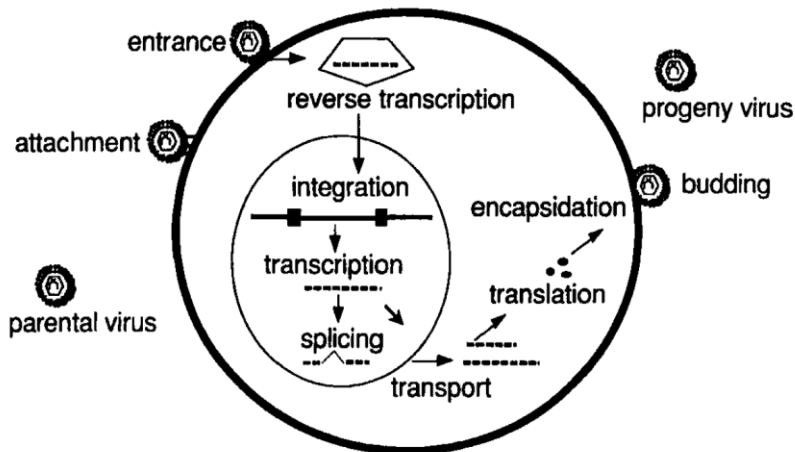


Abbildung 5: Retroviraler Replikationszyklus [7].

Das doppelsträngige virale DNA-Molekül wird anschließend mit Hilfe der Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert und wird in dieser Form als Provirus bezeichnet [1, 6, 7]. Bei der Integration wird die zelluläre DNA an einer willkürlichen Stelle geschnitten, wodurch zelluläre Gene zerstört oder aktiviert werden können. Die zellulären Reparaturmechanismen füllen die entstandenen Lücken auf und Ligasen schließen das Genom wieder zu einem Doppelstrang. Das Provirus wird wie die zellulären Gene transkribiert und schließlich in virale Proteine translatiert, die sich anschließend wieder zusammenlagern und als neue Viren freigesetzt werden. [1, 7]

Durch die Infektion und Integration des viralen Genoms in Keimbahnzellen des Menschen wurde das integrierte Provirus vertikal von Generation zu Generation nach den Mendelschen Regeln an die Nachfahren weitergeben. Schließlich wurde das virale Provirus zu einem festen Bestandteil des menschlichen Genoms. [4, 6, 8] Dies führte zur Entstehung von humanen endogenen Retroviren.

### 3.1.3 Humane endogene Retroviren

Humane endogene Retroviren (HERV) sind Überreste von früheren exogenen Viren, die im Laufe der Evolution die Vorfahren des Menschen fortwährend infiziert haben [2, 6]. Ungefähr 8 % des humanen Genoms besteht aus retroviralen Elementen, wobei besonders häufig LTR Strukturen zu finden sind [6, 9, 10].

HERVs werden in drei verschiedene Klassen nach ihrer Ähnlichkeit zu  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Retroviren (Klasse I),  $\beta$ -,  $\delta$ - und Lentiviren (Klasse II) sowie zu Spumaviren (Klasse III) eingeteilt [6]. Innerhalb der Klassen werden die humanen endogenen Retroviren in verschiedene Familien unterteilt [6]. Da Retroviren die Transfer-RNA (tRNA) des Wirtes nutzen, um die Reverse Transkription einzuleiten, haben sie komplemen-

täre Bindestellen entwickelt [11]. Die meisten HERV Familien wurden nach der Spezifität der tRNA benannt, die an die Primerbindestelle hybridisiert [9]. Dabei gibt der Einbuchstaben-Code der Aminosäure, die der tRNA angehängt ist, der HERV Familie ihren Namen (z.B.: Lysin → HERV-K) [6, 9].

Alle bekannten proviralen Sequenzen in der humanen Keimbahn haben die Fähigkeit zur Replikation und Produktion von vollständigen viralen Partikeln durch Deletionen und Mutationen verloren und sind somit nicht mehr infektiös [2, 6, 8]. Zudem wird die Expression von endogenen Retroviren in gesunden Zellen verhindert durch epigenetischen Kontrollmechanismen, wie DNA-Methylierung und Histon-Modifikation sowie antivirale Faktoren [8, 12]. Jedoch sind einige HERVs noch immer aktiv [12].

Dazu zählt auch die jüngste Familie der humanen endogenen Retroviren, die HERV-K (*Human mouse mammary tumor virus like-2* (HML-2)) Familie. Diese wurde vor ca. 35 Millionen Jahren in die Keimbahnzellen integriert [6]. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, gehören die Viren der HERV-K (HML-2) Familie zu den  $\beta$ -Retroviren und somit zur Klasse II der HERVs [3, 4]. Ungefähr 550 HERV-K Proviren und 6400 LTR-Strukturen sind im humanen Genom enthalten [13]. Die retroviralen Elemente der HERV-K (HML-2) Familie sind die am besten erhaltenen retroviralen Proviren [10]. Im Gegensatz zu den meisten HERVs, gibt es, trotz der epigenetischen und antiviralen Mechanismen, Hinweise auf anhaltende Aktivitäten der HERV-K (HML-2) Familie [6, 12]. Es konnte die Bildung von viralen, aber nicht infektiösen Partikeln nachgewiesen werden [10, 12, 14]. Außerdem besitzen sie offene und intakte Leserahmen für die viralen Proteine, sodass diese exprimiert werden können [10, 12]. Jedoch codiert keine der bekannten HERV-K (HML-2) Proviren für Strukturen, die für die chromosomale Integration nötig sind [12]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass einige Individuen heutzutage Proviren tragen, die infektiöse HERV-K (HML-2) Elemente codieren können oder dass sich infektiöse Viren durch Rekombination bilden können [15].

Humane endogene Retroviren spielen auch heutzutage noch eine Rolle bei pathogenen Vorgängen. In Patienten, die unter Krebs, Autoimmunkrankheiten oder neurologischen Störungen leiden, wurde eine erhöhte HERV Aktivität nachgewiesen. HERVs können zur Aktivierung von Proto-Onkogenen beitragen oder andere Gene beeinträchtigen [2]. Denn retrovirale LTRs sind Promotoren, die in der Lage sind, die Transkription einzuleiten, wenn entsprechende Transkriptionsfaktoren vorhanden sind und deren Zugang nicht durch epigenetische Faktoren behindert ist [8]. Solche

LTR Sequenzen von humanen endogenen Retroviren können als verstärkender oder alternativer Promotor von zellulären Genen dienen, sodass eine LTR getriebene Expression von potenziellen (Proto-)Onkogenen möglich ist oder es zur Fehlsteuerung von wachstumsfördernden zellulären Genen kommt [8, 10]. HERVs selber tragen wahrscheinlich keine Onkogene, aber bestimmte Proteine von endogenen Retroviren besitzen möglicherweise onkogene Eigenschaften [8]. So kann die Expression von HERV Env oder Rec Proteinen zur Tumorgenese beitragen [8, 16]. Eine Aktivierung von humanen endogenen Retroviren wurde in verschiedenen Krebsformen nachgewiesen. Es konnten erhöhte Antikörper-Titer von HERV-K (HML-2) im Plasma von Brustkrebspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden [17-19]. Außerdem verhinderte ein Knock-down des Env Proteins von HERV-K die Proliferation, Migration und Invasion sowie Tumorbildung und Metastasierung von Brustkrebszellen [20]. Auch in Patienten mit Lymphomen konnten erhöhte Antikörper-Titer von HERV-K (HML-2) im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden [19, 21, 22]. Humane Melanomzellen weisen eine erhöhte Expression von HERV-K auf und produzieren retrovirale Partikel, die eine RT-Aktivität sowie Gag und Env Proteine aufweisen im Gegensatz zu Melanozyten und normalen Lymphknotenzellen [23-25]. Eine Down-Regulierung von HERV-K durch RNA Interferenzen verhinderte den Übergang von adhärennten zu nicht-adhärennten Zellen in menschlichen Melanomzelllinien [26]. Auch im Epithel von Eierstocktumoren ist die Expression von HERV-K Env mRNA erhöht im Vergleich zu Eierstockgewebe ohne Tumoren [27]. Zudem konnte eine erhöhte Expression von HERV in Prostatakrebszellen gezeigt werden [28-30]. Humanen endogenen Retroviren scheinen daher die Entstehung von Krebs zu fördern.

Neben Krebs scheinen HERVs eine Rolle bei der Entstehung von Entzündungsvorgängen und Autoimmunkrankheiten zu spielen. Erhöhte HERV Antikörper Titer wurden in Patienten mit Autoimmunkrankheiten wie Lupus erythematodes und Sjögren's Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt [31, 32]. Zudem wurden HERV Sequenzen im Plasma, Serum und Rückenmarksflüssigkeit von Patienten mit Multipler Sklerose, jedoch nicht in gesunden Kontrollen, nachgewiesen [33, 34].

Ein Vertreter der HERV-K (HML-2) Familie ist das HERV-K113, ein nicht-infektiöses, vollständiges Provirus mit offenen Leserahmen für alle viralen Proteine [8, 35]. Die codierenden Sequenzen für die RT und Env weisen Punktmutationen auf, wodurch die Funktion dieser Proteine gestört ist [35, 36]. Die LTR Regionen sowie die Gene,

die für die Protease und das Rec Protein codieren, sind noch immer intakt [35-37]. HERV-K113 ist eines der potenziellen aktiven Proviren im Menschen [9]. Trotzdem wurde bisher kein infektiöser und replikationsfähiger HERV-K113 Provirus im Menschen gefunden [12].

## 3.2 Virale Restriktionsfaktoren

Neben epigenetischen Kontrollmechanismen wird die Expression von Retroviren in gesunden Zellen verhindert durch virale Restriktionsfaktoren [12]. Zu den Restriktionsfaktoren von HIV gehören unter anderem das *tripartite motif* (TRIM) 5 $\alpha$ , *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide like* (APOBEC) 3 und SAMHD1 (*sterile alpha motif and histidine-aspartic domain*) [38]. TRIM5 $\alpha$  verhindert die retrovirale Replikation von HIV zwischen dem Eindringen des Virus in die Zelle und der Reversen Transkription [39]. APOBEC3 und SAMHD1 inhibieren die Reverse Transkription von HIV, wobei APOBEC3 Mutationen induziert und durch SAMHD1 die Menge an intrazellulären Desoxyribonukleosidtriphosphaten verringert wird [12, 40]. Ein weiterer Restriktionsfaktor von HIV ist das Interferon-induzierbare Protein 16 (IFI-16) [41].

Im Gegensatz zu HIV wird HERV-K (HML-2) nicht durch Trim5 $\alpha$  inhibiert [42]. APOBEC3 zeigte eine Inhibierung von HERV-K, jedoch die APOBEC3F Form und nicht APOBEC3G, das bei HIV zur stärksten Inhibierung führt [42]. Die Wirkung von SAMHD1 wurde noch nicht bei HERV-K (HML-2) getestet. Gramberg et al. zeigten eine hemmende Wirkung von SAMHD1 unter anderem auch bei  $\beta$ -Retroviren, so dass eine hemmende Wirkung auch für HERV-K (HML-2) möglich ist [43]. Da IFI-16 die Replikation von HIV inhibiert, ist es möglicherweise auch ein weiterer Restriktionsfaktor von HERV-K.

### 3.2.1 IFI-16

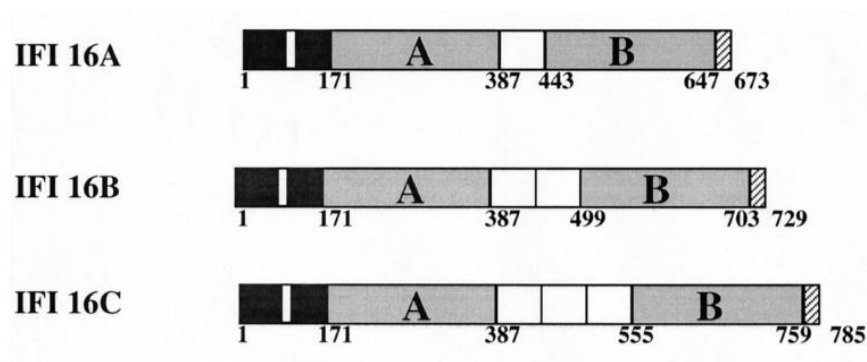
Das Interferon-induzierbare Protein 16 (IFI-16) ist ein Phosphorprotein mit einer Größe von 85-95 kDa [44]. Es gehört zu der PYHIN Proteinfamilie, zu der neben IFI-16 auch die humanen Proteine MNDA (*myeloid cell nuclear differentiation antigen*) und AIM2 (*absent in melanoma 2*) gehören [45-48]. Die Proteine dieser Familie besitzen ein charakteristisches Motiv aus 200 Aminosäuren (HIN) [49]. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, besitzt IFI-16 zwei dieser HIN Domänen (HIN A und HIN B) [47]. Diese ermöglichen die Bindung von doppelsträngiger (ds) und einzelsträngiger (ss) DNA [47, 48, 50]. Zwischen den beiden HIN Domänen befindet sich eine Serin-

Threonin-Prolin reiche Region (S/T/P) [44]. Außerdem besitzt IFI-16 eine PYRIN Domäne am N-Terminus, die eine Protein-Protein Interaktion ermöglicht und die Aktivierung des Inflammasoms sowie die Apoptose einleiten kann [48, 50, 51]. IFI-16 besitzt zudem eine zweigeteilte Kernlokalisierungssequenz (NLS) zwischen den Aminosäuren auf Position 139 und 145, die für den Eintritt und die Ansammlung im Zellkern nötig ist [52].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des IFI-16 Proteins.** Modifiziert übernommen aus Dell'Oste et al., 2015 [47].

Durch das Splicen der IFI-16 mRNA entstehen Proteine mit einer, zwei oder drei Kopien der S/T/P reichen Domäne, sodass drei Unterformen von IFI-16 mit unterschiedlichen Größen entstehen [44]. Diese sind in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Unterformen von IFI-16A, IFI-16B und IFI-16C.** [44]

Die Expression des IFI-16 Proteins wird durch Interferone angeregt [53]. Dabei spielen sowohl Typ 1 ( $\alpha$ - und  $\beta$ -) als auch Typ 2 ( $\gamma$ -) Interferone eine Rolle [44, 54]. Neben Interferonen kann die Expression von IFI-16 auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativen Stress sowie proinflammatorischen Molekülen ausgelöst werden [55, 56]. Nach der Induktion der Proteine durch Interferone translozieren diese in den Zellkern [44]. Dementsprechend ist IFI-16 vorwiegend im Zellkern einer Zelle zu finden, jedoch auch zu Teilen im Zytoplasma, denn eine Acetylierung der NLS führt zur Inhibierung des Imports in den Zellkern [48, 57, 58]. IFI-16 wird nur von bestimmten Zelltypen exprimiert. Dazu gehören hämatopoetische Zellen wie Lymphozyten und Monozyten sowie Endothel- und Epithelzellen. [44, 53, 59]

Die Expression von IFI-16 wird mit verschiedenen pathogenen Vorgängen in Verbindung gebracht. In Brustkrebszellen wurde eine verringerte Expression der IFI-16 mRNA und des IFI-16 Proteins im Vergleich zu normalen Brustzellen gezeigt [60]. Auch in Prostatakrebszellen konnte gezeigt werden, dass IFI-16 nicht mehr vorhanden oder vermehrt im Zytoplasma zu finden ist im Vergleich zu normalen Prostatazellen [61]. IFI-16 kann zudem die Entstehung von Entzündungen durch die Modulation von Endothelzellen und ihrer Funktion steigern. IFI-16 verändert die Genexpression von Endothelzellen, sodass es zu einer vermehrten Expression von Genen kommt, die bei der Entstehung von Entzündungen eine Rolle spielen. Dadurch ist die proinflammatorische Aktivität von Endothelzellen durch IFI-16 gesteigert. [53, 59] Da IFI-16 die Expression von proinflammatorischen Genen erhöht, kann IFI-16 auch eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten spielen [59]. Es konnte gezeigt werden, dass anti-IFI-16 Autoantikörper vermehrt in Patienten mit Autoimmunkrankheiten wie systemische Sklerodermie, systemischer Lupus erythematodes und Sjögren Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorkommen [56, 62, 63].

IFI-16 entfaltet diesen Einfluss auf viele pathogene Vorgänge möglicherweise durch die Regulierung von verschiedenen grundlegenden Zellfunktionen. So kann IFI-16 unter anderem den Zellzyklus, Zellproliferation und Differenzierung, z.B. von Endothelzellen, beeinflussen [44, 59]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von IFI-16 in Zellen, die eigentlich kein IFI-16 exprimieren, zu einem verlangsamten Zellwachstum und ein Knock-down von IFI-16 zu einer verlängerten Lebensdauer führt [44, 64]. IFI-16 kann diese grundlegenden Zellfunktionen möglicherweise durch den Einfluss auf die Genexpression einer Zelle beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von IFI-16 zu einer erhöhten Expression von Genen führt, die eine Rolle beim Zellwachstum, Apoptose und auch in der Immunabwehr spielen [59]. IFI-16 zeigte zudem eine transkriptionshemmende Wirkung und hat somit auch eine Funktion als Transkriptionsrepressor [44, 65]. Die Wirkung als Transkriptionsrepressor und die Induktion von Interferon- $\beta$  deutet darauf hin, dass IFI-16 bei der Immunabwehr von Bedeutung ist.

Es konnte eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems und eine virale Restriktion gegen Herpesviren und Lentiviren durch IFI-16 gezeigt werden [47]. Conrady et al. stellten dar, dass bei einer *Herpes simplex Virus Typ 1* (HSV-1) Infektion, ein Virus aus der Gruppe der  $\alpha$ -Herpesviren, die Immunantwort und die Expression von IFN- $\alpha$  durch IFI-16 induziert wird [66]. Gariano et al. belegten eine virale Restriktion

des *human Cytomegalovirus* (HCMV), ein  $\beta$ -Herpesvirus, durch IFI-16 [67]. Sie zeigten, dass IFI-16 als Immunsensor für intrazelluläre DNA dient und die virale Genexpression verhindert, sodass die Replikation des Virus verhindert wird [67]. Lo Cigno et al. berichten von einer Restriktion der viralen Transkription und Replikation des *Humanen Papillomavirus* durch IFI-16 mittels epigenetischer Regulation [68]. Des Weiteren konnte eine virale Restriktion durch IFI-16 beim *Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus* (KSHV), ein  $\gamma$ -Herpesvirus, sowie beim *Humanen Immundefizienz-Virus* (HIV) dokumentiert werden [41, 47]. IFI-16 kann Intermediate der Reversen Transkription von HIV erkennen und leitet daraufhin den pyroptotischen Zelltod von infizierten  $CD4^+$  T-Zellen ein [69]. Zudem zeigten Hotter et al., dass IFI-16 die Genexpression von HIV-1 inhibiert [41].

IFI-16 hat in vielerlei Weise Einfluss auf die Vorgänge einer Zelle und beeinflusst viele wichtige Signalwege. Außerdem spielt IFI-16 eine wichtige Rolle in der antiviralen Immunabwehr.

## 4 Zielstellung

Virale Restriktionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von exogenen und endogenen Viren. IFI-16 ist ein Restriktionsfaktor, dessen Wirkung bereits für Viren, wie Herpesviren, Lentiviren und humane Papillomaviren gezeigt werden konnte. Das Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob IFI-16 zu einer Restriktion des HERV-K113, eines humanen endogenen Retrovirus aus der HERV-K (HML-2) Familie, führt. Hierfür sollen mit Hilfe von Molekularklonen virusähnliche Partikel generiert werden, die es ermöglichen, das Virus in seiner ursprünglichen Form zu untersuchen. Als Indikator für die Virusproduktion soll die Aktivität der Reversen Transkriptase herangezogen werden. Die Zellen sollen mit den entsprechenden Molekularklonen und dem IFI-16 Protein bzw. einem Kontrollplasmid transfiziert und die Reverse Transkriptase Aktivität im Zellkulturüberstand gemessen werden. Außerdem soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welcher Bereich des viralen Genoms entscheidend für die Hemmung durch IFI-16 ist. Zudem soll analysiert werden, welche Domäne des IFI-16 Proteins für die hemmende Wirkung von Bedeutung ist. Schließlich soll untersucht werden, an welcher Stelle des viralen Replikationszyklus von HERV-K113 IFI-16 seine Wirkung entfaltet.



## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien, Ursprung und Zellkulturmedium

Zelllinie	Ursprung	Zellkulturmedium
HeLa	Gebärmutterhals	DMEM
HEK 293T	Niere	DMEM
Sk-mel 28	Melanom	DMEM
Tera-1	Teratokarzinom	DMEM

#### 5.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 2: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Anbieter
OneShot <sup>®</sup> Top10 chemically competent cells	Invitrogen

#### 5.1.3 Enzyme

Tabelle 3: Enzyme

Enzym	Anbieter
Dpn I	Agilent Technologies
Hind III	New England Biolabs
Kpn I	New England Biolabs
Mlu I	New England Biolabs
Not I	Thermo Fisher Scientific
Xba I	New England Biolabs

#### 5.1.4 Primer

Die lyophilisierten Primer wurden vor der Verwendung mit destilliertem Wasser (aq. dest.) auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt.

**Tabelle 4: Primer und ihre Sequenzen.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Anbieter</b>
CMV-143_For	GGC GTG GAT AGC GGT TTG A	Dr. Oliver Hohn, RKI
Horie2010_PERT-F	TCC TGC TCA ACT TCC TGT CGA G	IDT
Horie2010_PERT-R	CAC AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG	IDT
Luci-N-term_Rev	CCT TAT GCA GTT GCT CTC C	IDT
mutGC-box1_For	GAG ATA GGG AAA AAC CAC CTC AGG GCT GGA GG	Invitrogen
mutGC-box1_Rev	CCT CCA GCC CTG AGG TGG TTT TTC CCT ATC TC	Invitrogen
mutGC-box2_For	GGT GGG ACC TGC AGG CAG CAA TAC TGC TTT G	Invitrogen
mutGC-box2_Rev	CAA AGC AGT ATT GCT GCC TGC AGG TCC CAC C	Invitrogen
mutGC-box3_For	GTG ACC CTG ACA CAT CTC CCT CTT TGA GAA ACA CCC AC	Invitrogen
mutGC-box3_Rev	GTG GGT GTT TCT CAA AGA GGG AGA TGT GTC AGG GTC AC	Invitrogen
mutGC-box4_For	GGG AAC TCA GAG GCT GGT GGG ATC CTC CAT ATG C	Invitrogen
mutGC-box4_Rev	GCA TAT GGA GGA TCC CAC CAG CCT CTG AGT TCC C	Invitrogen
RVprimer3_Fwd	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC	IDT

### 5.1.5 Antikörper

**Tabelle 5: Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
$\alpha$ -GAPDH G9545	Sigma
$\alpha$ -HA, mouse	Bio Legend
$\alpha$ -rabbit IgG Peroxidase Antikörper	Sigma
Herma 7 (Maus $\alpha$ -HERV Gag)	Dr. Klaus Boller, PEI
IRDye <sup>®</sup> 680LT goat anti-mouse	LI-COR
IRDye <sup>®</sup> 800CW goat anti-mouse	LI-COR
VD K140 p5B ( $\alpha$ -oriHERV p27-CA Kaninchenserum)	Dr. Oliver Hohn, RKI

### 5.1.6 Konstrukte/ Plasmide

Die Konstrukte und Plasmide wurden mit folgenden Ausnahmen von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Das Plasmid HERV-K 5'LTR MutBox 1-4 wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* generiert. HERV-KconGFP und HERV-KconGPP wurden von der Arbeitsgruppe um Bieniasz vom *Aaron Diamond AIDS Research Center* und der Rockefeller Universität, New York, hergestellt (Vergleiche [42, 70]). Die Plasmide „pCG\_NL4-3 IRES BFP“ und „pCG\_IFI-16“ sowie die dazugehörigen Mutationen im IFI-16 Protein wurden von dem Institut molekulare Virologie vom Universitätsklinikum Ulm zur Verfügung gestellt (Vergleiche [41]).

**Tabelle 6: Konstrukte und Plasmide.**

<b>Konstrukt/ Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>
$\Delta$ C1	Hüllprotein von HERV-K
CMV-RU5_oriSTHERV-K113	ursprüngliche HERV-K113 Sequenz mit einem CMV Promotor anstelle der U3
DH519	Kontrollplasmid für DH591
DH591	IFI-16 Expressionsplasmid
HERV-K 5'LTR MutBox 1-4	HERV-K113 5'LTR im pGL3 basic Vektor mit 4 Mutationen in der 5'LTR-Region
HERV-KconGFP	HERV-K Molekularklon mit einem CMV Promotor, der RU5-Region aus HERV und codierende Sequenzen für Gag, Pro, Pol und Env; besitzt zusätzlich ein CMV Promotor getriebenes GFP in <i>env</i> Bereich; codiert für virale RNA
HERV-KconGPP	HERV-K Molekularklon mit einem CMV Promotor, der RU5 aus HIV; codiert für virale Proteine für die Pikelbildung
oricoGPP	HERV-K Molekularklon mit einem CMV Promotor und codierende Sequenzen für Gag, Pro und Pol
Rec	Rec Expressionsplasmid
oriHERV-K113	ursprüngliche HERV-K113 Sequenz
oriST_HERV-K113	ursprüngliche HERV-K113 Sequenz mit Rückmutationen der stillen Mutationen
pcDNA	Kontrollplasmid
pCG_IFI-16	IFI-16 Expressionsplasmid

pCG_IFI-16 del(NLS1+2)	NLS Mutante des IFI-16 Proteins ( $\Delta$ R96-100K/K128-131K)
pCG_IFI-16 PYRIN+Linker	PYRIN Domäne + Linker des IFI-16 Proteins ( $\Delta$ 191-729)
pCG_IFI-16 PYRIN mutant	PYRIN Mutante des IFI-16 Proteins (S27A, L28A, D50A)
pCG_NL4-3 IRES BFP	IRES BFP Leervektor
Sp1	Sp1 Expressionsplasmid
Staufen-1	humanes Protein; erhöht die Partikelproduktion
pGL3 basic	Kontrollplasmid
pGL3 HERV-K113 5'LTR	HERV-K113 5'LTR im pGL3 basic Vektor
pGL4.51	Luciferase-Vektor mit einem CMV Promotor
VSV-G	Hüllprotein des VSV

### 5.1.7 Puffer, Medien und Reagenzien

Tabelle 7: Medien.

Medium	Anbieter
DMEM	Robert Koch-Institut
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g Agar/l
LB-Medium	Sigma
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 8: Puffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
Laufpuffer	30,3 g/l Tris, 144,1 g/l Glycin, 10 g/l SDS auf 1 l aq. dest.
Lysis Puffer 2x	0,25 % Triton X-100, 50 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 40 % Glycerol, pH 7,4
NP-40 Puffer	50 mM Hepes, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,5 % NP40
PBS	0,01 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl in aq. dest., pH 7,2
Transferpuffer	100 ml 10x Tris-Glycin Puffer, 200 ml Methanol auf 1 l aq. dest.
Tris-Glycin Puffer, 10x	30,3 g/l Tris, 144,1 g/l Glycin, auf 1 l aq. dest.

Tabelle 9: Reagenzien und Chemikalien

Reagenz/ Chemikalie	Anbieter
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Roth
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	Thermo Fisher Scientific
Brilliant II QPCR Master Mix 2x	Agilent Technologies
Carbonatpuffer	Sigma
DMSO	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
FBS Superior S0615/0114G	Biochrome
GeneRuler™ 100 bp+ DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 1 kb+ DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Laemmli Puffer	Bio-Rad
Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific
Luciferase Assay Substrat	Promega
Milchpulver	Roth
NEB 10x Puffer 2.1, 3.1	NEB
Nonidet® P40	PanReac AppliChem
OPD	Sigma
Passive Lysis Buffer 5x	Promega
Penicillin/ Streptomycin	Biochrome AG
Phosphat-Citrat Puffer	Sigma
Phosphat-Citrat Tablette	Sigma Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences
RNaseOut™ (40 U/μl)	Invitrogen
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid 30 %)	Roth
Schwefelsäure H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma
SensiFAST™ Probe No-ROX Master Mix	Bioline
TEMED	Sigma
Tris-HCl 0,5 M	Sigma
Tris-HCl 1,5 M	Sigma

Triton-X100	Sigma Aldrich
Trypsin/ EDTA Lösung	Biochrom AG
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck

### 5.1.8 Kits

Tabelle 10: Kits

Kit	Anbieter
HS-Mg RT Acitivity Kit	Cavidi
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Quiagen
QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies

### 5.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

Material	Anbieter
6-well Zellkulturplatten	TPP
96-well PCR-Platten, clear	Agilent Technologies
96-well Platten, clear	Thermo Fisher Scientific
96-well Platten, weiß	Thermo Fisher Scientific
96-well Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific
Clip Tips	Thermo Fisher Scientific
Cryoröhrchen	Roth
Filterspitzen Art Tips	Thermo Fisher Scientific
Filterspitzen ep TIPS	Eppendorf
Multiplate <sup>®</sup> PCR Plates <sup>™</sup>	Bio-Rad
Pipettenspitzen	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Zellkulturflaschen T75 und T150	TPP
Zellschaber 24 cm	TPP
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	TPP

### 5.1.10 Geräte

Tabelle 12: Geräte

Gerät	Anbieter
CFX96 Touch™	Bio-Rad
DNA Engine® Thermal Cycler	Bio-Rad
ELISA Reader Sunrise	Tecan Group
Heizblock	Grant Instruments
Incubator Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific
LUMIstar Omega	BMG LABTECH GmbH
Magnetrührer Ikamag	IKA
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Odyssey	LI-COR
PCR Bank Nunc Aura	Sigma
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhelfer accu-jet® pro	BRAND
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific
Vortex Genie	Scientific Industries
Waage Scout Pro Ohaus	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Biofuge Primo R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Sigma 4K15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH

### 5.1.11 Software

Tabelle 13: Software

Software	Anbieter
CFX Maestro	Bio-Rad
Easy Reader (ELISA)	entwickelt von Dr. S. Norley, RKI
Geneious R11	Biomatters
NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Methoden in der Zellkultur

#### 5.2.1.1 Auftauen

Um die Zellen aufzutauen, wurden sie zunächst im Wasserbad bei 37 °C geschwenkt und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde zu den Zellen tröpfchenweise frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. Danach wurden die Zellen bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde schließlich in ein neues Kulturgefäß überführt und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 5.2.1.2 Aussäen

Das Kulturmedium der Zellen wurde zunächst entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/ EDTA Lösung inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Mit frischem Kulturmedium wurde der Gefäßboden gespült und die Zellen resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauerzähl-Kammer wurden 4 Großquadrate ausgezählt und nach Formel 1 die Konzentration der Zellen berechnet.

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählte Großquadrate}} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnung} = x \text{ Zellen/ml}$$

**Formel 1: Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer**

Um die gewünschte Konzentration an Zellen zu erhalten, wurde die Zellsuspension mit entsprechender Menge an frischem Kulturmedium verdünnt und schließlich in gewünschte Zellkulturgefäße überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 5.2.1.3 Splitten

Um die Zellen zu splitten wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/ EDTA Lösung inkubiert, um die Zellen vom Gefäßboden zu lösen. Mit frischem Kulturmedium wurde der Gefäßboden gespült und die Zellen resuspendiert. Schließlich wurde ein Zehntel der Zellsuspension mit frischem Kulturmedium aufgefüllt und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.



#### 5.2.1.4 Kultivierung

Die Zellen wurden mit dem jeweiligem erforderlichem Zellkulturmedium im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die HeLa, HEK 293T, Sk-mel-28 und Tera-1 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) verwendet. Zu dem Medium wurde 10 % fetales Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin hinzugegeben.

#### 5.2.1.5 Einfrieren

Das Kulturmedium der Zellen wurde zunächst entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/ EDTA Lösung inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Mit frischem Kulturmedium wurde der Gefäßboden gespült und die Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in FKS mit 10 % DMSO gelöst. Die Zellen in FKS wurden über Nacht in einer Isopropanol-Box bei -80 °C gelagert und schließlich in einen Stickstofftank überführt.

#### 5.2.1.6 Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von exogener Nukleinsäure in eukaryotische Zellen. Für die Transfektionen wurde Polyethylenimin (PEI), ein kationisches Polymer, verwendet. Dieses fügt die exogenen Nukleinsäuren zu positiv geladenen Partikel zusammen, welche an die Zelloberfläche binden können und mittels Endozytose von den Zellen aufgenommen werden [71].

Vor der Transfektion wurde die Erscheinung der Zellen sowie deren Konfluenz unter dem Mikroskop betrachtet. Für die Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % aufweisen. Anschließend wurde je nach Transfektionsschema Zellkulturmedium ohne FBS und Antibiotika vorgelegt. Die entsprechenden Plasmide wurden hinzugeben und mittels Vortexer gut vermischt. Nach der Zugabe von PEI in einem Verhältnis von 3:1 zur gesamten Menge eingesetzter DNA wurde erneut gut durchmischt und anschließend der Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das verbrauchte Zellkulturmedium der Zellen entfernt und neues Medium hinzugegeben. Schließlich wurde der inkubierte Ansatz tröpfchenweise zu den Zellen dazugegeben und diese im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Nach 24 oder 48 Stunden wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Wenn ein fluoreszierendes Protein im Ansatz mit eingesetzt wurde, wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Mikroskops dokumentiert.

### 5.2.1.7 Präparation der Zellüberstände

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellüberstände in Reaktionsgefäße überführt und bei 1.300 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt und bei 15.000 g und 4 °C für 3-4 Stunden zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgegossen wurde, wurde das Pellet in PBS gelöst und in neue Reaktionsgefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die konzentrierten Zellüberstände bei -80 °C gelagert.

### 5.2.1.8 Präparation der Zellysate

Zunächst wurde das Kulturmedium der Zellen entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Für die Zellyse wurde eine Tablette cOMplete™ Protease Inhibitor in 25 ml NP40 Puffer gelöst und zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Gefäßboden geschabt, mit einer Pipette resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellysate 10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 15.000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 5.2.2 DNA-Analytik

### 5.2.2.1 Transformation

Transformation bezeichnet das Einbringen von exogener Nukleinsäure in Bakterienzellen. Für die Transformation wurden OneShot® Top10 chemically competent cells verwendet. Diese wurden mit 1-5 µl des gewünschten Plasmids versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 45 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Durch den Hitzeschock kann die exogene Nukleinsäure von den Bakterienzellen aufgenommen werden. Die Bakterien wurden im nächsten Schritt für 2 Minuten erneut auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Aufarbeitung der Plasmide wie im Abschnitt 5.2.2.2 beschrieben.

### 5.2.2.2 Plasmidpräparation

Zu den transformierten Bakterienzellen wurde zunächst SOC Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Bakterienzellen eine Stunde bei 37 °C und einer Rotation von 300 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension auf eine Agarplatte mit Antibiotikum, welches der Resistenz des Plasmids entspricht, ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Starterkultur

wurde eine einzelne Kolonie von der Agarplatte in LB-Medium mit Antibiotikum überführt und für zwei Stunden bei 37 °C und einer Rotation von 170 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Starterkultur in 250 ml LB-medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und einer Rotation von 170 rpm inkubiert. Um einen Glycerolstock anzufertigen wurde 500 µl Glycerol mit 500 µl Bakteriensuspension vermischt und anschließend bei -80 °C gelagert. Mit Hilfe des Kits QUIAGEN Plasmid Maxi Kit der Firma Quiagen wurde aus der Bakteriensuspension das Plasmid isoliert und gereinigt.

#### 5.2.2.3 DNA-Konzentration

Mit Hilfe des Nanodrops wurde nach der Plasmidpräparation die Konzentration der präparierten Plasmid-DNA bestimmt. Der Nanodrop misst die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und berechnet daraus die Konzentration der DNA bzw. RNA. Zur Bestimmung der Reinheit der Probe dienen die Quotienten 260/280 nm und 260/230 nm. Ersteres sollte für DNA bei ca. 1,8 und für RNA bei ca. 2,0 liegen. Ein geringerer Quotient deutet auf die Anwesenheit von Proteinen, Phenol oder anderen Kontaminanten hin. Der zweite Quotient aus 260 und 230 nm sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen und zeigt ebenfalls die Reinheit der Probe an.

#### 5.2.2.4 Gel-Elektrophorese

Für einen Testverdau mit anschließender Elektrophorese wurden die Proben zunächst mit geeigneten Enzymen verdaut. Hierfür wurde ca. 0,5-1 µg Plasmid mit 2 µl geeignetem Puffer sowie jeweils 0,5 µl der geeigneten Enzyme mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und anschließend bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Währenddessen wurde der Gelgießstand vorbereitet und die Kämme eingelegt. Je nach Prozentsatz des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in 1xTAE gelöst und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Zu der gelösten Agarose wurde 4 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das noch heiße Gemisch in den Gelgießstand gegossen. Nach ca. 30 Minuten wurden die Kämme entfernt. Die Proben wurden mit jeweils 2 µl Ladepuffer versetzt. Anschließend wurde das Gel mit den Markern und den Proben beladen. Es wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt und nach verschiedenen Zeitpunkten die Elektrophorese dokumentiert.

#### 5.2.2.5 Mutagenese

In die 5'LTR von HERV-K113 sollten vier spezifische Mutationen eingeführt werden. Dafür wurde das *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* von Agilent

Technologies verwendet. Der Reaktionsansatz für die PCR wurde wie in Tabelle 14 gezeigt angesetzt.

**Tabelle 14: PCR-Reaktionsansatz für die Mutagenese.**

Reagenz	Menge
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
DNA Template	100 ng
je Primer*	50 ng
dNTP Mix	1 µl
QuickChange Multi enzyme blend	1 µl
H <sub>2</sub> O	bis 25 µl auffüllen

\* in diesem Versuch wurden vier Primer, einer für jede gewünschte GC-Box der 5'LTR von HERV-K113, verwendet

Laut der Angaben des Herstellers sollten die Primer zwischen 25 bis 45 Basen lang sein und eine Schmelztemperatur von  $\geq 75$  °C aufweisen. Außerdem sollte die gewünschte Mutation in der Mitte der Primersequenz liegen. Die Primer sollten einen GC-Gehalt von 40 % aufweisen und mit einem oder mehreren C oder G Basen am 3'-Ende enden. Die verwendeten Primer erfüllten diese Bedingungen.

Die Reaktionsansätze wurden wie folgt beschrieben in einem Cycler inkubiert.

**Tabelle 15: Cycler-Bedingungen Mutagenese-PCR.**

Temperatur	Zeit	
95 °C	1 min	
95 °C	1 min	} 30 x
55 °C	1 min	
65 °C	12 min	
4 °C	hold	

Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit jeweils 1 µl Dpn I (10 U/µl) bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, um methylierte DNA mit dem Restriktionsenzym zu verdauen. Die generierten Proben wurden schließlich in *OneShot<sup>®</sup> Top10 chemically competent cells* transformiert und die Plasmid-DNA anschließend mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* präpariert. Schließlich wurde ein Restriktionsverdau und eine Se-

quenzierung nach Sanger angeschlossen, um zu überprüfen, ob die Mutagenese wie gewünscht stattgefunden hat.

### 5.2.2.6 Sequenzierung nach Sanger

Für die Sequenzierung von Proben wurde die Methode nach Sanger [72] angewendet. Dabei handelt es sich um die Didesoxymethode oder auch Kettenabbruchmethode. Zunächst wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt anschließend sequenziert und ausgewertet. Der Ansatz für die PCR wurde, wie in Tabelle 16 gezeigt, angesetzt.

**Tabelle 16: PCR Reaktionsansatz für die Sequenzierung**

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	150-300 ng
Primer (10 pmol/μl)	0,5 μl
BigDye 3.1	0,5 μl
5xPuffer	2 μl
H <sub>2</sub> O	bis 10 μl auffüllen

Anschließend wurden die Reaktionsansätze wie folgt beschrieben in einem Cycler inkubiert.

**Tabelle 17: Cycler-Bedingungen Sequenzierungs-PCR**

Temperatur	Zeit	
96 °C	1 min	
96 °C	10 sec	} 25 x
45-60 °C*	5 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	hold	

\* je nach Primer-Annealingtemperatur

Anschließend wurden die Proben im Sequenzierlabor des RKI analysiert. Die bereitgestellten Ergebnisse wurden schließlich mit dem Programm „Geneious“ ausgewertet.

## 5.2.3 Protein-Analytik

### 5.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Das Trenngel und das Sammelgel wurden, wie in Tabelle 18 beschrieben, angesetzt.

