

Inhibition von Betaretroviren durch das interferoninduzierte Protein IFI16

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M. Sc.)

im Studiengang Biologie
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Aylin Savas

Berlin, 20. Februar 2020

angefertigt am Robert Koch-Institut in Berlin im Fachgebiet 18 „HIV und
andere Retroviren“

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Retroviren	1
1.1.1 Aufbau	1
1.1.2 Infektionszyklus.....	2
1.1.3 Humane endogene Retroviren (HERV).....	3
1.1.4 Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV)	5
1.1.5 Maus-Mammatumor-Virus (MMTV).....	5
1.2 Das interferon-induzierte Protein 16 (IFI16)	6
1.2.1 Aufbau	6
1.2.2 Funktion.....	7
1.2.3 Restriktion von Viren durch IFI16.....	7
2. Zielsetzung	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Material.....	9
3.1.1 Zelllinien	9
3.1.2 Chemisch kompetente Bakterien	9
3.1.3 Plasmide.....	9
3.1.4 Primer, Sonden und Templates	10
3.1.5 Antikörper	10
3.1.6 Medien und Puffer	10
3.1.7 Reagenzien, Chemikalien und Lösungen	11
3.1.8 Enzyme	12
3.1.9 Verbrauchsmaterialien	12
3.1.10 Kits	12

3.1.11 Geräte	13
3.1.12 Software zur Auswertung	13
3.2 Methoden der Zellkultur	14
3.2.1 Zellkultivierung	14
3.2.2 Zählung und Aussäen von Zellen.....	15
3.2.3 Transfektion.....	15
3.2.3.1 Transfektion mit Polyethylenimin	15
3.2.3.2 Tranfektion mit Lipofectamine.....	16
3.2.3.3 Transfektion mit Calciumphosphat.....	16
3.2.4 Ernte der Transfektionen.....	17
3.2.5 Virusproduktion	17
3.2.6 Infektion.....	18
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	19
3.3.1 Transformation	19
3.3.2 Plasmidpräparation	20
3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	20
3.3.4 Restriktionsverdau	21
3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	21
3.3.6 PERT-Assay zur Bestimmung der RT-Aktivität.....	22
3.3.7 Durchflusszytometrie (FACS).....	24
3.4 Proteinchemische Methoden.....	25
3.4.1 Western Blot.....	25
3.4.1.1 SDS-PAGE	25
3.4.1.2 Semi-Dry-Blot	26
3.4.1.3 Antikörperfärbung	26
4. Ergebnisse.....	28
4.1 Restriktion von oriST-HERV-K113 durch IFI16.....	28
4.2 Bedeutung der viralen LTR für die Hemmung durch IFI16	29
4.3 Wirkung des IFI16 auf CMV-JSRV und CMV-MMTV	31

4.4 Bedeutung der Domänen des IFI16 für die Restriktion des oriST-HERV-K113	32
4.5 Einfluss des Zeitpunktes der IFI16-Transfektion auf die Hemmung des oriST-HERV-K113.....	34
4.6 Abhängigkeit der Hemmung vom Zeitpunkt der Transfektionen	36
4.7 Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden	37
4.8 Einfluss von IFI16 auf die Infektion von Zellen mit HERV-K _{con}	38
5. Diskussion	43
6. Ausblick	51
Literaturverzeichnis	53
Anhang	57
Danksagung	59
Selbstständigkeitserklärung	60

Abkürzungsverzeichnis

BAC	Bronchioloalveoläres Karzinom
BFP	blau fluoreszierendes Protein
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Env	virale Hüllmembran
FACS	fluorescence-activated cell sorting
g	Erdbeschleunigung
Gag	gruppenspezifische Antigene
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HML	Human MMTV-like
HSV	Herpes Simplex Virus
IFI16	Interferon-induziertes Protein 16
IRES	internal ribosomal entry site
JSRV	Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus
LTR	long terminal repeat
MMTV	Maus-Mammatumor-Virus
mRNA	messenger RNA
NLS	Kernlokalisierungssequenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERT	product-enhanced reverse transcriptase
PFA	Paraformaldehyd
<i>pol</i>	Gen für virale Enzyme
qPCR	quantitative real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
tRNA	Transfer-RNA