**Tabelle 18: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.**

<b>Chemikalie</b>	<b>Trenngel 12 %</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>
Aq. dest.	5,3 ml	5,7 ml
Acrylamid	6,4 ml	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl	4 ml	-
0,5 M Tris-HCl	-	2,5 ml
10 % SDS	160 µl	100 µl
10 % APS	160 µl	50 µl
TEMED	16 µl	10 µl

Die Proben wurden mit dem 6x Laemmli Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 98°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben und der Marker auf das Gel aufgetragen. Für die Auftrennung der Proben im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 Volt für ca. 20 Minuten angelegt. Für die Trennung der Proben im Trenngel wurde die Spannung auf 170 V erhöht.

### 5.2.3.2 Western Blot

Der Western Blot dient der Detektion von Proteinen in den zu untersuchenden Proben. Die Proteine werden mittels SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF-) Membran übertragen. Die Proteine werden schließlich mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht.

Nach der Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE wurde das Gel zunächst für 20 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer auf die PVDF-Membran erfolgte nach dem Semi-Dry Blot Verfahren. In der Transferkammer wurden das Gel und die Membran zwischen zwei dicke Filterpapiere, die vorher mit Transferpuffer getränkt wurden, gelegt. Der Transfer erfolgte bei 20 V für 60 Minuten. Danach wurde die Membran mit PBS-T gewaschen und für 60 Minuten unter Schütteln in Milchpulver zur Blockierung inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in Milchpulver verdünnt. Die

Membran wurde schließlich über Nacht bei 4°C und unter Schütteln mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Membran in PBS mit 0,001 % Tween für jeweils 5 Minuten wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in Milchpulver verdünnt wurde, für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut fünf Mal für jeweils 5 Minuten in PBS mit 0,001 % Tween gewaschen. Die Detektion der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurde mit dem *Odyssey® Sa Infrared Imaging System* durchgeführt.

### 5.2.3.3 Luciferase-Aktivität

Mit Hilfe des Luciferase Reporter Assays können die Genexpression und andere zelluläre Vorgänge, die mit der Genexpression zusammenhängen, quantifiziert werden. Dafür werden Reporterkonstrukte genutzt, die nach dem Promotor ein Firefly Luciferase Gen besitzen.

Die Zellen wurden zunächst in einer 96-well Kulturplatte mit einer Dichte von  $1,8 \cdot 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Etwa 24 Stunden später wurden Viruspartikel mit Hilfe der PEI Transfektion gewonnen. 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach der Transfektion wurden Zelllysate generiert. Dafür wurde das Kulturmedium der Zellen entfernt und 25 µl 1:5 verdünnter Passive Lysis Puffer zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde 22,5 µl der Zelllysate in eine weiße 96-well Platte überführt. Bei Bedarf wurden die Zelllysate bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Für die Messung der Luciferase Aktivität wurden die Zelllysate mittels Luminometer gemessen. Der Luminometer injiziert automatisch 50 µl Luciferase Assay Substrat in jedes Well und misst anschließend die Lichtemission. Die Firefly Luciferase katalysiert die Oxidation des Substrats Luciferin [73]. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, dessen Menge proportional zur Menge an produzierter Firefly Luciferase ist [73].

### 5.2.3.4 p27 ELISA

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörper-Reaktionen. In dieser Arbeit wurde der ELISA zum Nachweis von HERV-Viruspartikeln, dem Capsidprotein p27, verwendet [74]. Hierfür wurden zunächst für den ELISA geeignete 96-well Platten mit dem *Human endogenous retrovirus monoclonal antibody* (HERMA 7) beschichtet. Der Herma 7 Antikörper wurde dafür 1:50 mit Carbonatpuffer verdünnt und 50 µl der Verdünnung pro

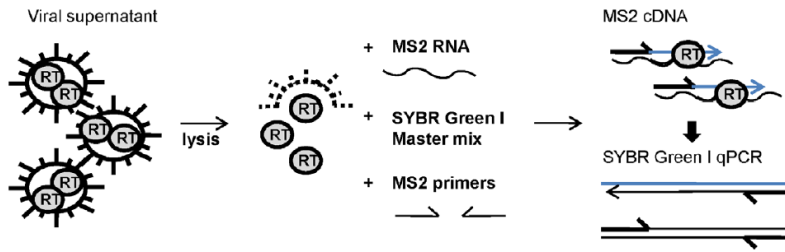
Well in die 96-well Platte pipettiert. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Zum Waschen der Platten wurde eine Waschlösung aus aq. dest. mit 10 % PBS und 0,05 % Tween hergestellt. Mit dieser wurden die Platten dreimal gewaschen. Für die Blockierung wurde 2 % Milchpulver in PBS gelöst und davon 200 µl in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit dem Blockierungspuffer für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die zu testenden konzentrierten Virusüberstände wurden mit 0,2 % Tween inaktiviert. Tween ist eine nicht-ionische Substanz, die die Hüllen von Viren auflöst und somit zur Inaktivierung der Viren führt [75]. Pro Well wurde 50 µl PBS mit 2 % Milchpulver und 0,05 % Tween vorgelegt. Die inaktivierten Virusüberstände und der p27 Capsid Standard mit einer Konzentration von 100 ng/ml wurden titriert. Anschließend wurde die 96-well Platte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die 96-well Platte dreimal mit der Waschlösung gewaschen. Von dem 1:400 verdünnten Primärantikörper (VD K140 p5B) wurde 50 µl in jedes Well der 96-well Platte pipettiert. Anschließend wurde die 96-well Platte erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dreimal mit der Waschlösung gewaschen. Die 96-well Platte wurde nun mit dem Sekundärantikörper ( $\alpha$ -rabbit IgG Peroxidase Antikörper), der vorher 1:2500 verdünnt wurde, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut dreimal mit der Waschlösung gewaschen. Schließlich wurde eine Substratlösung aus 12,5 ml Phosphat-Citrat Puffer, 5 mg o-Phenylenediamin Dihydrochlorid (OPD) und 12 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hergestellt. Davon wurde 50 µl in jedes Well der 96-well Platte pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Färbung intensiv genug war. Die Reaktion wurde mit 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung abgestoppt. Die Färbung wurde mit Hilfe des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

### 5.2.3.5 Bestimmung der RT-Aktivität

#### PERT

Mit dem *qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assay* kann die Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) in Zellkulturüberständen gemessen werden. Wie in Abbildung 8 zu sehen wird der virale Überstand zunächst lysiert. Anschließend werden unter anderem eine exogene RNA als Template, hier MS2 RNA von Bakteriophagen sowie Primer für die Amplifizierung der MS2 cDNA hinzugegeben. Die RT-Aktivität entspricht der Menge an umgewandelter RNA in cDNA durch die retrovirale RT [76].





**Abbildung 8: Schema PERT Assay [76].**

Zunächst wurde der RNaseOut™ (40 U/μl) Inhibitor 1:50 mit 2x Lysispuffer verdünnt. Davon wurden 5 μl in jedes Well einer 96-well PCR Platte vorgelegt und 5 μl der Proben bzw. des Standards hinzugegeben. Die Platte wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Reaktion mit 90 μl aq. dest. pro Well abgestoppt. Der Mastermix wurde wie in Tabelle 19 beschrieben vorbereitet. Davon wurde 11 μl pro Well in eine neue, gekühlte PCR Platte vorgelegt.

**Tabelle 19: Mastermix Pipettierschema für den PERT Assay.** Der Ansatz ist für eine Reaktion.

Reagenz	Konzentration	Volumen [μl]
Brilliant II bzw. Bioline qPCR MM		8
Reference Dye (2 μM) ROX	2μM	0,3
Rnase Out, 1:10 verdünnt	4U/μl	0,1
Horie2010_PERT-F	10μM	1
Horie2010_PERT-R	10μM	1
MS2-PERT_Horie.Probe (FAM)	10μM	0,5
MS2 RNA Template		0,1

Zu dem Mastermix wurde 9 μl lysierter Virus dazugeben und die Platte schließlich in dem Cycler CFX96 Touch™ unter folgenden Bedingungen inkubiert.

**Tabelle 20: Cycler-Bedingungen PERT Assay.**

Temperatur	Zeit	
42 °C	20 min	} 45 x
95 °C	10 min	
95 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	15 sec	

In dem ersten Schritt bei 42 °C für 20 Minuten findet die RT Reaktion statt. Anschließend folgen 45 Zyklen, in denen zunächst bei 95 °C die DNA-Polymerase aktiviert und der DNA Strang denaturiert wird. Anschließend kommt es bei 60 °C zur Anlagerung der Primer und bei 72 °C zur Elongation der DNA-Stränge [76]. Die Bestimmung der Proben erfolgte in doppelter Ausführung und zur Quantifizierung diente der HIV-1 RT Standard aus dem Cavid Kit. Die Auswertung erfolgte mit der CFX Maestro Software.

### **Cavidi**

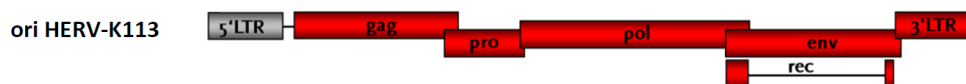
Der HS-Mg RT Activity Kit (Cavidi AB, Schweden) ist ein sensitiver Assay für die Quantifizierung der RT-Aktivität von Retroviren. Dabei ist ein RNA Template an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden. Es wird ein Reaktionsmix aus Primer, 5-bromodeoxyuridin 5'-triphosphat (BrdUTP) als Nukleotide und den Proben hinzugegeben. Die RT synthetisiert einen DNA-Strang, an den die alkalische Phosphatase (AP), die ihrerseits einen  $\alpha$ -BrdU Antikörper an sich gebunden hat, bindet. Nach Zugabe eines AP Substrats wird das Produkt photometrisch quantifiziert. Die Aktivität der AP ist dabei proportional zur Aktivität der RT und kann mittels HIV-1 RT Standard quantifiziert werden [77]. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Protokoll B). Untersucht wurden Zellkulturüberstände nach der Transfektion und der damit verbundenen Bildung von virusähnlichen Partikeln. Von den Proben wurden jeweils zwei Replikate vermessen. Die photometrische Messung erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten bei einer Wellenlänge von 405 nm.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 IFI-16 führt zur Restriktion von HERV-K113

#### IFI-16 reduziert die Virusproduktion von transfizierten HERV-K113 Moleklarklonen

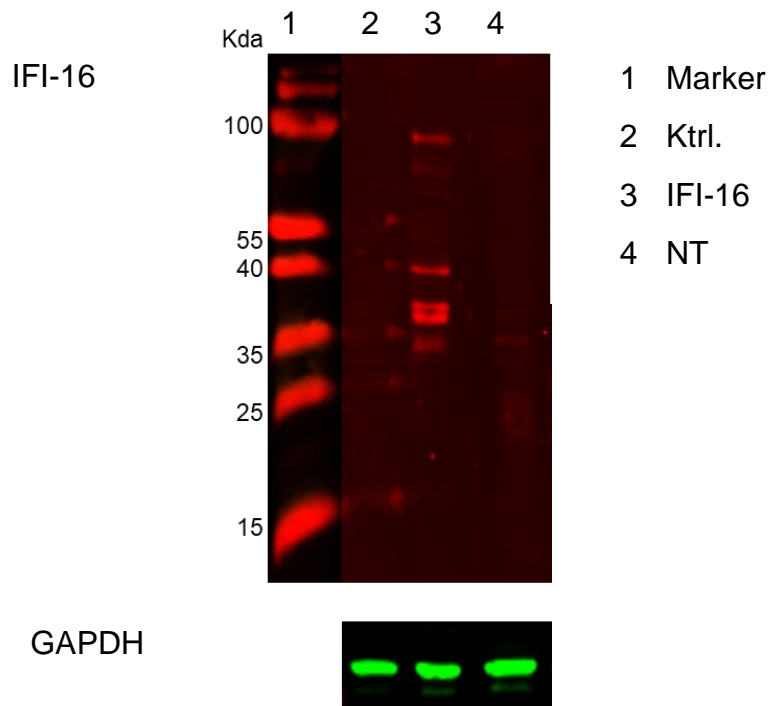
Um zu untersuchen, ob IFI-16 zur Restriktion von HERV-K113 führt, wurden die HERV-K113 Moleklarklone ori- und oriST\_HERV-K1113 untersucht. OriHERV-K113 und oriST\_HERV-K113 wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe rekonstituiert. Dafür wurden die postinsertionalen Mutationen ausfindig gemacht und revertiert [78]. Bei oriST\_HERV-K113 wurden zusätzlich stille Mutationen, die keine Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese haben, zurück mutiert. OriHERV-K113 und oriST\_HERV-K113 enthalten die genetische Information für Gag, Pro, Pol und Env bzw. Rec. Die codierenden Sequenzen sind an beiden Seiten von LTR-Strukturen flankiert (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung von oriHERV-K113.** Modifiziert übernommen aus der Dissertation von Veronika Lausch. [78]

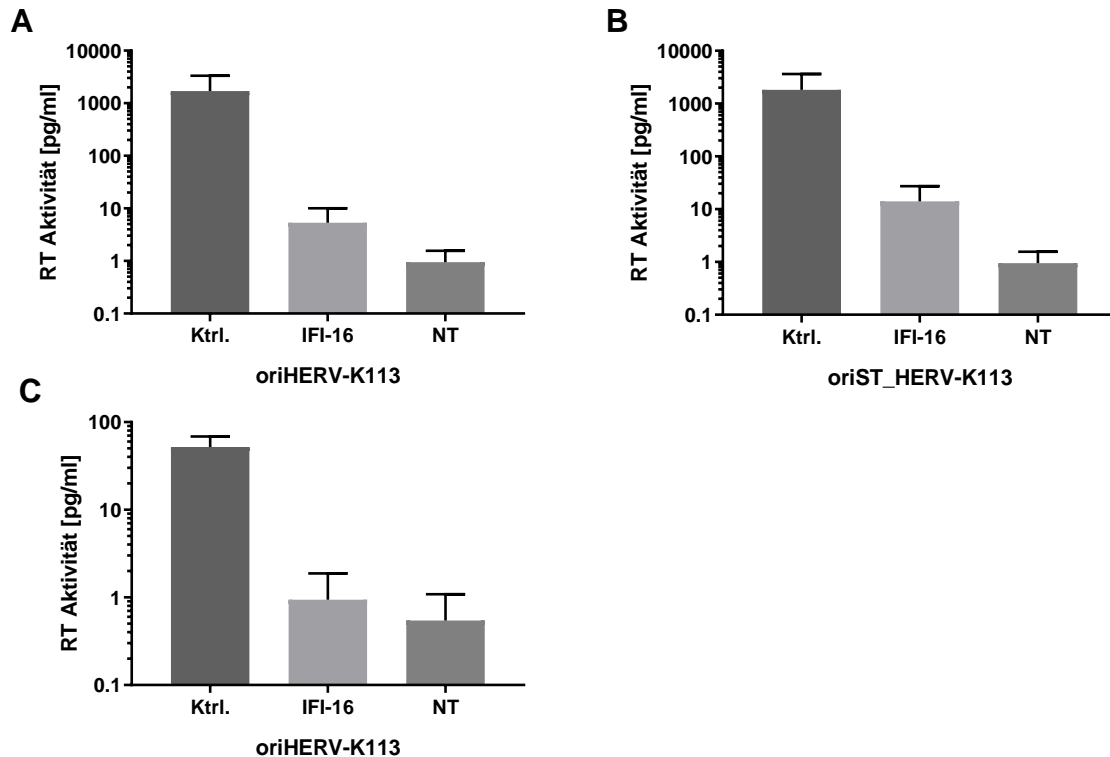
Für eine höhere virale Partikelproduktion wurde Staufen-1 cotransfiziert. Staufen-1 ist ein humanes Protein und ein Bindungspartner des Rec und Gag Proteins von HERV-K [74, 79]. Die Interaktion von Rec und Gag Proteine mit Staufen-1 führt zu einer Erhöhung der Partikelproduktion [79]. In der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Cotransfektion von Staufen-1 die Partikelproduktion von HERV-K113 erhöht, aber die Wirkung durch IFI-16 nicht beeinflusst.

Um die Expression des IFI-16 Proteins nach der Transfektion zu untersuchen, wurde zunächst ein Western Blot der Zelllysate von den transfizierten 293T Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, sind in der Probe, die mit IFI-16 cotransfiziert wurde, Banden zu erkennen. Die Probe, die mit einem Kontrollplasmid anstelle von IFI-16 sowie die nicht transfizierten Proben weisen keine Banden auf. Die Cotransfektion von IFI-16 führte daher zu einer erfolgreichen Expression des Proteins.



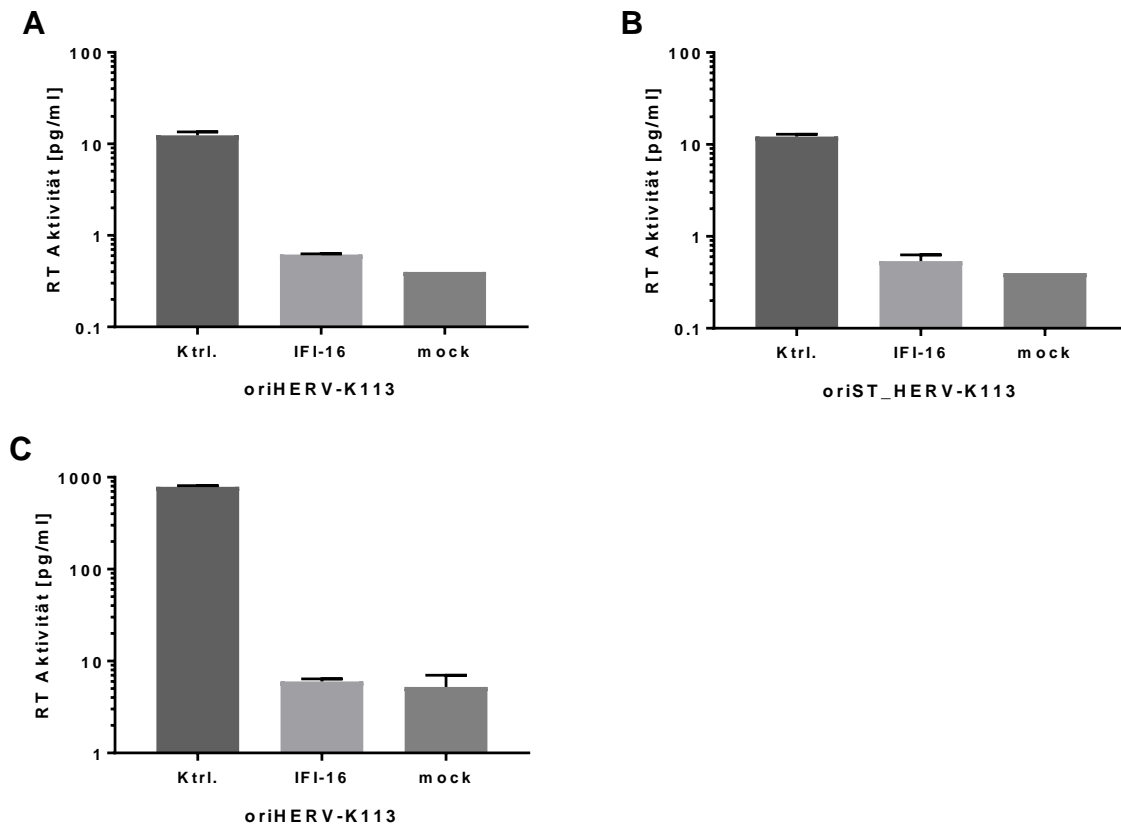
**Abbildung 10: Western Blot von IFI-16 in den Zelllysaten von 293T Zellen nach der Transfektion mit oriHERV-K113.** Primärer Antikörper:  $\alpha$ -HA 1:100 (oben) bzw.  $\alpha$ -GAPDH (unten). Sekundärer Antikörper: Anti-Mouse 1:3000. 1 Marker, 2 oriHERV-K113 + Ktrl., 3 oriHERV-K113 + IFI-16, 4 NT.

Für die Messung der RT-Aktivität wurde der Zellkulturüberstand nach der Transfektion der Moleklarklone ori- und oriST\_HERV-K113 sowie IFI-16 bzw. ein Kontrollpalsmid mittels PERT Assay gemessen. Wie in Abbildung 11 A und B zu sehen ist, führt die Cotransfektion von IFI-16 zu einer etwa 300-fachen bzw. 130-fachen Reduzierung der viralen Partikelproduktion im konzentrierten Zellkulturüberstand von 293T Zellen, die mit oriHERV-K113 bzw. oriST\_HERV-K113-Moleklarklonen transfiziert wurden. Im Überstand von 293T Zellen transfiziert mit oriHERV-K113 konnte außerdem eine 55-fache Reduzierung der viralen Partikelproduktion im Cavid-Assay gemessen werden (Abbildung 11 C). IFI-16 scheint daher die Partikelproduktion von HERV-K113 zu hemmen.



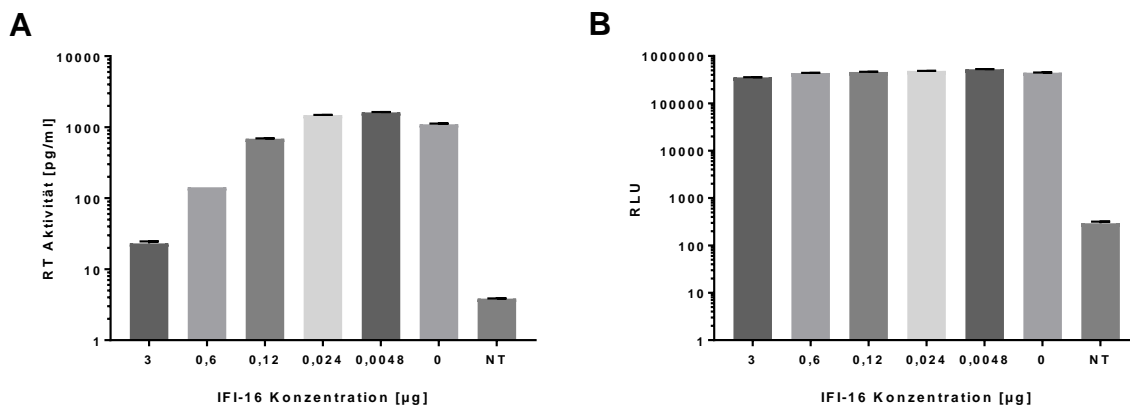
**Abbildung 11: IFI-16 reduziert die virale Partikelproduktion von oriHERV-K113 und oriST\_HERV-K113 in 293T Zellen.** Die RT-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen gemessen. Für eine höhere Partikelproduktion wurde Staufen-1 cotransfiziert. NT = nicht transfiziert. (A) Die RT-Aktivität wurde mittels PERT in 20-fach konzentrierten Überstand gemessen. (B) Die RT-Aktivität wurde mittels PERT in 20-fach konzentrierten Überstand gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. (C) Die RT-Aktivität wurde mit Hilfe des Cavid-Kits im Überstand gemessen. Die Messung erfolgte nach 120 Minuten Inkubation mit dem Substrat. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob der Effekt von IFI-16 Zelllinien abhängig ist, wurden weitere Zelllinien analysiert. Es wurden sowohl HeLa als auch Sk-mel-28 Zellen mit den ori- und oriST\_HERV-K113 Moleklarklonen sowie IFI-16 bzw. einem Kontrollplasmid transfiziert. Anschließend wurde die RT-Aktivität in den konzentrierten Zellkulturüberständen gemessen. In HeLa Zellen führte eine Cotransfektion von ori- oder oriST\_HERV-K113 Moleklarklonen mit IFI-16 zu einer 20-fachen Verringerung der Partikelproduktion im Vergleich zu Proben, die mit einem Kontrollplasmid anstelle von IFI-16 transfiziert wurden (Abbildung 12 A und B). Abbildung 12 C zeigt eine etwa 130-fache Reduzierung der Partikelproduktion von oriHERV-K113 im Zellkulturüberstand von Sk-mel-28 Zellen durch IFI-16.



**Abbildung 12: IFI-16 reduziert die virale Partikelproduktion von oriHERV-K113 und oriST\_HERV-K113 in HeLa und Sk-mel-28 Zellen.** Die RT-Aktivität wurde in den 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen mittels PERT gemessen. Für eine höhere Partikelproduktion wurde Stau fen-1 cotransfiziert. NT = nicht transfiziert. (A) und (B) Die RT-Aktivität wurde im Zellkulturüberstand von transfizierten HeLa Zellen gemessen. (C) Die RT-Aktivität wurde im Zellkulturüberstand von transfizierten Sk-mel-28 Zellen gemessen.

Nachfolgend wurden absteigende Konzentrationen von IFI-16 eingesetzt, um zu ermitteln, ob die Restriktion von HERV-K113 durch IFI-16 konzentrationsabhängig ist. Die Expression des oriHERV-K113 Molekularklons mit IFI-16 in absteigender Konzentration führte zu einem Anstieg der viralen Partikelproduktion in Zellkulturüberständen von 293T Zellen bis zu einer Konzentration von 0,12 µg IFI-16 (Abbildung 13 A). Wurde 0,024 µg oder 0,048 µg IFI-16 eingesetzt ist keine Hemmung im Vergleich zu 0 µg IFI-16 zu sehen (Abbildung 13 A). Die Luciferase-Aktivität zeigte keine Unterschiede in den entsprechenden Zelllysaten (Abbildung 13 B). Eine höhere Konzentration von IFI-16 führt demnach zu einer stärkeren Hemmung des HERV-K113 Molekularklons.

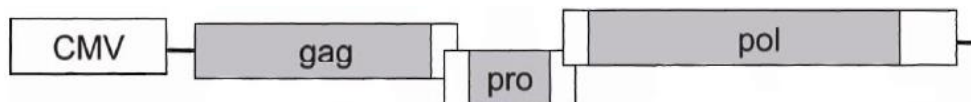


**Abbildung 13: Absteigende Konzentration von IFI-16 führt zum Anstieg der viralen Partikelproduktion von oriHERV-K113 in Zellkulturüberständen von 293T Zellen.** Für eine höhere Partikelproduktion wurde Staufen-1 und zur Viabilitätskontrolle der Zellen der Luciferase-Vektor pGL4.51 cotransfiziert. NT = nicht transfiziert. (A) Die RT-Aktivität wurde in den 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen mittels PERT gemessen. (B) Die Luciferase-Aktivität wurde in den Zellysaten gemessen.

### IFI-16 reduziert nicht die virale Partikelproduktion von HERV-K Molekularklonen mit einem CMV Promotor anstelle der 5'LTR

Für die Überprüfung, ob die LTR Region von HERV-K entscheidend für die Hemmung durch IFI-16 ist, wurden weitere HERV-K Molekularklone untersucht, bei denen die 5'LTR ausgetauscht wurde. Im Gegensatz zu ori- und oriST\_HERV-K113 besitzt oricoGPP einen CMV Promotor anstelle der 5'LTR. Außerdem besitzt oricoGPP die codierenden Sequenzen für Gag, Pro und Pol (Abbildung

14). Bei der original codon-optimierten Variante des HERV-K Molekularklons (oricoGPP) ist die Expression der Proteine erhöht, jedoch können sich lediglich leere Viruspartikel bilden. HERV-KconGFP besitzt ebenfalls einen CMV Promotor, aber im Gegensatz zu oricoGPP zusätzlich den RU5-Bereich der HERV 5'LTR. HERV-KconGFP besitzt neben den codierenden Sequenzen für Gag, Pro, Pol und Env zusätzlich ein CMV Promotor getriebenes GFP in *env* Bereich und codiert außerdem für die virale RNA (Abbildung 15).



**Abbildung**

**14: Schematische Darstellung von oricoGPP.** Modifiziert übernommen aus George et al., 2011. [37]

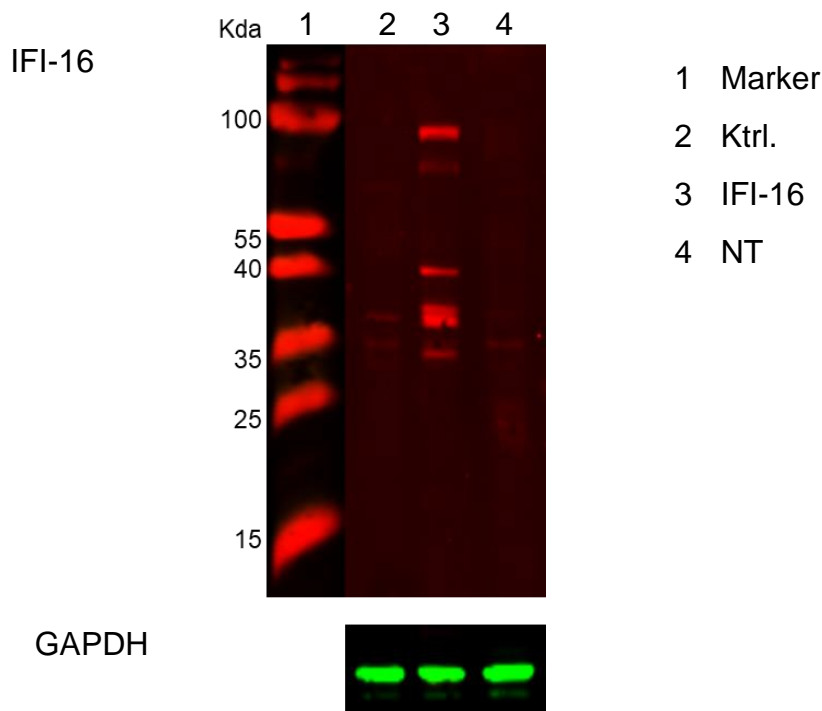


**Abbildung 15: Schematische Darstellung von HERV-KconGFP.** Modifiziert übernommen aus Lee et al., 2007. [42]

Für die Bildung von kompletten viralen Partikeln wurden oricoGPP und HERV-KconGFP cotransfiziert, sodass sowohl die viralen Proteine (oricoGPP) und die virale RNA (HERV-KconGFP) vorhanden sind. Außerdem wurden VSV-G und Rec cotransfiziert. VSV-G bezeichnet das Hüllprotein (G-Protein) des *Vesicular stomatitis Virus*, welches die Adsorption des Viruspartikels an zelluläre Rezeptoren und die Membranfusion vermittelt [1]. Rec ist ein virales Regulatorprotein von HERVs [1, 16, 80]. Rev ist ein posttranskriptioneller Transaktivator, der den Export von mRNA aus dem Zellkern fördert [1, 16]. VSV-G und Rec wurden mit den HERV-K Moleklarklonen cotransfiziert, um vollständige virale Partikel zu generieren.

Zum Nachweis der Expression des IFI-16 Proteins nach der Transfektion wurde zunächst ein Western Blot der Zelllysate von den transfizierten 293T Zellen durchgeführt. Abbildung 16 zeigt, dass die mit IFI-16 cotransfizierten Proben Banden aufweisen. Im Gegensatz dazu sind bei den Proben, die mit einem Kontrollplasmid anstelle von IFI-16 transfiziert wurden sowie die nicht transfizierten Proben keine Banden sichtbar. Die Cotransfektion von IFI-16 führte zu einer erfolgreichen Expression des Proteins.



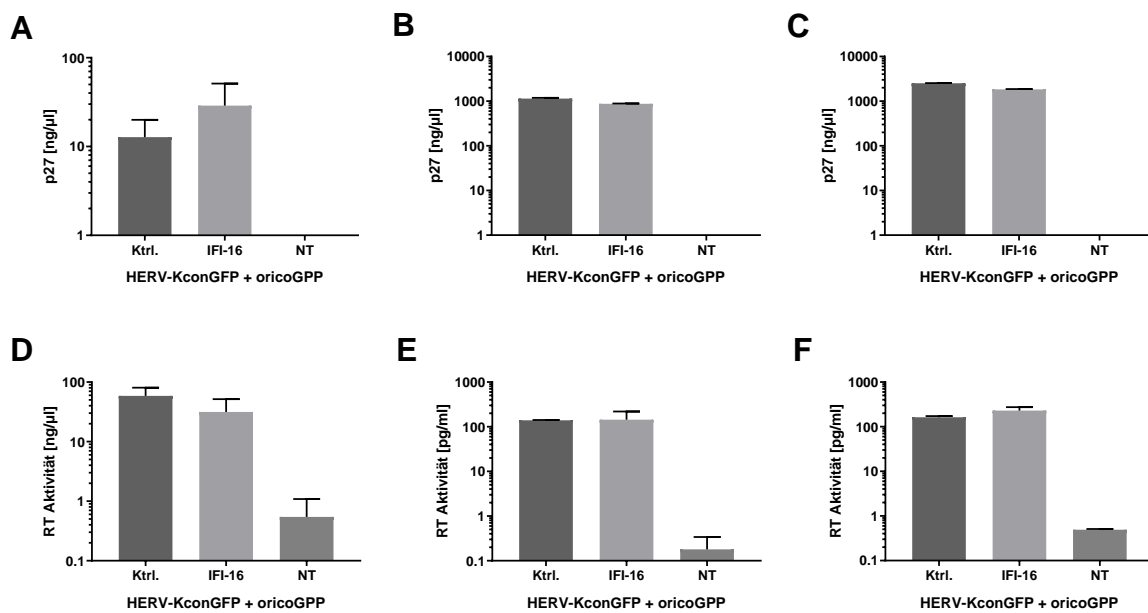


**Abbildung 16: Western Blot von IFI-16 in den Zellysaten von 293T Zellen nach der Cotransfektion von oricoGPP und HERV-KconGFP.** VSV-G und Rec wurden cotransfiziert. Primärer Antikörper:  $\alpha$ -HA 1:100 (oben) bzw.  $\alpha$ -GAPDH (unten). Sekundärer Antikörper: Anti-Mouse 1:3000. 1 Marker, 2 oricoGPP und HERV-KconGFP + Ktrl., 3 oricoGPP und HERV-KconGFP + IFI-16, 4 NT.

Für die Bestimmung der viralen Partikelproduktion wurde die RT-Aktivität mittels PERT gemessen. Um zu überprüfen, ob die Restriktion durch IFI-16 unabhängig von der Reversen Transkription verläuft, wurde außerdem die p27 Capsidproteinkonzentration mittels p27 ELISA gemessen. Außerdem sollte ein möglicher Einfluss von VSV-G und Rec auf die Wirkung von IFI-16 ausgeschlossen werden. Dafür wurden die Ergebnisse von Proben, bei denen VSV-G und Rec cotransfiziert wurden, mit der Transfektion von Kontrollplasmiden verglichen.

Die Cotransfektion von HERV-KconGFP und oricoGPP mit IFI-16 führte weder zu einer Veränderung in der Expression des p27 Capsidproteins (Abbildung 17 A-C) noch zu einer Veränderung der viralen Partikelproduktion (Abbildung 17 D-F). Dabei spielte es hinsichtlich der Wirkung von IFI-16 keine Rolle, ob VSV-G und Rec cotransfiziert wurden (vergleiche Abbildung 17 A und B) oder die Expression im Zellkulturüberstand oder in den Zellysaten gemessen wurde (vergleiche Abbildung 17 B und C). Es zeigten sich zudem keine Unterschiede in der viralen Partikelproduktion, wenn diese im Cavid- oder im PERT-Assay gemessen wurde (vergleiche Abbildung 17 D und E) und wenn VSV-G und Rec cotransfiziert wurden (vergleiche Abbildung

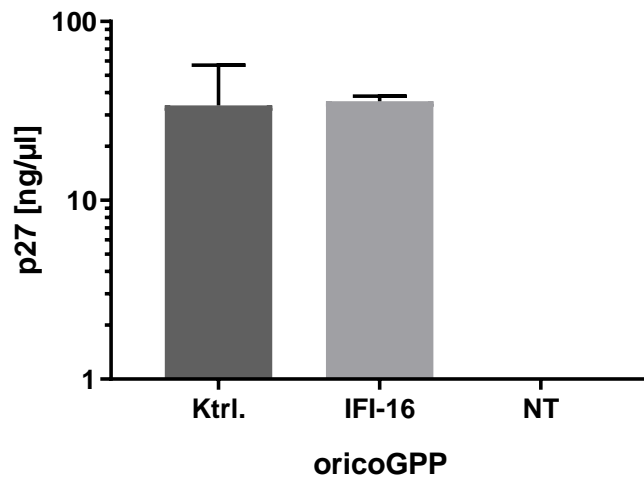
17 E und F). Die Ergebnisse zeigen, dass IFI-16 keine hemmende Wirkung mehr bewirkt, wenn die 5'LTR Region mit einem CMV Promotor ausgetauscht wurde.



**Abbildung 17: IFI-16 reduziert nicht die Partikelproduktion von HERV-KconGFP und oricoGPP.**

NT = nicht transfiziert. (A) Die p27 Capsidprotein Konzentration wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen von 293T Zellen mittels p27 ELISA gemessen. VSV-G und Rec wurden cotransfiziert. In den nicht transfizierten Proben konnte kein Signal detektiert werden. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Experimenten. (B) Die p27 Capsidprotein Konzentration wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen von 293T Zellen mittels p27 ELISA gemessen. In den nicht transfizierten Proben konnte kein Signal detektiert werden. (C) Die p27 Capsidprotein Konzentration wurde in Zellysaten von 293T Zellen mittels p27 ELISA gemessen. In den nicht transfizierten Proben konnte kein Signal detektiert werden. (D) Die RT-Aktivität wurde im Zellkulturüberstand von transfizierten 293T Zellen mittels Cavid-Assay gemessen. VSV-G und Rec wurden cotransfiziert. Die Messung erfolgte nach 120 Minuten Inkubation mit dem Substrat. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Experimenten. (E) Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberstand von transfizierten 293T Zellen mittels PERT gemessen. Für eine höhere Partikelproduktion wurde Stufen-1 cotransfiziert. Außerdem wurden VSV-G und Rec cotransfiziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Experimenten. (F) Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberstand von transfizierten 293T Zellen mittels PERT gemessen. Für eine höhere Partikelproduktion wurde Stufen-1 cotransfiziert.

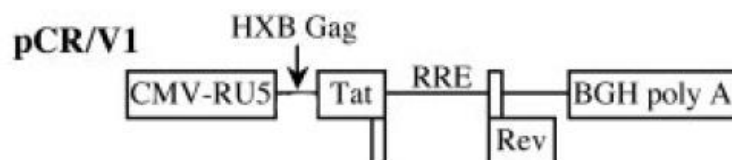
Da oricoGPP keine virale RNA liefert wurde anstelle der RT-Aktivität die p27 Capsidproteinkonzentration als Indikator für die virale Partikelproduktion im folgenden Experiment gemessen. Eine Cotransfektion von oricoGPP mit IFI-16 zeigte keine veränderte Expression des p27 Capsidproteins in Zellkulturüberständen von 293T Zellen (Abbildung 18). IFI-16 scheint daher HERV-K113 auch nicht auf einen RT-unabhängigen Weg zu hemmen.



**Abbildung 18: Cotransfektion von oricoGPP mit IFI-16 führt zu keiner Veränderung der p27 Capsidprotein Expression.** Die p27 Capsidprotein Konzentration wurde im Zellkulturüberstand von 293T Zellen nach Transfektion mit oricoGPP und IFI-16 bzw. einem Kontrollplasmid mit Hilfe des p27 ELISA gemessen. In den nicht transfizierten Proben (NT) konnte kein Signal detektiert werden. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Experimenten.

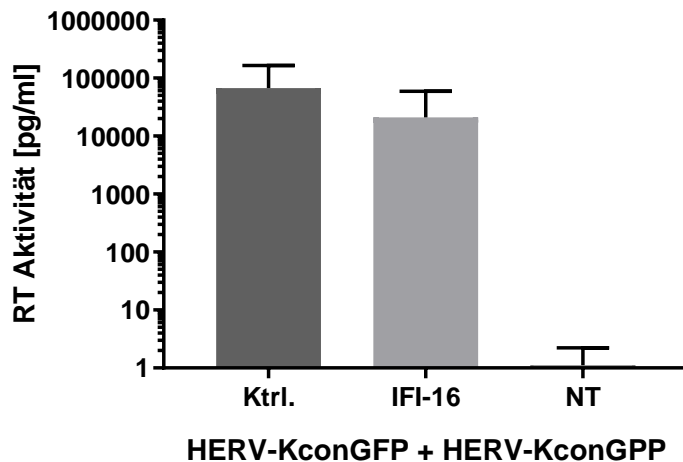
### IFI-16 reduziert nicht die Partikelproduktion von HERV-K Moleklarklonen mit einem CMV Promotor und der RU5 Region der 5'LTR

HERV-KconGPP besitzt wie HERV-KconGFP einen CMV Promotor, aber im Gegensatz zu HERV-KconGFP die RU5-Region von HIV anstatt von HERV.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung von HERV-KconGPP.** Modifiziert übernommen aus Zennou et al., 2004. [70]

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass IFI-16 zu keiner signifikanten Hemmung der viralen Partikelproduktion von HERV-KconGFP und HERV-KconGPP führt. Die RU5 Region scheint daher für die Restriktion durch IFI-16 nicht notwendig zu sein.