Zusammenfassung

Neben der Funktion als Immunsensor besitzt das interferon-induzierte Protein 16 (IFI16) auch eine hemmende Wirkung auf verschiedene Viren, die noch wenig verstanden ist. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die antivirale Wirkung von IFI16 auch bei Betaretroviren, insbesondere dem humanen endogenen Retrovirus K (HML-2) auftritt. Die HERV-K(HML-2)-Familie ist die jüngste Familie der HERVs und enthält mitunter weitgehend intakte Proviren, die offene Leserahmen für alle viralen Genprodukte besitzen. Für diese Arbeit wurde ein Moleklarklon verwendet, in welchem alle postinsertionalen Mutationen, die sich vermutlich im Laufe der Evolution angesammelt haben, revertiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass IFI16 in der Lage ist, HERV-K113, ein Mitglied der HERV-K(HML-2)-Familie zu hemmen, was durch die Aktivität der Reversen Transkriptase in den Überständen der transfizierten Zellen bewertet wurde. Durch die Untersuchung eines CMV-HERV-K113-Konstruktes, welches anstelle der U3-Region der LTR einen CMV-Promotor besitzt, konnte gezeigt werden, dass die virale LTR eine wichtige Rolle für die Hemmung durch das IFI16 spielt. Eine virale Restriktion des Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV) und des Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV) durch IFI16 konnte nicht gezeigt werden. Für die Analyse standen jedoch nur Konstrukte zur Verfügung, die nicht die gesamte virale LTR enthalten. Aus diesem Grund ist es trotz der Ergebnisse mit den vorhandenen Konstrukten weiterhin recht wahrscheinlich, dass das IFI16 in der Lage ist, die virale Partikelproduktion dieser Viren zu inhibieren, denn JSRV und MMTV sind dem HERV-K(HML-2) sehr ähnlich und gehören wie diese ebenfalls zu den Betaretroviren. Das Kernlokalisierungssignal des IFI16 ist essenziell für seine antivirale Wirkung, wodurch begründet werden kann, dass die Hemmung durch IFI16 im Kern der Zelle stattfindet. Die HIN-Domänen des IFI16 sind im Gegensatz dazu nicht von Belang, was die antivirale Funktion des Proteins betrifft, denn die Pyrin-Linker-Domäne des IFI16 war ausreichend für den antiviralen Effekt. Bei Transfektion des Moleklarklons oriST-HERV-K113 und einer späteren Transfektion des IFI16 konnte keine Hemmung mehr gezeigt werden, wonach die Hemmung des IFI16 vermutlich in den frühen viralen Replikationsschritten ansetzt. Wurde das IFI16 in den Zellen, welche mit oriST-HERV-K113 transfiziert wurden, bereits vorher transfiziert, wurde entgegen der Erwartungen keine verringerte virale Partikelproduktion gemessen. Dieser Umstand lässt vermuten, dass nur durch die gleichzeitige Transfektion der Plasmide gesichert werden kann, dass die Zellen beide Plasmide aufnehmen und exprimieren. Durch die Infektion von Zellen, die zuvor mit IFI16 transfiziert wurden, mit einem HERV-GFP-Reportervirus, konnte außerdem gezeigt werden, dass das IFI16 keinen Einfluss auf den Einbau des Virusgenoms in das Genom der Zellen hat und somit seine Hemmung erst nach dem Einbau entfaltet.