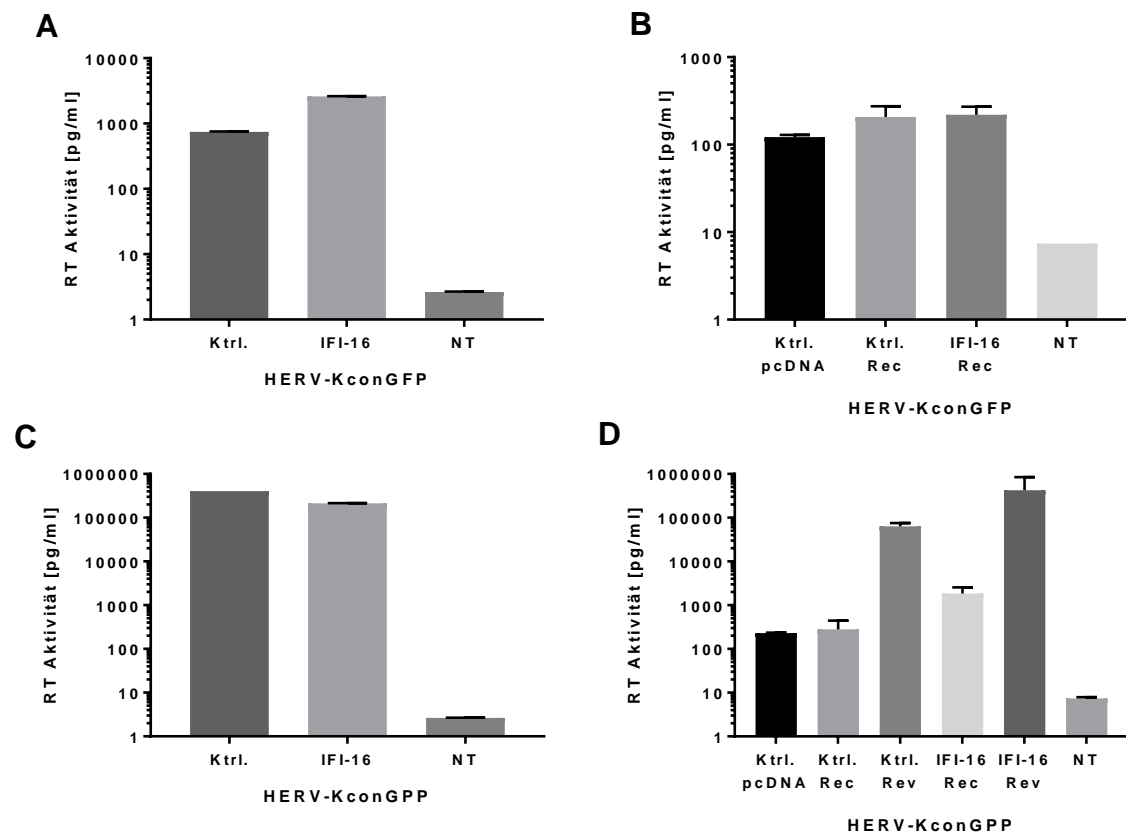


**Abbildung 20: IFI-16 reduziert nicht die Partikelproduktion von HERV-K Moleklarklonen mit einem CMV Promotor und der RU5 Region der 5'LTR.** Für eine höhere Partikelproduktion wurde Staufen-1 cotransfiziert. NT = nicht transfiziert. Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberstand von transfizierten 293T Zellen mittels PERT-Assay gemessen. VSV-G und Rec wurden cotransfiziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten.

Sowohl HERV-KconGFP als auch HERV-KconGPP besitzen das Rev response element (RRE). Rec und Rev sind beide in der Lage an das RRE von HERV zu binden, jedoch kann nur Rev an die RRE von HIV binden. Daher sollten im folgenden Experiment die HERV-Kcon Konstrukte einzeln transfiziert werden und zunächst auf die virale Partikelproduktion mit und ohne IFI-16 getestet werden. Anschließend sollte der Einfluss von Rec bzw. Rev auf die virale Partikelproduktion untersucht werden.

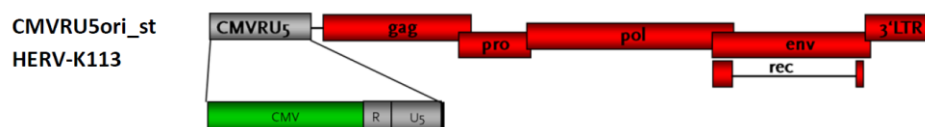
Wurden nur HERV-KconGFP bzw. nur HERV-KconGPP mit VSV-G und Rec bzw. Rev mit IFI-16 cotransfiziert, ist bei beiden Konstrukten keine Hemmung durch IFI-16 in den konzentrierten Zellkulturüberständen von 293T Zellen messbar (Abbildung 21 A bzw. C). Ein weiteres Experiment mit HERV-KconGFP bestätigt, dass IFI-16 die virale Partikelproduktion nicht hemmt (Abbildung 21 B). Abbildung 21 B zeigt außerdem, dass die Transfektion von Rec zu einem leichten Anstieg der RT-Aktivität führt. Abbildung 21 D bestätigt, dass HERV-KconGPP nicht durch IFI-16 gehemmt wird. Außerdem ist zu sehen, dass die Transfektion von Rec keinen Einfluss auf die virale Partikelproduktion hat (Abbildung 21 D). Rev dagegen führt zu einem mehr als 100-fachen Anstieg der viralen Partikelproduktion von HERV-KconGPP (Abbildung 21 D). Die Ergebnisse bestätigen, dass IFI-16 HERV-K nicht hemmt, auch wenn die RU5 Region der HERV 5'LTR vorhanden ist. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass Rec die Partikelproduktion von HERV-KconGFP aber nicht von HERV-KconGPP er-

höht. Im Gegensatz dazu führt die Cotransfektion von Rev zu einer erhöhten viralen Partikelproduktion von HERV-KconGFP.



**Abbildung 21:** IFI-16 reduziert nicht die virale Partikelproduktion von HERV-K Moleklarklonen mit einem CMV Promotor und der RU5 Region der 5'LTR. Für eine höhere Partikelproduktion wurde Stufen-1 cotransfiziert. Außerdem wurden VSV-G und Rec bzw. Rev cotransfiziert. Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen von 293T Zellen mittels PERT gemessen. NT = nicht transfiziert.

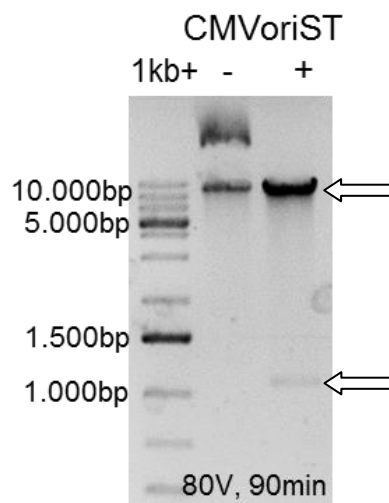
Ein weiterer Moleklarklon mit einem CMV Promotor und der RU5-Region der HERV 5'LTR ist das CMV-RU5\_oriSTHERV-K113 (Abbildung 22). Dieses besitzt im Gegensatz zu ori- und oriSTHERV-K113 einen CMV Promotor anstelle der U3-Region in der 5'LTR.



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung von CMV-RU5\_oriSTHERV-K113. Modifiziert übernommen aus der Dissertation von Veronika Lausch. [78]

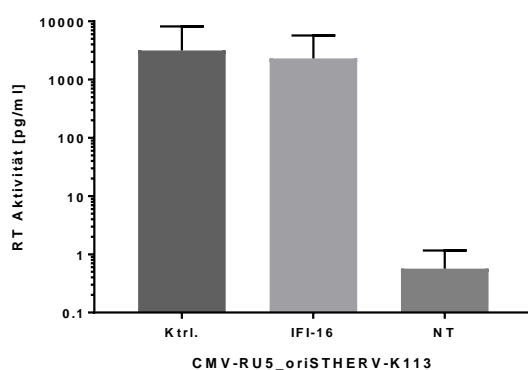
Um sicher zu stellen, dass das verwendete Plasmid die RU5-Region enthält, wurde ein Testverdau durchgeführt. Dabei wurde das Enzym *PvuI* verwendet, das innerhalb der RU5-Region schneidet, wenn diese vorhanden ist, und zur Bildung von zwei

Banden führt. Dies konnte für das verwendete Plasmid im Testverdau gezeigt werden (Abbildung 23), sodass davon auszugehen ist, dass das Plasmid die RU5-Region enthält.



**Abbildung 23: Restriktionsverdau vom CMV-RU5\_oriSTHERV-K113 Plasmid.** Das Plasmid „CMVoriST“ wurde mit (+) oder ohne (-) dem Enzym bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen. Eine Spannung von 80 V wurde für 90 Minuten angelegt und das Ergebnis anschließend dokumentiert.

Durch die Sequenzierung des Plasmids mit dem Primer „CMV-143\_For“, konnte bestätigt werden, dass das Konstrukt die RU5-Region enthält. Die Messung der viralen Partikelproduktion mittels PERT zeigt keine Veränderung durch die Cotransfektion von CMV-RU5\_oriSTHERV-K113 mit IFI-16 (Abbildung 24).

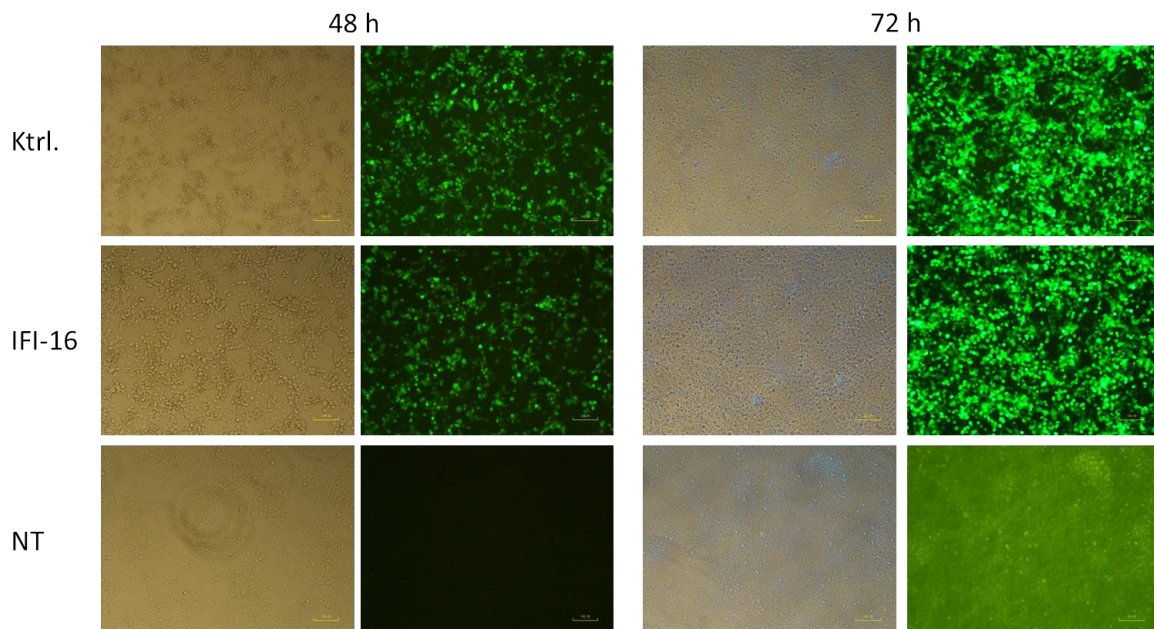


**Abbildung 24: IFI-16 reduziert nicht die RT-Aktivität von CMV-RU5\_oriSTHERV-K113.** Für eine höhere Partikelproduktion wurde Staufen-1 cotransfiziert. Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen von 293T Zellen mittels PERT gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. NT = nicht transfiziert.

### IFI-16 hemmt nicht die GFP Expression von der CMV-GFP Kasette im *env*-Bereich von HERV-KconGFP

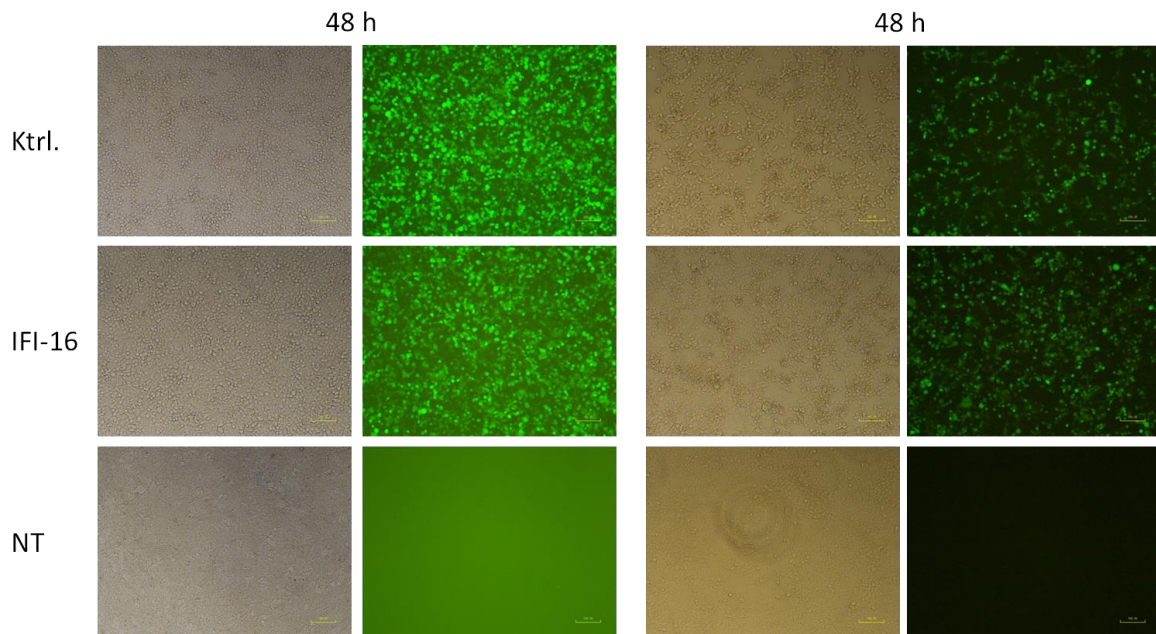
Um zu überprüfen, ob der CMV Promotor durch IFI-16 gehemmt wird, wenn dieser von LTR Strukturen flankiert wird, wurde nach der Transfektion von HERV-KconGFP allein und HERV-KconGFP zusammen mit HERV-KconGPP das Fluoreszenzsignal der CMV-GFP Kasette im *env*-Bereich von HERV-KconGFP mit und ohne IFI-16 gemessen. Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen keinen Unterschied im Fluoreszenz Signal von HERV-KconGFP oder HERV-KconGFP cotransfiziert mit HERV-KconGPP zwischen dem Kontrollplasmid und dem Expressionsplasmid für IFI-16. IFI-16 scheint daher den CMV Promotor auch dann nicht zu beeinflussen, wenn dieser von LTR Strukturen flankiert wird.

#### HERV-KconGFP



**Abbildung 25: IFI-16 hemmt nicht die GFP Expression von der CMV-GFP Kasette im *env*-Bereich von HERV-KconGFP.** Beispielhaft sind zwei unabhängige Experimente dargestellt. NT = nicht transfiziert.

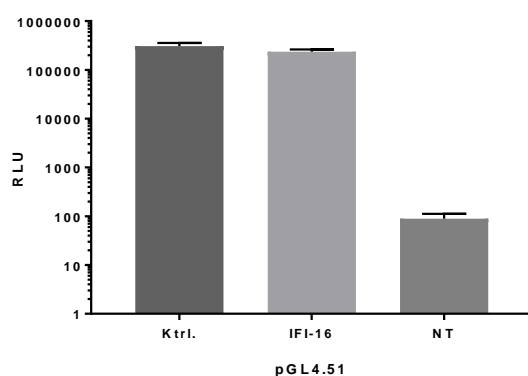
## HERV-KconGFP und HERV-KconGPP



**Abbildung 26: IFI-16 hemmt nicht die GFP Expression von der CMV-GFP Kasette im *env*-Bereich von HERV-KconGFP bei der Cotransfektion von HERV-KconGFP und HERV-KconGPP.** Beispielhaft sind zwei unabhängige Experimente dargestellt. VSV-G und Rec bzw. Rev wurden cotransfiziert. NT = nicht transfiziert.

### IFI-16 inhibiert nicht den CMV Promotor von transfizierten Luciferase-Reporterkonstrukten

Ob IFI-16 den CMV Promotor auch unabhängig von HERV-K hemmt, sollte durch die Transfektion von pGL4.51, einem CMV Promotor getriebenes Luciferase-Reporterkonstrukt untersucht werden. Die Expression von IFI-16 verändert nicht die Luciferase-Aktivität des pGL4.51 Vektors (Abbildung 27).



**Abbildung 27: IFI-16 reduziert nicht die CMV Promotor getriebene Luciferase-Aktivität.** Die Luciferase-Aktivität wurde in Zellysaten von transfizierten 293T Zellen gemessen. NT = nicht transfiziert.



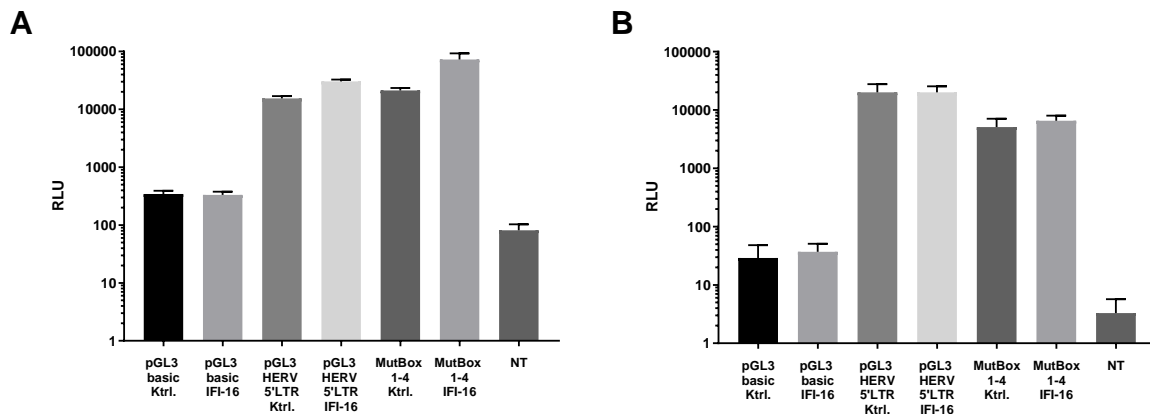
## 6.2 Mutationen in den GC-Boxen des LTR-Promotors reduzieren nicht die Aktivität der 5'LTR von HERV-K113

Fuchs et al. postulieren, dass die transkriptionelle Aktivität der HERV-K LTR durch GC-Boxen innerhalb der LTR reguliert wird und dabei vor allem vier GC-Boxen eine essenzielle Rolle spielen [81]. Um dies zu prüfen, wurden in der 5'LTR von HERV-K113 im pGL3 Vektor diese vier GC-Boxen mutiert. Die Sequenz der GC-Box 1 wurde von CCGCC zu CCACC, die Sequenz der GC-Box 2 von CGGGC zu CAGGC, die Sequenz der GC-Box 3 von CCCCC zu CTCCC und die Sequenz der GC-Box 4 von GGCGG zu GGTGG verändert. Anschließend sollte der Einfluss der Mutationen auf die Promotoraktivität gemessen werden.

Dafür wurden Sk-mel-28 und Tera-1 Zellen mit dem pGL3 basic Vektor, dem pGL3 Vektor mit der HERV 5'LTR und dem pGL3 Vektor mit der HERV 5'LTR, die die vier Mutationen in den GC-Boxen enthält, jeweils mit und ohne IFI-16 transfiziert. Der pGL3 basic Vektor ist ein Luciferase Reporter Vektor, der eine codierende Region für die Luciferase enthält, jedoch keinen Promotor besitzt. Der pGL3 HERV 5'LTR Vektor dagegen enthält zusätzlich die HERV 5'LTR als Promotor. 24 h nach der Transfektion wurden die Zelllysate generiert und die Luciferase-Aktivität gemessen.

In den Zelllysaten von Sk-mel-28 Zellen ist nach der Transfektion von pGL3 HERV 5'LTR eine höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zum pGL3 basic Vektor zusehen (Abbildung 28 A). Die Mutationen der GC-Box 1-4 zeigte keine Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum pGL3 HERV 5'LTR Vektor. In allen drei Vektoren (pGL3 basic, pGL3 HERV 5'LTR und MutBox 1-4) führte die Cotransfektion von IFI-16 zu keiner signifikanten Veränderung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Cotransfektion des jeweiligen Vektors mit einem Kontrollplasmid (Abbildung 28 A). In Abbildung 28 B ist ebenfalls zu sehen, dass die Cotransfektion von IFI-16 mit pGL3 basic, pGL3 HERV 5'LTR bzw. MutBox 1-4 keine Veränderung in der Luciferase-Aktivität bewirkt. Hier wurden die Zelllysate von transfizierten Tera-1 Zellen untersucht. Wie in den Sk-mel-28 Zellen führte die Transfektion von pGL3 HERV 5'LTR zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zu der Transfektion von pGL3 basic. Im Gegensatz zu den Sk-mel-28 Zellen ist in den Tera-1 Zellen eine etwa 4-fache Reduzierung der Luciferase-Aktivität durch die Transfektion von pGL3 HERV 5'LTR mit Mutationen in den vier GC-Boxen zu sehen (Abbildung 28 B). Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die HERV 5'LTR im pGL3 Vektor zu einem stärkeren Signal als der pGL3 basic Vektor führt, sodass davon auszugehen ist, dass die

HERV 5'LTR erfolgreich als Promotor agiert. Zum anderen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Mutationen in den GC-Boxen des LTR-Promotors nicht die Aktivität der 5'LTR von HERV-K113 reduzieren. Außerdem führt IFI-16 zu keiner Hemmung der 5'LTR im pGL3 Vektor.



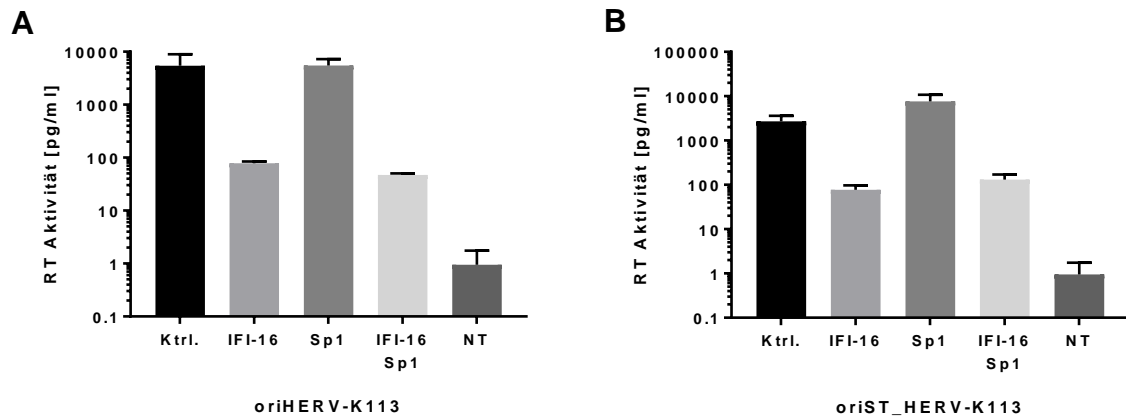
**Abbildung 28: Mutationen in den GC-Boxen des LTR-Promotors reduzieren nicht die Aktivität der 5'LTR von HERV-K113.** Die Luciferase-Aktivität wurde in den Zellslysaten von transfizierten Zellen gemessen. NT = nicht transfiziert. (A) Zellslysate von transfizierten Sk-mel-28 Zellen (B) Zellslysate von transfizierten Tera-1 Zellen.

### 6.3 Sp1 Cotransfektion hebt die Hemmung durch IFI-16 nicht auf

Es konnte gezeigt werden, dass die GC-Boxen der HERV-K LTR Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 sind [81]. Sp1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Bindung an die GC-Boxen von Promotoren diese reguliert [12].

Die Partikelproduktion von oriHERV-K113 wurde durch die Cotransfektion von IFI-16 um das 70-fache gehemmt. Eine Cotransfektion von Sp1 führte zu keiner Veränderung der viralen Partikelproduktion von oriHERV-K113 (siehe Balken Ktrl. und Sp1 aus Abbildung 29 A). Wurde sowohl IFI-16 als auch Sp1 mit oriHERV-K113 cotransfiziert, konnte eine Reduzierung der viralen Partikelproduktion um das 115-fache im Vergleich zu oriHERV-K113 cotransfiziert mit Sp1 gemessen werden (siehe Balken Sp1 und IFI-16 Sp1 aus Abbildung 29 A). Abbildung 29 B zeigt eine Hemmung der viralen Partikelproduktion von oriST\_HERV-K113 durch IFI-16 um den Faktor 35. Wurde Sp1 mit oriST\_HERV-K113 cotransfiziert, steigerte sich die Partikelproduktion um das 3-fache (siehe Balken Ktrl. und Sp1 aus Abbildung 29 B). Wurde IFI-16 zusammen mit Sp1 und oriST\_HERV-K113 cotransfiziert wurde die Partikelproduktion um das 60-fache gehemmt (siehe Balken Sp1 und IFI-16 Sp1 aus Abbildung 29 B).

Die Erhöhung der viralen Partikelproduktion von oriST\_HERV-K113 durch Sp1 legt nahe, dass Sp1 ein möglicher Regulator der HERV LTR ist. Da die Cotransfektion von Sp1 und IFI-16 weiterhin zu einer starken Hemmung der viralen Partikelproduktion führt, ist davon auszugehen, dass Sp1 die Hemmung durch IFI-16 nicht aufheben kann.



**Abbildung 29: Sp1 Cotransfektion hebt die Hemmung durch IFI-16 nicht auf.** Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen von transfizierten 293T Zellen mittels PERT gemessen. Für eine höhere Partikelproduktion wurde Staufen-1 cotransfiziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. NT = nicht transfiziert.

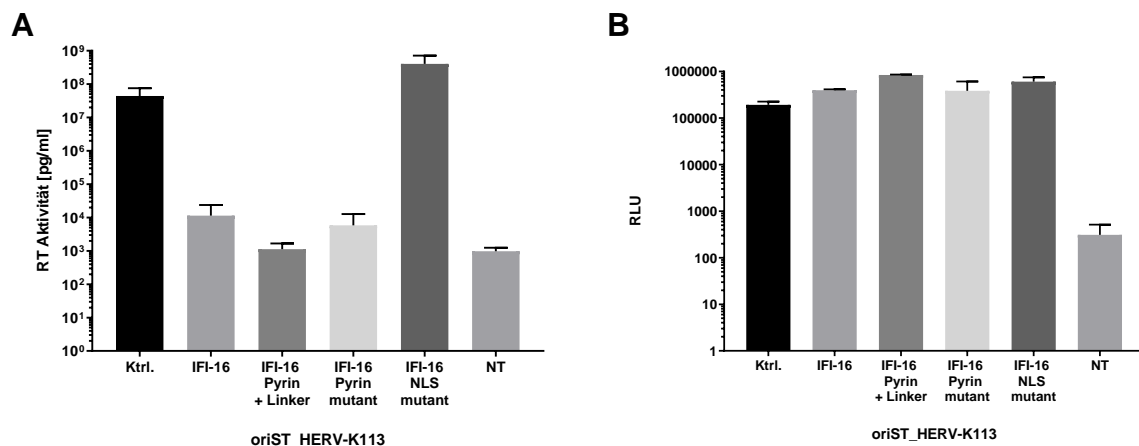
## 6.4 Die Kernlokalisierungssequenz ist essenziell für die virale Restriktion durch IFI-16

IFI-16 gehört zu der Familie der PYHIN Proteine, die eine PYRIN und mindestens eine HIN Domäne aufweisen [47, 49]. Die HIN Domäne ist in der Lage DNA zu binden, wo hingegen die PYRIN Domäne eine Protein-Protein Interaktion ermöglicht [47, 48, 50, 51]. IFI-16 besitzt außerdem eine zweigeteilte Kernlokalisierungssequenz (NLS) in der Linker Region zwischen der PYRIN und der HIN A Domäne [52].

Um herauszufinden, welche Domäne des IFI-16 Proteins für die hemmende Wirkung von HERV-K von Bedeutung ist, wurden verschiedene Mutationen des IFI-16 Proteins untersucht. Die IFI-16 Pyrin + Linker Variante des IFI-16 Proteins besteht aus der PYRIN Domäne sowie der Linker Region zwischen der PYRIN und der HIN A Domäne. Des Weiteren wurde das vollständige IFI-16 Protein mit Mutationen innerhalb der PYRIN Domäne (IFI-16 Pyrin mutant) sowie mit Mutationen innerhalb der Kernlokalisierungssequenz (IFI-16 NLS mutant) untersucht.

In Abbildung 30 A konnte eine Hemmung der viralen Partikelproduktion von oriST\_HERV-K113 durch IFI-16 bestätigt werden. In diesem Experiment wurde eine

etwa 4000-fache Hemmung der viralen Partikelproduktion durch IFI-16 gemessen. Wurde anstelle des vollständigen IFI-16 Proteins lediglich die Pyrin-Domäne mit der Linker-Region transfiziert, konnte weiterhin eine Hemmung der viralen Partikelproduktion von oriST\_HERV-K113 gemessen werden. Das IFI-16 Protein mit Mutationen in der Pyrin-Domäne zeigte ebenfalls eine Hemmung der viralen Partikelproduktion. Wies das IFI-16 Protein jedoch Mutationen in der Kernlokalisierungssequenz auf (IFI-16 NLS mutant) konnte keine Hemmung der viralen Partikelproduktion von oriST\_HERV-K113 mehr gemessen werden (Abbildung 30 A). Abbildung 30 B zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Luciferase-Aktivität der entsprechenden Zelllysaten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kernlokalisierungssequenz für die Hemmung von HERV-K durch IFI-16 notwendig ist.

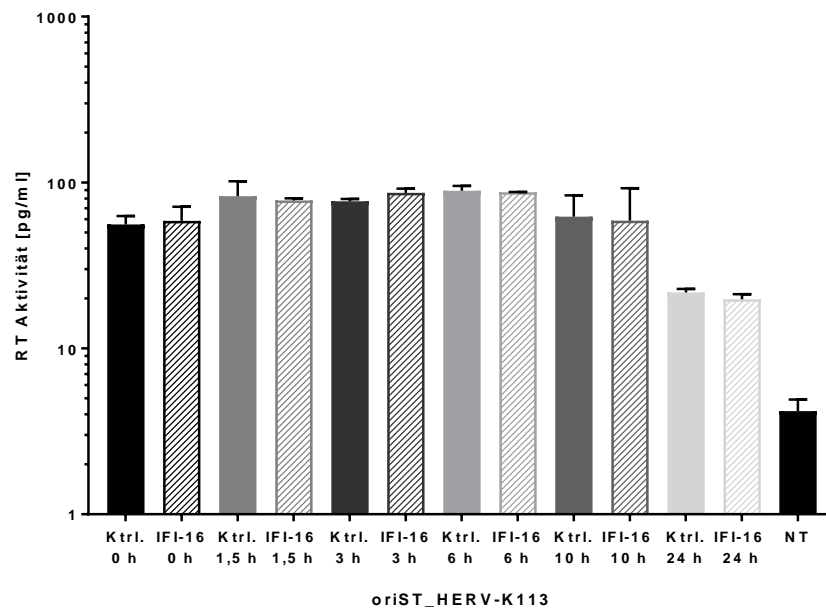


**Abbildung 30: Einfluss von verschiedenen Mutationen des IFI-16 Proteins auf die RT-Aktivität von oriST\_HERV-K113.** NT = nicht transfiziert. (A) Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen von 293T Zellen mittels PERT gemessen. Für eine höhere Partikelproduktion wurde Staufen-1 cotransfiziert. (B) Die Luciferase-Aktivität des transfizierten pGL4.51 Vektors wurde in den Zelllysaten derselben Proben gemessen.

## 6.5 IFI-16 inhibiert die Partikelproduktion des HERV-K Moleklarklons nicht mehr, wenn der Moleklarklon zu einem früheren Zeitpunkt transfiziert wurde

Um zu untersuchen, an welcher Stelle des viralen Replikationszyklus von HERV-K IFI-16 seine hemmende Wirkung entfaltet, wurde die Wirkung von IFI-16 nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. In diesem Experiment wurden zunächst alle Zellen mit oriST\_HERV-K113 transfiziert. Die Zellen wurden nach einer Stunde gewaschen und anschließend zu den unterschiedlichen Zeitpunkten mit IFI-16 transfiziert.

In keiner der Zeitpunkte (0 h bis 24 h nach dem Wachen) führte die Transfektion von IFI-16 zu einer Hemmung der RT-Aktivität von oriST\_HERV-K113 (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Einfluss von verschiedenen Zeitpunkten der Transfektion von IFI-16 nach der Transfektion von oriST\_HERV-K113.** Die RT-Aktivität wurde in 20-fach konzentrierten Zellkulturüberständen von 293T Zellen mittels PERT gemessen. NT = nicht transfiziert.

## 7 Diskussion

In dieser Arbeit sollte ein möglicher Einfluss und die Wirkungsweise des Interferon-induzierbaren Proteins 16 auf die virale Partikelproduktion von HERV-K113, als Vertreter der HERV-K (HML-2) Familie, untersucht werden. Es konnte eine Hemmung der Partikelproduktion von HERV-K113 Moleklarklonen durch IFI-16 gezeigt werden, jedoch nur, wenn die gesamte LTR-Region mit den Bereichen U3, R und U5 von HERV-K113 vorhanden ist.

Bei der Transfektion von HERV-K Moleklarklonen, die nicht codon-optimiert sind, wurde Staufen-1 cotransfiziert. Staufen-1 ist ein humanes Protein und ein Bindungspartner des Rec und Gag Proteins von HERV-K [74, 79]. Die Interaktion von Rec und Gag Proteinen mit Staufen-1 führt zu einer Erhöhung der Partikelproduktion [79]. In der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Cotransfektion von Staufen-1 die Partikelproduktion von HERV-K113 erhöht, aber die Wirkung durch IFI-16 nicht beeinflusst.

Innerhalb des rekonstituierten HERV-K(HML-2) Moleklarklons wurde von der Arbeitsgruppe ein Teil der 5'LTR gegen einen CMV Promotor ausgetauscht, da dieser zu einer höheren Genexpression führt (CMV-RU5\_oriSTHERV-K113). Weitere Konstrukte wurden von Bieniasz et al. bezogen. Dazu gehören die Konstrukte HERV-KconGFP und HERV-KconGPP. Beide besitzen einen CMV Promotor und die RU5 Region. HERV-KconGFP ist ein HERV-K Moleklarklon, der die virale RNA liefert. HERV-KconGPP dagegen liefert vor allem die viralen Proteine, die für die Partikelbildung nötig sind.

Zunächst sollte untersucht werden, ob IFI-16 die Partikelproduktion von transfizierten HERV-K113 Moleklarklonen hemmt. Dafür wurden die Moleklarklone ori- und oriST\_HERV-K113 untersucht. Zunächst sollte die Expression von IFI-16 nach der Transfektion mittels Western Blot bestätigt werden. Abbildung 10 zeigt bei den mit IFI-16 transfizierten Proben eine Bande knapp unterhalb der 100 kDa Marke. Da IFI-16 eine Größe von 85-95 kDa hat [44], ist davon auszugehen, dass hier das IFI-16 Protein detektiert werden konnte. Außerdem sind drei weitere Banden im Größenbereich von 35-45 kDa zu erkennen. Dies könnten möglicherweise Abbauprodukte von IFI-16 sein, die durch die Spaltung des Proteins entstehen. Wurde anstelle von IFI-16 ein Kontrollplasmid transfiziert oder die Zellen nicht transfiziert, sind keine Banden zu sehen (Abbildung 10).

Schließlich sollte die Wirkung von IFI-16 auf die Partikelproduktion von ori- und oriST\_HERV-K113 untersucht werden. In Abbildung 11 A und B konnte gezeigt werden, dass IFI-16 zu einer über 100-fachen Reduzierung der viralen Partikelproduktion von ori- und oriST\_HERV-K113 in 293T Zellen führt. Dabei wurden die konzentrierten Zellkulturüberstände mittels PERT gemessen. Auch im Cavid1 konnte eine Reduzierung der viralen Partikelproduktion durch IFI-16 gezeigt werden (Abbildung 11 C). Hierbei wurde lediglich eine Hemmung um das 55-fache durch IFI-16 erreicht. Der Grund für die geringere Hemmung in diesen Proben könnte daran liegen, dass im Gegensatz zu dem vorherigen Versuch der unkonzentrierte Zellkulturüberstand vermessen wurde. Neben 293T Zellen konnte auch in HeLa Zellen eine Reduzierung der viralen Partikelproduktion von ori- bzw. oriST\_HERV-K113 durch IFI-16 nachgewiesen werden (Abbildung 12 A und B). Die virale Partikelproduktion wurde mit IFI-16 jedoch nur um das 20-fache verringert. Der Einfluss von IFI-16 auf die Partikelproduktion von HERV-K113 wurde außerdem in Sk-mel-28 Zellen untersucht. Sk-mel-28 Zellen sind Melanomzellen, die HERVs endogen bilden können. In dem konzentrierten Zellkulturüberstand von den Sk-mel-28 Zellen wurde eine über 100-fache Reduzierung der viralen Partikelproduktion von oriHERV-K113 gemessen (Abbildung 12 C). Abbildung 13 A zeigt eine Veränderung der viralen Partikelproduktion von oriHERV-K113 in Abhängigkeit von der IFI-16 Konzentration. Bei einer IFI-16 Konzentration von 0,12 µg wurde die virale Partikelproduktion noch reduziert. Dagegen wurde bei einer IFI-16 Konzentration von 0,024 µg oder 0,048 µg kein Effekt mehr erzielt. Es scheint, als sei hier ein Plateau erreicht, bei dem die Menge von IFI-16 zu gering ist, um eine hemmende Wirkung auf die Partikelproduktion von oriHERV-K113 zu haben. Da die Luciferase-Aktivität in denselben Proben keine Unterschiede zeigte, ist davon auszugehen, dass die Zellen durch IFI-16 keinen Schaden genommen haben und auch die höchste eingesetzte Menge (3 µg) keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Wie gezeigt werden konnte, reduziert IFI-16 die Partikelproduktion von oriHERV-K113 und oriST\_HERV-K113. Es ist somit davon auszugehen, dass IFI-16 ein Restriktionsfaktor für humane endogene Retroviren der Familie K ist.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob IFI-16 auch die Partikelproduktion von HERV-K Molekularklonen hemmt, die einen CMV Promotor anstelle der 5'LTR besitzen. Dafür wurde oricoGPP analysiert, ein Molekularklon bei dem die 5'LTR mit einem CMV Promotor ausgetauscht wurde. Da oricoGPP lediglich zur Bildung von

leeren viralen Partikeln führt, wurde neben oricoGPP HERV-KconGFP, das zur Bildung von der viralen RNA führt, cotransfiziert. Für die Bildung von vollständigen Partikeln wurde außerdem VSV-G und Rec cotransfiziert. Das Vesicular stomatitis Virus ist ein Rhabdovirus, welches Tiere infiziert [1]. VSV-G bezeichnet das Hüllprotein (G-Protein) des VSV, welches die Adsorption des Viruspartikels an zelluläre Rezeptoren und die Membranfusion vermittelt [1]. Somit spielt das VSV-G Protein eine entscheidende Rolle bei dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle. Rec ist ein virales Regulatorprotein von HERVs, welches das Gegenstück zu dem Rev Protein von HIV darstellt [1, 16, 80]. Rev ist ein posttranskriptioneller Transaktivator, der den Export von mRNA aus dem Zellkern fördert [1, 16].