Abstract

Aside from its function as an immune sensor, the interferon-inducible protein 16 (IFI16) has an antiviral effect on different viruses. In this work the antiviral effect of IFI16 on betaretroviruses was determined, particularly on the human endogenous retrovirus K (HML-2). The HERV-K(HML-2) family is the youngest family of HERVs and occasionally includes intact proviruses with open reading frames for all viral gene products. The molecular clone of HERV-K113, which was used for this work, is a construct, where all postinsertational mutations were reverted. The results show that IFI16 is able to inhibit HERV-K113, a member of the HERV-K(HML-2) family. The inhibition was determined by the activity of the reverse transcriptase in the supernatant of the transfected cells. Analysis of a CMV-HERV-K113 construct, where the U3 region is replaced by a CMV promoter, showed that the viral LTR is important for the inhibition by IFI16. If the U3 region is replaced, the inhibition of HERV-K113 is much lower than the inhibition of the construct with the complete LTR. Analysis of the Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV) and the Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) showed no inhibition by IFI16. For this experiment there were only constructs available, in which the U3 region of the viral LTR is replaced by a CMV promoter. Therefore, it is still likely that IFI16 is able to restrict JSRV and MMTV in the presence of a full viral LTR. The nuclear localization signal is essential for the antiviral effect of IFI16, whereby it was shown that the restriction takes part in the nucleus of the cell. In contrast, the HIN domains seem to be dispensable, because the pyrin-linker domain of the IFI16 is sufficient for the restriction of HERV-K113. If the molecular clone oriST-HERV-K113 was transfected and the IFI16 was cotransfected at later points in time, the antiviral effect was gone, so it seems like the inhibition takes part in the early steps of viral replication. If the IFI16 was transfected first and the oriST-HERV-K113 was cotransfected at later points in time, there was, contrary to expectations, no antiviral effect. It seems like only simultaneous transfection of both plasmids can guarantee that the cells incorporate and express both plasmids. Furthermore, 293T cells were transfected with IFI16 and later infected with a HERV-GFP reportervirus. The results indicate that the infection of the cell and the integration of the viral genome into the genome of the host cell is not inhibited by IFI16 and thereby the viral restriction seems to appear after integration.

1. Einleitung

1.1 Retroviren

Die Klasse der Retroviren beinhaltet behüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom. Die Besonderheit der Retroviren ist der Besitz des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), welches den Retroviren ermöglicht ihr RNA-Genom in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Die Retroviren unterteilen sich in die Unterfamilien der Orthoretroviren und der Spumaviren. Eine Gattung der Orthoretroviren bilden die Lentiviren, die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) das wohl bekannteste Retrovirus beinhalten. Eine weitere Gattung stellen die Betaretroviren dar, welche sowohl exogene, als auch endogene Vertreter beinhalten. Die exogenen Betaretroviren sind im Gegensatz zu den endogenen Formen noch infektiös. (Löwer, 1999; Modrow et al., 2010)

1.1.1 Aufbau

Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 100 nm, wobei die Partikel eine Hüllmembran besitzen, die das sogenannte Capsid umschließt. Das Capsid beinhaltet einen Komplex aus den zwei positiv orientierten RNA-Strängen, welche die virale Genominformation beinhalten, und den sogenannten Nukleocapsidproteinen. Im Viruscapsid befinden sich außerdem die für die Replikation wichtigen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. In der Hüllmembran sind außerdem Glykoproteine verankert, welche eine wichtige Rolle bei den ersten Schritten der Infektion spielen. Das Viruspartikel enthält außerdem noch Matrixproteine, welche an der Innenseite der Hüllmembran zu finden sind und die sogenannten Link-Proteine, welche das Capsid mit der Hüllmembran verbinden.

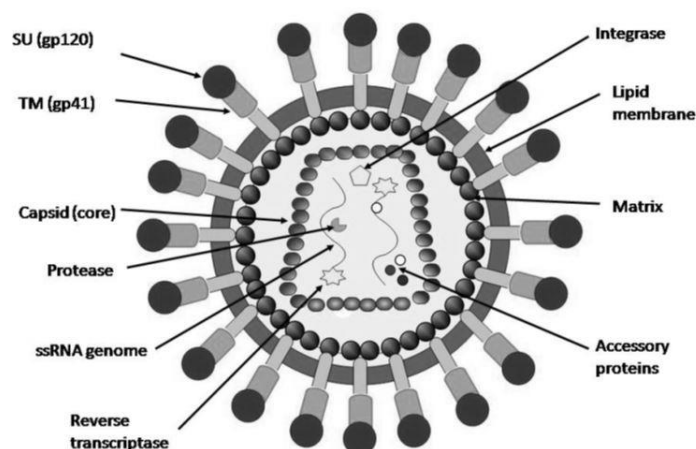


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus am Beispiel von HIV. Übernommen aus Freimanis (2014).

Das Genom der Retroviren (Abbildung 2) befindet sich auf einer einzelsträngigen RNA, welche in zweifacher Kopie im Capsid vorliegt. Die RNA besitzt eine Cap-Struktur am 5'-Ende und eine Polyadenylierung am 3'-Ende, Strukturen, die auch bei einer eukaryotischen mRNA zu finden sind. Auf die Cap-Struktur folgt zunächst eine spezifische Basenfolge, die als R-Region bezeichnet wird, wobei das R für redundant steht, da sich diese Basenfolge auch am 3'-Ende wiederfindet. Auf die R-Region folgt die für die Integration wichtige U5-Region, worauf noch eine Primerbindestelle und die sogenannte Ψ -Region folgt. Der codierende Bereich der RNA besteht im Wesentlichen aus drei Regionen, die mit *gag*, *pol* und *env* bezeichnet werden. Die Gag-Region codiert für gruppenspezifische Antigene wie die Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine, die Pol-Region für die Enzyme und die Env-Region für die Glykoproteine der Hüllmembran. Der codierenden Region schließt sich ein Polypurintrakt an, dem die U3-Region folgt, welche nur noch durch die erneute R-Region von der abschließenden Polyadenylierungssequenz getrennt wird. (Modrow et al, 2010)

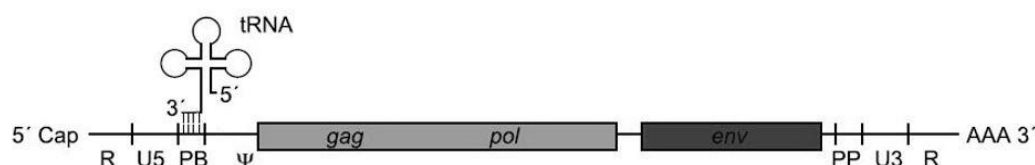


Abbildung 2: Genom der Retroviren. Modifiziert übernommen aus Modrow et al., 2010

1.1.2 Infektionszyklus

Exogene Viren sind in der Lage Wirtszellen zu infizieren. Für die Replikation und die Generierung neuer infektiöser Partikel müssen sie den gesamten retroviralen Infektionszyklus durchlaufen (Abbildung 3). Im ersten Schritt der Infektion bindet das Virus mit den Glykoproteinen der Hüllmembran an spezifische Rezeptoren der Zielzelle. Nach Bindung an die Membran der Zelle kommt es entweder zur Fusion der Membranen oder zur Endozytose des Viruspartikels. In beiden Fällen wird das Viruscapsid und im Folgenden die virale RNA im Cytoplasma der Zelle freigegeben. Durch die reverse Transkriptase wird die virale RNA in doppelsträngige DNA umgewandelt und in den Zellkern transportiert. Mithilfe des Enzyms Integrase wird die doppelsträngige DNA in das Genom des Wirtes integriert.