Im Western Blot konnte die Expression von IFI-16 nach Transfektion nachgewiesen werden (Abbildung 16). Wie im vorherigem Western Blot ist auch hier eine Bande knapp unter der 100 kDa Marke zu erkennen, die dem IFI-16 Protein entspricht. Wiederum sind weitere Banden zu erkennen, die eventuelle Spaltprodukte von IFI-16 darstellen. Im Gegensatz zu ori- und oriST\_HERV-K113 konnte die Partikelproduktion von oricoGPP und HERV-KconGFP nicht durch IFI-16 gehemmt werden (Abbildung 17). Dabei wurde die RT-Aktivität mittels PERT und die Expression des p27 Capsidproteins mittels ELISA untersucht. Sowohl die RT-Aktivität als auch die Expression des p27 Capsidproteins zeigten keine Veränderung durch die Überexpression von IFI-16. IFI-16 scheint daher die Partikelproduktion weder im Rahmen der Reversen Transkriptase noch davon unabhängig zu hemmen. Dabei spielte es außerdem keine Rolle, ob VSV-G und Rec cotransfiziert wurden (Abbildung 17 A und B). Die Bildung des p27 Capsidproteins von oricoGPP wurde ebenso nicht von IFI-16 gehemmt (Abbildung 18). OricoGPP besitzt wie ori- und oriST\_HERV-K113 die codierenden Sequenzen für Gag, Pro und Pol. Jedoch befindet sich an Stelle der 5'LTR einen CMV Promotor. Auch HERV-KconGFP besitzt einen CMV Promotor, aber zusätzlich den RU5-Bereich der HERV 5'LTR. Der Austausch der 5'LTR durch einen CMV Promotor scheint dazu zu führen, dass IFI-16 seine hemmende Wirkung nicht mehr entfalten kann. Daher ist zu vermuten, dass der Angriffspunkt von IFI-16 innerhalb des LTR-Bereichs liegt.

Als nächstes sollte betrachtet werden, ob die RU5 Region der HERV-K 5'LTR für die Hemmung durch IFI-16 bedeutend ist. Dafür wurden die HERV-K Moleklarklone HERV-KconGFP und HERV-KconGPP untersucht. IFI-16 führte zu keiner signifikanten Hemmung der viralen Partikelproduktion von HERV-KconGFP und HERV-



KconGFP (Abbildung 20). Die RU5 Region scheint daher nicht bedeutend zu sein für die Restriktion durch IFI-16.

Schließlich wurden die Moleklarklone HERV-KconGFP und HERV-KconGPP einzeln mit und ohne IFI-16 untersucht. Dabei sollte außerdem die Wirkung von Rec bzw. Rev auf die Partikelproduktion beachtet werden. Es zeigte sich sowohl bei HERV-KconGFP (Abbildung 21 A) als auch bei HERV-KconGPP (Abbildung 21 C) keine Hemmung der viralen Partikelproduktion durch IFI-16. In Abbildung 21 B wurde außerdem der Effekt von Rec auf die Partikelproduktion von HERV-KconGFP untersucht. Die Cotransfektion von Rec führte zu einem leichten Anstieg der viralen Partikelproduktion. Für HERV-KconGPP wurde neben dem Effekt von Rec auch Rev untersucht. Abbildung 21 D zeigt, dass Rec die Partikelproduktion von HERV-KconGPP nicht erhöht. Rev dagegen führt zu einem mehr als 100-fachen Anstieg der Partikelproduktion von HERV-KconGPP. Dies entspricht den Erwartungen, da Rec und Rev beide an das RRE von HERV bindet und somit die Partikelproduktion von HERV-KconGFP erhöhen können. Da nur Rev an die RRE von HIV binden kann, führt Rev anstelle von Rec bei HERV-KconGPP zu einer gesteigerten Partikelproduktion. HERV-KconGPP besitzt wie HERV-KconGFP einen CMV Promotor und einen RU5-Bereich. Dieser Bereich entspricht jedoch nicht dem aus HERV wie bei HERV-KconGFP sondern dem von HIV. Dennoch zeigen sowohl HERV-KconGFP als auch HERV-KconGPP keine Hemmung der Partikelproduktion durch IFI-16. Die Ergebnisse zeigen, dass IFI-16 HERV-K nicht hemmt, auch wenn die RU5 Region der HERV 5'LTR vorhanden ist. Daher ist zu vermuten, dass vor allem der U3-Bereich der LTR an der Hemmung durch IFI-16 beteiligt ist.

Als nächstes wurde CMV-RU5\_oriSTHERV-K113, ein weiterer HERV-K Moleklarklon mit einem CMV Promotor anstelle der U3-Region in der 5'LTR, untersucht. Der Restriktionsverdau und die Sequenzierung bestätigten, dass der RU5-Bereich in dem Konstrukt vorhanden ist. Abbildung 24 zeigt, dass die Partikelproduktion von CMV-RU5\_oriSTHERV-K113 nicht durch IFI-16 gehemmt wird. Somit führt IFI-16 nicht zu einer Restriktion der CMV-RU5\_oriSTHERV-K113 Partikelproduktion. Dies bestätigt die Annahme, dass der U3-Bereich des HERV-K Provirus der wichtigste Bereich für die Restriktion durch IFI-16 ist.

Um auszuschließen, dass die GFP Expression von der CMV-GFP Kasette im *env*-Bereich von HERV-KconGFP durch IFI-16 gehemmt wird, wurde das Fluoreszenz Signal von HERV-KconGFP mit und ohne IFI-16 verglichen. Dabei wird deutlich,

dass IFI-16 nicht die CMV getriebene GFP Expression im *env*-Bereich von HERV-KconGFP beeinflusst (Abbildung 25 und Abbildung 26). IFI-16 scheint daher die CMV-Promotor getriebene Transkription nicht zu hemmen, auch wenn dieser von zwei LTR Strukturen flankiert wird. Zudem wurde die Wirkung von IFI-16 auf ein CMV getriebenes Luciferase-Plasmid (pGL4.51) untersucht. Da IFI-16 keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität zeigte (Abbildung 27), konnte bestätigt werden, dass IFI-16 die CMV-Promotor getriebene Transkription nicht hemmt.

Die Transkription von exogenen Retroviren, die somatische Zellen infizieren, wird normalerweise initiiert durch ein TATA-Box Motiv und andere Kernpromotor Elemente [81]. Die LTRs von HERV-K agieren jedoch wie ein TATA- und Initiator-Element unabhängiger Promotor, denn die HERV-K LTR wird nicht durch Kernpromotor-Elemente reguliert und besitzt kein Initiator Motiv [81]. Die Expression von HERV-K wird in somatischen Zellen stark gehemmt [81]. Dabei scheinen neben epigenetischen Mechanismen Transkriptionsfaktoren eine große Rolle zu spielen [81]. Fuchs et al. zeigen, dass die HERV-K LTRs durch GC-Boxen reguliert werden und dass die LTR-Region mehrere GC-Boxen enthält, von denen sich vier GC-reiche Bereiche zwischen zwei verschiedenen HERV-K LTRs unterscheiden [81]. Diese vier Boxen dienen als mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren [81]. Sie zeigen außerdem, dass Mutationen in den GC-Boxen zu einer reduzierten Promotoraktivität führen [81].

Im Folgenden sollten die GC-Boxen im 5'LTR-Bereich von HERV untersucht werden. Dafür wurden in der 5'LTR von HERV-K113 im pGL3 Vektor die vier GC-Boxen nach Fuchs et al. [81] mittels *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* mutiert. Durch anschließendem Restriktionsverdau und Sanger-Sequenzierung konnte die erfolgreiche Mutagenese bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Schließlich wurde der Einfluss der Mutationen auf die Luciferase-Aktivität untersucht. Es wurde erwartet, dass durch die Mutationen die Luciferase-Aktivität abnimmt. Dies konnte jedoch nicht in den Zelllysaten von transfizierten Sk-mel-28 Zellen (Abbildung 28 A) gezeigt werden. Lediglich in den Zelllysaten von Tera-1 Zellen ist eine etwa 4-fache Hemmung der Luciferase-Aktivität durch die Mutationen der vier GC-Boxen zu sehen (Abbildung 28 B). IFI-16 zeigte entgegen der Erwartung keine hemmende Wirkung in allen drei Vektoren (pGL3 basic, pGL3 HERV 5'LTR und MutBox 1-4) sowohl in transfizierten Sk-mel-28 als auch in Tera-1 Zellen (Abbildung 28). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Mutationen der vier GC-Boxen zu keiner signifikanten Reduzierung der 5'LTR Aktivität führt. Möglicherweise ist hier kein hemmender Effekt durch

IFI-16 erzielt worden, da lediglich vier GC-Boxen in der 5'LTR von HERV-K mutiert wurden. In der Abbildung 1 aus Fuchs et al. [81], ist jedoch zu sehen, dass es noch sieben weitere GC-reiche Bereiche in der gesamten LTR von HERV-K gibt.

Fuchs et al. zeigen außerdem, dass die GC-Boxen der HERV-K LTR Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 darstellen [81]. Sp1 und Sp3 kommen daher als regulatorische Transkriptionsfaktoren der HERV-K LTR in Frage. Sp1 und Sp3 sind ubiquitär vorkommende Zinkfingerproteine, die als Transkriptionsfaktoren agieren, indem sie an die GC-Boxen von vielen Promotoren binden [12]. Sie kommen vermehrt bei oxidativem Stress vor und sind verantwortlich für die Regulation von Genen, die viele zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose regulieren [12]. Die LTRs von HERV-K enthalten viele Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch Bindestellen für Sp1 [82]. Fuchs et al. zeigten, dass ein Knock-down von Sp1 und Sp3 durch siRNAs die Promotoraktivität von HERV-K reduzierte [81]. Dementsprechend ist zu erwarten, dass eine Überexpression von Sp1 die Promotoraktivität von HERV-K steigert und somit zu einer höheren Partikelproduktion führt.

Sp1 führte jedoch zu keinem Anstieg der Partikelproduktion von ori-HERV-K113 (Abbildung 29 A). Dagegen konnte ein Anstieg der Partikelproduktion von oriST\_HERV-K113 um den Faktor drei gezeigt werden (Abbildung 29 B). Durch Sp1 konnte die Hemmung der Partikelproduktion von Faktor 70 bzw. 35 (ori- bzw. oriST\_HERV-K113) auf den Faktor 115 bzw. 60 gesteigert werden (Abbildung 29 A bzw. Abbildung 29 B). Entgegen der Erwartungen konnte keine Erhöhung der Partikelproduktion von oriHERV-K113 durch Sp1 gezeigt werden. Lediglich bei oriST\_HERV-K113 konnten die Vermutungen bestätigt werden. Sp1 sollte daher als möglicher Angriffspunkt von IFI-16 bei der Restriktion von HERV-K in Betracht gezogen werden. Jedoch scheint es, als ob die Restriktion von HERV-K durch IFI-16 nicht hauptsächlich über die Interaktion mit Sp1 und den GC-Boxen verläuft. Im Gegensatz zu Fuchs et al. zeigen Manghera et al. die vier GC-Boxen nicht als Sp1 Bindestellen an [82]. Lediglich ein GC-reicher Bereich im U3-Bereich der HERV-K LTR wurde als Sp1 Bindestelle gekennzeichnet [82]. Dies stimmt damit überein, dass die U3-Regionen der LTRs den bedeutendsten Bereich für die Regulation der Promotoraktivität bilden, da sie normalerweise die Kernpromotor-Elemente enthalten [81]. Des Weiteren ist zu beachten, dass die HERV-K LTR Promotor-Aktivität Zelltyp abhängig ist. Fuchs et al. zeigten, dass die Mutationen in den vier GC-Boxen in verschiedenen

Zelllinien nicht gleichermaßen zu einer Reduzierung der Promotoraktivität führte [81]. Daher scheinen neben den Transkriptionsfaktoren auch weitere Cofaktoren an der Regulation der Promotoraktivität beteiligt zu sein, die sich jedoch von Zelllinie zu Zelllinie unterscheiden [81]. Da Fuchs et al. die entscheidenden GC-Boxen im RU5 Bereich der LTR vermuteten, wurde erwartet, dass auch im Falle von HERV-K113 IFI-16 durch Interaktion mit dem RU5-Bereich eine hemmende Wirkung erzielt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die gesamte LTR-Region von HERV-K113 essenziell für die Restriktion durch IFI-16 ist. Da aber auch im U3-Bereich GC-Boxen zu finden sind, wird die Vermutung unterstützt, dass die GC-reichen Bereiche für die Restriktion durch IFI-16 entscheidend sind. Diese These wird außerdem durch Untersuchungen von Johnstone et al., Gariano et al und Lo Cigno et al. unterstützt. Johnstone et al. beschrieben IFI-16 als einen Transkriptionsrepressor für den viralen DNA-Polymerasepromotor [44]. Als Angriffspunkt dient die IR1- (*inverted repeat element 1*) Sequenz [44]. Diese enthält eine GC-Box, welche Sp1 mit hoher Affinität binden kann [44]. Neben Sp1 ist auch IFI-16 in der Lage das IR1-Element innerhalb des Promotors zu binden [44]. Die Bindung führt zur Transkriptionsrepression und verhindert die virale Replikation [44]. Gariano et al. zeigten, dass ein Knock-down von IFI-16 zu einer vermehrten Replikation von HCMV führt [67]. Dementsprechend führte eine Überexpression von IFI-16 zu einer verringerten HCMV Replikation [67]. Die Hemmung der HCMV Replikation wurde zurückgeführt auf die Interaktion von IFI-16 mit Sp1, die dazu führt, dass Sp1 nicht mehr mit dem IR-1 Element des UL54 Promotors interagieren kann [67]. Dies hat zur Folge, dass der UL54 Promotor inhibiert wird und die Bildung von viraler mRNA und DNA gestört ist [67]. Die Interaktion von IFI-16 und Sp1 spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Restriktion der Promotoraktivität [67]. Lo Cigno et al. konnten eine reduzierte virale Transkription und Replikation des humanen Papillomavirus durch IFI-16 nachweisen [68]. Sie beschrieben die Sp1 Bindestelle ebenfalls als mögliches Ziel von IFI-16 [68]. Neben Sp1 vermuten sie jedoch auch weitere Faktoren, die zur Hemmung von IFI-16 beitragen [68]. Hotter et al. zeigten, dass IFI-16 durch die Interaktion mit Sp1 auch die Genexpression von HIV-1 inhibiert [41]. Durch die Interaktion von IFI-16 mit Sp1 steht dieses nicht mehr ausreichend zur Verfügung und es kommt zu einer verminderten viralen Genexpression [41]. Diese Inhibierung von HIV-1 ist unabhängig von der Induktion von Interferonen, sondern ist die Folge von der verminderten LTR-getriebenen viralen Genexpression [41]. Sp1 sollte daher als möglicher Faktor für die hemmende Wirkung von IFI-16 in Betracht gezogen werden,

ebenso wie die GC-Boxen in der LTR Promotor Region von HERV-K. Nichtsdestotrotz sollten weitere mögliche Mechanismen für die Restriktion von HERV-K durch IFI-16 in Betracht gezogen werden. So könnte die Restriktion von HERV-K nicht wie Herpesviren oder HIV hauptsächlich über Sp1 und die Transkription gehemmt werden. Auch epigenetische Mechanismen oder der Import/ Export in bzw. aus dem Zellkern könnten eine bedeutende Rolle spielen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welcher Bereich des IFI-16 Proteins für die virale Restriktion von HERV-K von Bedeutung ist. Gariano et al. zeigten zum einen, dass eine Expression von IFI-16 mit Deletionen in der Pysin Domäne zu einer erhöhten HCMV Replikation führt im Vergleich zu einer Überexpression des vollständigen IFI-16 Proteins, jedoch Deletionen in der HIN Domäne zu keiner Veränderung der HCMV Replikation führten [67]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Pysin Domäne entscheidend für die virale Restriktion ist. Zum anderen zeigten sie, dass die Interaktion von IFI-16 mit Sp1 von der HIN Domäne abhängig ist [67]. Im Gegensatz dazu zeigten Hotter et al., dass die Pysin und die Kernlokalisierungssequenz von IFI-16 essenziell für die antivirale Aktivität gegen HIV-1 ist [41].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pysin-Domäne mit der Linker-Region zwischen der Pysin- und der HIN A-Domäne zu einer Hemmung der viralen Partikelproduktion führt (Abbildung 30 A). Aber auch das IFI-16 Protein mit Mutation in der Pysin-Domäne zeigte eine Hemmung der viralen Partikelproduktion. Dies deutet darauf hin, dass die vorhandene Mutation in der Pysin-Domäne auf die hemmende Wirkung auf HERV-K113 keinen Einfluss hat. Des Weiteren zeigt Abbildung 30 A, dass durch Mutationen in der Kernlokalisierungssequenz von IFI-16 die Hemmung der viralen Partikelproduktion aufgehoben wurde. Da in der Linker Region die Kernlokalisierungssequenzen von IFI-16 liegen, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kernlokalisierungssequenz von IFI-16 die entscheidende Domäne für die Restriktion von HERV-K113 ist. Die HIN Domänen, trotz ihrer Funktion als DNA-bindende Domäne, scheinen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da die Pysin und die Linker Regionen ausreichend waren, um eine Hemmung von HERV-K113 zu erzielen. Da die Luciferase-Aktivität in den Proben keine Unterschiede zeigte, ist davon auszugehen, dass die Zellen nicht geschädigt wurden und somit eine Reduzierung der Partikelproduktion durch das Absterben der Zellen ausgeschlossen werden kann.

Um zu untersuchen, an welcher Stelle des viralen Replikationszyklus IFI-16 seine Wirkung entfaltet, wurde IFI-16 nach verschiedenen Zeitpunkten transfiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt. Abbildung 31 zeigt, dass die virale Partikelproduktion bei dem 24 h Zeitpunkt niedriger als bei den restlichen Zeitpunkten ist. Dies könnte daran liegen, dass die Zellen vor der Transfektion mit IFI-16 bereits abgelöste Stellen auswiesen. Dadurch war die Viabilität dieser Zellen bereits gestört und führte somit zu einer verringerten Partikelproduktion. Abbildung 31 zeigt außerdem, dass bei späterer Transfektion von IFI-16 in Zellen, die bereits mit oriST\_HERV-K113 transfiziert wurden, keine Hemmung durch IFI-16 auf die Partikelproduktion mehr stattfindet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass oriST\_HERV-K113 durch IFI-16 nur bei gleichzeitiger Transfektion inhibiert wird, nicht jedoch nachdem oriST\_HERV-K113 bereits transfiziert wurde. IFI-16 scheint daher in der frühen Phase des viralen Replikationszyklus seine Wirkung zu entfalten. Da die HERV-K Moleklarklone in die Zellen transfiziert werden, wird hier die Wirkung von IFI-16 erst nach Eindringen in die Zelle untersucht. Die Wirkung von IFI-16 scheint daher nach dem Eindringen des Virus in die Zelle und dann zu einem frühen Zeitpunkt statt zu finden. Da ein weiteres Experiment gezeigt hat, dass die Kernlokalisierungssequenz von IFI-16 entscheidend für die virale Restriktion ist, ist zu vermuten, dass IFI-16 seine hemmende Wirkung auf HERV-K im Zellkern entfaltet.

IFI-16 ist erwiesenermaßen ein Restriktionsfaktor von verschiedenen Viren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFI-16 auch die Partikelproduktion von HERV-K reduziert, jedoch nur, wenn die gesamte LTR-Region vorhanden ist. Vor allem scheint die U3-Region für die Hemmung durch IFI-16 von Bedeutung zu sein. Die HERV-K LTRs werden durch Transkriptionsfaktoren reguliert, wozu möglicherweise auch Sp1 gehört. Für die Restriktion von HERV-K durch IFI-16 scheint die Kernlokalisierungssequenz die entscheidende Domäne des Proteins zu sein. Außerdem hemmt IFI-16 die Partikelproduktion von HERV-K nur bei zeitgleicher Transfektion mit dem HERV-K Moleklarklon. Die Ergebnisse legen nahe, dass IFI-16 den Replikationszyklus von HERV-K im Zellkern inhibiert.

## 8 Ausblick

Da die Mutationen der vier GC-Boxen nach Fuchs et al. die LTR Aktivität nicht signifikant reduzieren konnte, sollten in weiteren Experimenten alle GC-reichen Regionen in der gesamten HERV LTR verändert werden, um möglicherweise einen Effekt hervorzurufen.