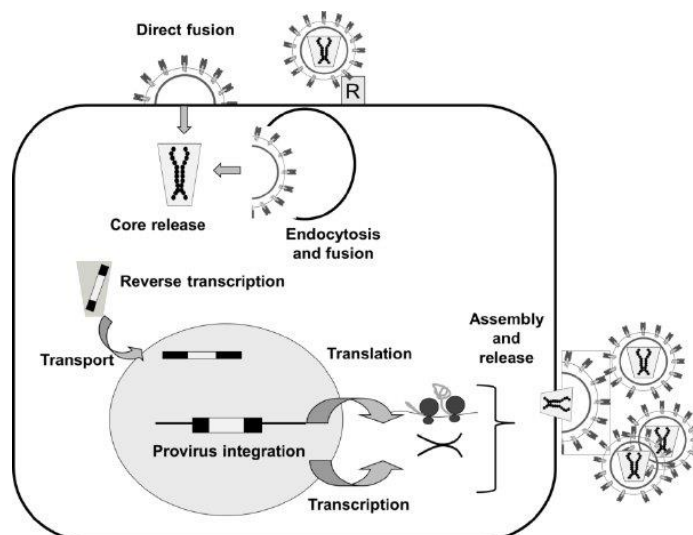


Abbildung 3: Infektionszyklus der Retroviren. Übernommen aus Liechtenstein et al., 2013

Die integrierte virale DNA wird als Provirus bezeichnet (Abbildung 4). Das Provirus besitzt nach der Integration an beiden Enden die sogenannte LTR, welche zum Zeitpunkt der Integration genau identisch ist. Die LTRs dienen außerdem als Promotor für die Transkription der viralen DNA.

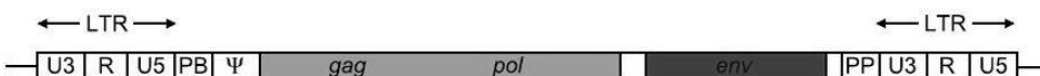


Abbildung 4: In das Genom der Wirtszelle integriertes Provirus. Übernommen aus Modrow et al., 2010)

Das Provirus wird, wie auch die anderen Gene des Wirtsgenoms, von der zellulären RNA-Polymerase abgelesen und in eine mRNA transkribiert. Die mRNA wird in das Cytoplasma transportiert und dort werden alle nötigen Virusproteine translatiert. Die einzelnen Virusbestandteile fügen sich schließlich zu einem kompletten Viruspartikel zusammen, welcher von der Zelle freigegeben wird und in der Lage ist neue Zellen zu infizieren. (Liechtenstein et al., 2013; Modrow et al., 2010)

1.1.3 Humane endogene Retroviren (HERV)

Humane endogene Retroviren (HERV) gehören zur Familie der Retroviren, wobei die verschiedenen Subtypen der HERVs unterschiedlichen Gattungen der Retroviren zugeordnet werden (Abbildung 5). Alle Menschen tragen HERV-Sequenzen als integralen Teil des eigenen Genoms (Löwer et al., 1996), wobei sie etwa 8% des gesamten humanen Genoms einnehmen (Hohn et al., 2016). Vieles spricht dafür, dass einmal eine exogene, infektiöse Form des Virus existiert hat und durch die Infektion von Keimbahnzellen als endogene Form weitervererbt

wurde. Die Fähigkeit von Retroviren ihr Genom in die DNA des Wirtsorganismus zu integrieren, ermöglichte es, dass die einst exogenen Viren sich als endogene Form im Genom des Wirtes integrieren konnten und so von Generation zu Generation nach den Mendelschen Regeln weitergegeben wurden (Lee und Bieniasz, 2007). Alle proviralen Loci, die heutzutage existieren, haben mit der Zeit und mit der DNA-Replikation ihres Wirtes durch Mutationen und Deletionen ihre Infektiosität verloren und sind weitestgehend defekt (Fuchs et al., 2011). Durch Analysen des humanen Genoms war es möglich einige, wenn auch weitestgehend defekte HERV-Proviren verschiedener Familien zu isolieren und zu charakterisieren (Löwer et al., 1996). Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Retroviren eine Familie mit sieben Gattungen, zu welchen auch die verschiedenen HERV-Familien zugeordnet werden (Abbildung 5).