Des Weiteren sollte in dem ori-HERV-K113 Konstrukt die LTR Region schrittweise reduziert werden, um genauer einzugrenzen, ob wirklich die gesamte LTR Region oder nur bestimmte Bereiche für die Hemmung durch IFI-16 notwendig sind. Da die U3-Region als sehr wichtig erscheint, könnte diese in drei Teile unterteilt werden, welche nach und nach aus dem Konstrukt deletiert werden.

IFI-16 gehört zu der PYHIN Proteinfamilie, zu der neben IFI-16 unter anderem auch die humanen Proteine MND4 und AIM2 gehören [45-48]. Ein weiterer interessanter Aspekt ist es zu untersuchen, ob diese beiden Vertreter ebenfalls die Partikelproduktion von HERV-K reduzieren können. AIM2 besitzt keine Kernlokalisierungssequenz, die essenziell für die antivirale Aktivität von IFI-16 gegen HIV-1 und IFI-16 ist [41]. Außerdem zeigte AIM2 keine Reduzierung der HIV-1 Replikation [41]. Daher sollte der Fokus vor allem auf andere Vertreter der PYHIN Proteinfamilie liegen, die eine Kernlokalisierungssequenz besitzen.

## A Literaturverzeichnis

1. Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*, ed. Spektrum. 2003.
2. Lower, R., *The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies*. Trends in Microbiology, 1999. **7**(9): p. 350-356.
3. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviruses*, ed. C.S.H.L. Press. 1997.
4. Weiss, R.A., *The discovery of endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 11.
5. Zhang, W., et al., *Morphology and ultrastructure of retrovirus particles*. AIMS Biophys, 2015. **2**(3): p. 343-369.
6. Bannert, N. and R. Kurth, *The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families*. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2006. **7**: p. 149-173.
7. Borislawrie, K. and H.M. Temin, *The retroviral vector - replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene-therapy*, in *Gene Therapy for Neoplastic Diseases*, B.E. Huber and J.S. Lazo, Editors. 1994, New York Acad Sciences: New York. p. 59-71.
8. Bannert, N., et al., *HERVs New Role in Cancer: From Accused Perpetrators to Cheerful Protectors*. Frontiers in Microbiology, 2018. **9**: p. 8.
9. Bannert, N. and R. Kurth, *Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**: p. 14572-14579.
10. Hohn, O., K. Hanke, and N. Bannert, *HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease*. Frontiers in Oncology, 2013.
11. Escalera-Zamudio, M. and A.D. Greenwood, *On the classification and evolution of endogenous retrovirus: human endogenous retroviruses may not be 'human' after all*. Apmis, 2016. **124**(1-2): p. 44-51.
12. Hanke, K., O. Hohn, and N. Bannert, *HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep*. Apmis, 2016. **124**(1-2): p. 67-87.
13. Mayer, J. and E. Meese, *Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes*. Cytogenetic and Genome Research, 2005. **110**(1-4): p. 448-456.
14. Boller, K., et al., *Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV*. Virology, 1993. **196**(1): p. 349-353.
15. Stoye, J.P., *Endogenous retroviruses: Still active after all these years?* Current Biology, 2001. **11**(22): p. R914-R916.
16. Mayer, J., et al., *Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity*. Virology, 2004. **322**(1): p. 190-8.
17. Wang-Johanning, F., et al., *Expression of human endogenous retrovirus K envelope transcripts in human breast cancer*. Clinical Cancer Research, 2001. **7**(6): p. 1553-1560.
18. Wang-Johanning, F., et al., *Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer*. Oncogene, 2003. **22**(10): p. 1528-1535.
19. Contreras-Galindo, R., et al., *Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer*. Journal of Virology, 2008. **82**(19): p. 9329-9336.
20. Zhou, F.L., et al., *Activation of HERV-K Env protein is essential for tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(51): p. 84093-84117.
21. Fava, P., et al., *Human Endogenous Retrovirus Expression in Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas*. Dermatology, 2016. **232**(1): p. 38-43.



22. Maliniemi, P., et al., *Expression of Human Endogenous Retrovirus-W Including Syncytin-1 in Cutaneous T-Cell Lymphoma*. Plos One, 2013. **8**(10): p. 13.
23. Buscher, K., et al., *Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines*. Cancer Research, 2005. **65**(10): p. 4172-4180.
24. Muster, T., et al., *An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells*. Cancer Research, 2003. **63**(24): p. 8735-8741.
25. Hirschl, S., et al., *Sequence variability of retroviral particles derived from human melanoma cells - Melanoma-associated retrovirus*. Virus Research, 2007. **123**(2): p. 211-215.
26. Serafino, A., et al., *The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation*. Experimental Cell Research, 2009. **315**(5): p. 849-862.
27. Wang-Johanning, F., et al., *Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**(1): p. 81-90.
28. Agoni, L., C. Guha, and J. Lenz, *Detection of Human Endogenous Retrovirus K (HERV-K) Transcripts in Human Prostate Cancer Cell Lines*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 180.
29. Goering, W., T. Ribarska, and W.A. Schulz, *Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer*. Carcinogenesis, 2011. **32**(10): p. 1484-1492.
30. Goering, W., et al., *Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) activity in prostate cancer is dominated by a few loci*. Prostate, 2015. **75**(16): p. 1958-1971.
31. Hishikawa, T., et al., *Detection of antibodies to a recombinant gag protein derived from human endogenous retrovirus clone 4-1 in autoimmune diseases*. Viral Immunology, 1997. **10**(3): p. 137-147.
32. Bengtsson, A., et al., *Selective antibody reactivity with peptides from human endogenous retroviruses and nonviral poly(amino acids) in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism, 1996. **39**(10): p. 1654-1663.
33. Christensen, T., *Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses*. Reviews in Medical Virology, 2005. **15**(3): p. 179-211.
34. Christensen, T., et al., *Molecular characterization of HERV-H variants associated with multiple sclerosis*. Acta Neurologica Scandinavica, 2000. **101**(4): p. 229-238.
35. Hanke, K., et al., *Reconstitution of the Ancestral Glycoprotein of Human Endogenous Retrovirus K and Modulation of Its Functional Activity by Truncation of the Cytoplasmic Domain*. Journal of Virology, 2009. **83**(24): p. 12790-12800.
36. Beimforde, N., et al., *Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113*. Virology, 2008. **371**(1): p. 216-225.
37. George, M., et al., *Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 15.
38. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nature Reviews Microbiology, 2012. **10**(4): p. 279-290.
39. Nisole, S., J.P. Stoye, and A. Saib, *Trim family proteins: Retroviral restriction and antiviral defence*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(10): p. 799-808.
40. Zheng, Y.H., K.T. Jeang, and K. Tokunaga, *Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 28.
41. Hotter, D., et al., *IFI16 Targets the Transcription Factor Sp1 to Suppress HIV-1 Transcription and Latency Reactivation*. Cell Host Microbe, 2019. **25**(6): p. 858-872.e13.
42. Lee, Y.N. and P.D. Bieniasz, *Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus*. Plos Pathogens, 2007. **3**(1): p. 119-130.
43. Gramberg, T., et al., *Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 12.

44. Johnstone, R.W. and J.A. Trapani, *Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(9): p. 5833-5838.
45. Lengyel, P., et al., *The interferon-activatable gene-200-cluster - from structure toward function*. Seminars in Virology, 1995. **6**(3): p. 203-213.
46. DeYoung, K.L., et al., *Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma*. Oncogene, 1997. **15**(4): p. 453-457.
47. Dell'Oste, V., et al., *The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response*. New Microbiologica, 2015. **38**(1): p. 5-20.
48. Unterholzner, L., et al., *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nature Immunology, 2010. **11**(11): p. 997-U42.
49. Dawson, M.J. and J.A. Trapani, *The interferon-inducible autoantigen, IFI-16 - localization to the nucleolus and identification of a DNA-binding domain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **214**(1): p. 152-162.
50. Jin, T.C., et al., *Structures of the HIN Domain: DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor*. Immunity, 2012. **36**(4): p. 561-571.
51. Stehlik, C. and J.C. Reed, *The PYRIN connection: Novel players in innate immunity and inflammation*. Journal of Experimental Medicine, 2004. **200**(5): p. 551-558.
52. Briggs, L.J., et al., *Novel properties of the protein kinase CK2-site-regulated nuclear-localization sequence of the interferon-induced nuclear factor IFI 16*. Biochemical Journal, 2001. **353**: p. 69-77.
53. Baggetta, R., et al., *The interferon-inducible gene IFI16 secretome of endothelial cells drives the early steps of the inflammatory response*. European Journal of Immunology, 2010. **40**(8): p. 2182-2189.
54. Trapani, J.A., et al., *Genomic organization of IFI16, an interferon-inducible gene whose expression is associated with human myeloid cell-differentiation - correlation of predicted protein domains with exon organization*. Immunogenetics, 1994. **40**(6): p. 415-424.
55. Gugliesi, F., et al., *Up-regulation of the interferon-inducible vertical bar F vertical bar 16 gene by oxidative stress triggers p53 transcriptional activity in endothelial cells*. Journal of Leukocyte Biology, 2005. **77**(5): p. 820-829.
56. Mondini, M., et al., *Role of the interferon-inducible gene IFI16 in the etiopathogenesis of systemic autoimmune disorders*, in *Autoimmunity, Pt B: Novel Applications of Basic Research*, M.E. Gershwin and Y. Shoenfeld, Editors. 2007, Blackwell Publishing: Oxford. p. 47-56.
57. Veeranki, S. and D. Choubey, *Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: Regulation of subcellular localization*. Molecular Immunology, 2012. **49**(4): p. 567-571.
58. Li, T., et al., *Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(26): p. 10558-10563.
59. Caposio, P., et al., *A novel role of the interferon-inducible protein IFI16 as inducer of proinflammatory molecules in endothelial cells*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(46): p. 15.
60. Fujiuchi, N., et al., *Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20339-44.
61. Xin, H., et al., *Role of IFI 16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence*. Oncogene, 2003. **22**(31): p. 4831-4840.
62. Uchida, K., et al., *Identification of specific autoantigens in Sjogren's syndrome by SEREX*. Immunology, 2005. **116**(1): p. 53-63.

63. Mondini, M., et al., *A novel autoantigen to differentiate limited cutaneous systemic sclerosis from diffuse cutaneous systemic sclerosis - The interferon-inducible gene IFI16*. Arthritis and Rheumatism, 2006. **54**(12): p. 3939-3944.
64. Xin, H., O.M. Pereira-Smith, and D. Choubey, *Role of IFI 16 in cellular senescence of human fibroblasts*. Oncogene, 2004. **23**(37): p. 6209-6217.
65. Johnstone, R.W., J.A. Kerry, and J.A. Trapani, *The human interferon-inducible protein, IFI 16, is a repressor of transcription*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(27): p. 17172-17177.
66. Conrady, C.D., et al., *Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16*. Mucosal Immunology, 2012. **5**(2): p. 173-183.
67. Gariano, G.R., et al., *The Intracellular DNA Sensor IFI16 Gene Acts as Restriction Factor for Human Cytomegalovirus Replication*. Plos Pathogens, 2012. **8**(1): p. 17.
68. Lo Cigno, I., et al., *The Nuclear DNA Sensor IFI16 Acts as a Restriction Factor for Human Papillomavirus Replication through Epigenetic Modifications of the Viral Promoters*. Journal of Virology, 2015. **89**(15): p. 7506-7520.
69. Monroe, K.M., et al., *IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T Cells Abortively Infected with HIV*. Science, 2014. **343**(6169): p. 428-432.
70. Zennou, W., et al., *APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles*. Journal of Virology, 2004. **78**(21): p. 12058-12061.
71. Longo, P.A., et al., *Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI)*, in *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, J. Lorsch, Editor. 2013, Elsevier Academic Press Inc: San Diego. p. 227-240.
72. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
73. Alam, J. and J.L. Cook, *Reporter Genes - Application to the study of mammalian gene - transcription*. Analytical Biochemistry, 1990. **188**(2): p. 245-254.
74. Hohn, O., et al., *Development of an antigen-capture ELISA for the detection of the p27-CA protein of HERV-K(HML-2)*. Journal of Virological Methods, 2016. **234**: p. 186-192.
75. Roberts, P.L., D. Lloyd, and P.J. Marshall, *Virus inactivation in a factor VIII/VWF concentrate treated using a solvent/detergent procedure based on polysorbate 20*. Biologicals, 2009. **37**(1): p. 26-31.
76. Vermeire, J., et al., *Quantification of Reverse Transcriptase Activity by Real-Time PCR as a Fast and Accurate Method for Titration of HIV, Lenti- and Retroviral Vectors*. Plos One, 2012. **7**(12): p. 12.
77. Ekstrand, D.H.L., et al., *A sensitive assay for the quantification of reverse transcriptase activity based on the use of carrier-bound template and non-radioactive-product detection, with special reference to human-immunodeficiency-virus isolation*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1996. **23**: p. 95-105.
78. Lausch, V., *Etablierung eines Verfahrens zur Kombination der Elektronenmikroskopie (EM) mit der Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) sowie Untersuchungen zum Infektionsprozess und der Ultrastruktur des Human Endogenen Retrovirus K (HERV-K)*, in *FG18 HIV und andere Retroviren*, RKI. 2013.
79. Hanke, K., et al., *Staufen-1 Interacts with the Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML-2) Rec and Gag Proteins and Increases Virion Production*. Journal of Virology, 2013. **87**(20): p. 11019-11030.
80. Buscher, K., et al., *Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines*. Melanoma Research, 2006. **16**(3): p. 223-234.

81. Fuchs, N.V., et al., *Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promoter Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3*. *Journal of Virology*, 2011. **85**(7): p. 3436-3448.
82. Manghera, M. and R.N. Douville, *Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors?* *Retrovirology*, 2013. **10**: p. 11.

# B Anlagen

## Sanger-Sequenzierung

### CMV-RU5\_oriSTHERV-K113

```

C G A A C A G T C T C A C C C C A T T G A C C C A T T G A C C G A C G T C
A A T G G G A G T T T G T T T T G A A T T G A C C G A C C G A C A G A C A
T T C A A C A C G T C C C C C C A T T G A C C G A C C G A C C G A C C G A C A
A T G G G C G G T A T A A A C C C C A T T G A C C G A C C G A C C G A C C G A C
A G G T C T A T A A A A C C C C A T T G A C C G A C C G A C C G A C C G A C C G
T C C A T C T A C T G A G G C T G A A T G T T A C C G A C C G A C C G A C C G A
C G C C T C A G G G C A G C A A T A C T A C T G A C C G A C C G A C C G A C C G
G C A C T G A G A G A G A G T G T T A C C G A C C G A C C G A C C G A C C G A C
T A T C T A A T T G A T T C A C G T C T C T C T G T T A C C G A C C G A C C G A
T T T T G T T C A C C C A C C C C A C C C C A C C C C A C C C C A C C C C A C C
A C G A G A A C C C A C C C C A C C C C A C C C C A C C C C A C C C C A C C C C
G G G C A A C G T G G A G C T C G A C C G A C C G A C C G A C C G A C C G A C C
G T G A A G G A C G T C T A C C G A C C G A C C G A C C G A C C G A C C G A C C
T T G A G A C G T A G T A T A T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
C G A G T A A A A T T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A A G T A A A A T T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
T C T T A T C T C A G C T T A G C A G C A A G G G G G G G G G G A G A G A G A
T T T T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A T C T A A A T A A A T A A G A A A C A A A G A A A C A A G A A A G A A A A A
T T T C A A A T C C A G A A A G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
C A T G G T T T C C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A G A T C T A A A A C T A A A T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
G G A A G G G T A A A T A A T C A T T C C A C T T A C T T A C T T A C T T A C T
A G T A T G G A A T G A A T G A T T G A T T G G G C C A T T A T T A T T A T T A
A A A G C A G C T T T T A G A T T A G T T T C A G T T T T C A A A A A A A A A
C A G A G A T A G A T A G T G T T T C A A A G C T G T A T A T A A A A A A A A
A T G C C T C C T G C A A A A A A A A A A A A G C T G T A T A T A A A A A A A
T T G T A A T G A A A A A A A A A A A A A A C C A C G A A A A A A A A A A A A
C A T C C A G A A T A A A T A G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A A T T C C A G A A T A T T C A A C G C A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A T G T C T C A G T T C A A C G C A A A C G C A A A A A A A A A A A A A A A A
A C C T A T A T T C A A T T A C A A C G C A A A A A A A A A A A A A A A A A A
G A A A T A T A T A T A T A T A T C C T G T G A A A A A A A A A A A A A A A A

```

## HERV-K 5'LTR MutBox 1-4

(die vier GC-Boxen sind rot markiert)

```

C T A T T T G G T T T T C G T C T G A A A A A A T
A A G T T A C A A A T T A C T C T A T C T T G T A C A A A
G C T C C A C T T A C T C T C T C T A T C A T T G T G G G G
A A A G C A A G A G G A G A G A G A A G A A A G A T T G A
A C T G T G T C T G T G A C T C C A T T T T C T G A A A A
G A C A T A A G G A A A A A A T T C T T C T G A C C T T A
T G A G A T T C T G T T A A A T C T A T C T G A C C T T A
A C C C C C C A A C C C C G T G C T C A A C T C C T G A A
G A A T G T G A C T T G T T A A A C A G C T C G A G A G A
G T G C T T T G T T A A A C A G A T G C C T T G C C T T G
G G C A G C A T G C T C C T A A T C T C A A G A G T C A T C
A C C A C T C C C C C T A A A A A C T G C G G A A A G C C A
G G G A C A C A A A A A A C T G C C T A G G A A A G C C A
C A G G G A C C T C T G C C A A G G T T T C T C C C A T
G T G A T T A G G T C A A G A A G A A C T G A C C G T C C
G G G A T A G G G A A C A A C C C G T A A A G G G T C C T
C C A G C C C G A C A C C C G T A A A A G A A G G T C C T
G T G C T G A G G A T G C C A G G A G G A T T A G A G A G
G A A G G A A T G C C T C T T G C A A T G G A A A C C A
C A A G A G G A A G A A G G C A A G G G A A A T G T C C
C T G T C C C T G G A A G A A C T A G G A G A A C T G C C
A T C A G C A A T A A T G C T T A T G T G T A T G C A T A
C T A A A A G C A C A G C A A G C A C T T A A A T C C T T
A C A T T G T C T A T G A T T T G T C T G C A A G A C C T T
T G T T C A C G T G T T T T G T C T G C T G C T G A C C C
T C T C C C C A C A T C T C A A T T G T C T T G A A C C C
T G A C A C A C A G A T G A A T C A A T A A A T A A C T A
A C C C A A C A C T A A T G C T G A A G C A T G G A A T C
C T C C A T A T G C T G A A C G C T G G T T C T A T C C
C G G T T C C C C T T A T T C T T T T C T T C T T C T A T
A C T T T G T C T C T G T G T C C A G T C C C A G G G C
T C C A A A C A C C C A C A G G T G T G T A G G G C C
A G A C C C A C C C C C A C T A C A T C A T C G C C A
C A C G T G C T T G G C A T T C C G A T T C C G A T A
G T A A G C T T G G C A A T T C C G A A G G A A C G C
G G T A A A G C C A C A A G A A A G G C C G C
A A A A C A T A A A G A A A G G C C G G
A T T C T T C C G C G C G G A A A T

```

## Danksagung

An dieser Stelle danke ich all jenen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Masterarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Norbert Bannert, der es mir ermöglicht hat, meine Masterarbeit im FG18 am Robert Koch-Institut anzufertigen und für seine Unterstützung sowie Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke Dr. rer. nat. H. Rawel für die Begutachtung der Arbeit von Seiten der Universität Potsdam.

Außerdem gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe FG18. Danke, dass immer ein offenes Ohr für Fragen da ist und für das freundliche Arbeitsklima. Für die Einführung und Hilfestellung in meiner ersten Zeit möchte ich mich besonders bei Martina Keller bedanken. Mein weiterer Dank gilt Dr. Oliver Hohn und Luise Krüger, für die Unterstützung und Hilfestellung im Labor.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir stets zur Seite standen. Zuletzt möchte ich noch all denjenigen danken, die in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit für mich da waren, insbesondere meinem Freund Paul.

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und das alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

.....  
Ort, Datum

.....  
Antonia Zumblick