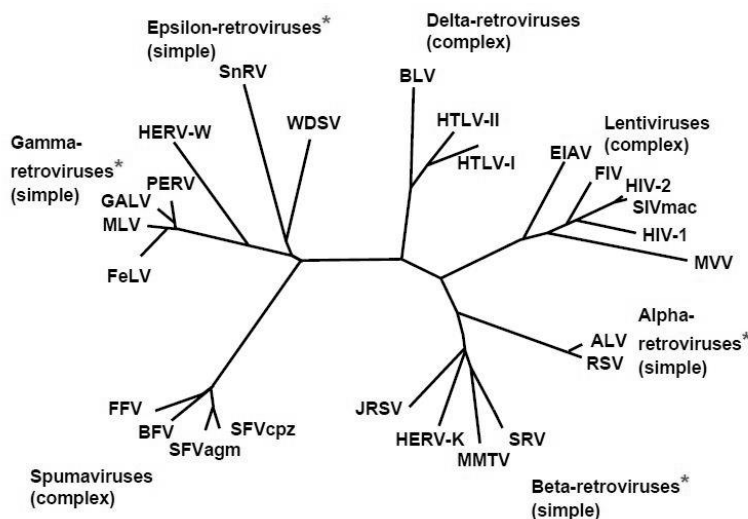


Abbildung 5: Phylogenie der Retroviren. Mit * markierte Gattungen beinhalten endogene Formen. Übernommen aus Weiss (2006).

Die humanen endogenen Retroviren unterteilen sich wiederum in verschiedene Familien. Diese Familien wurden nach der Aminosäure-Spezifität der tRNA benannt, welche sie zur Initiierung der reversen Transkription verwenden, wobei der Einbuchstabencode der Aminosäure dem HERV angehängt wird. HERVs die eine Lysin-spezifische tRNA verwenden, werden demnach als HERV-K bezeichnet (Bannert und Kurth, 2006). Die HERV-K-Familie gehört zu den Betaretroviren (Abbildung 5) und ist selbst in weitere Untergruppen unterteilt. Eine dieser Untergruppen wird als HERV-K(HML-2) bezeichnet. Der Name ist aufgrund der Ähnlichkeit zu dem Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV) entstanden, wobei das HML für „Human MMTV-like“ steht (Hanke et al., 2016). Die HERV-K(HML2)-Unterfamilie enthält die jüngst integrierten und am besten erhaltenen Proviren, welche sogar offene Leseraster besitzen, die für funktionelle

virale Proteine codieren (Hohn et al., 2013). Aufgrund der gut erhaltenen Proviren und der funktionellen Aktivität eignet sich diese Unterfamilie der humanen endogenen Retroviren am besten, um diese Art der Viren zu erforschen und zu verstehen. Für diese Arbeit wurde ebenfalls ein Molekularklon dieser Familie verwendet, das HERV-K113.

Die humanen endogenen Retroviren haben zwar im Laufe der Evolution ihre Infektiosität verloren, werden aber dennoch mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung gebracht. In einigen Tumoren, wozu Keimzelltumoren und Melanome gehören, wurde die Expression von HERV-K Proteinen, welche in gesunden Zellen unterdrückt wird, beobachtet. Ebenfalls wurde die Rolle von proviralen Sequenzen bei der Aktivierung von Protoonkogenen diskutiert. (Fuchs et al., 2011)

1.1.4 Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV)

Das Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus gehört, wie auch HERV-K, zu den Betaretroviren. Das Virion hat einen Durchmesser von etwa 80-100 nm und ist eingeschlossen von einer Hüllmembran aus Glykoproteinen. In den Virionen befinden sich zwei Kopien der einzelsträngigen, positiv orientierten RNA. Das Virusgenom beinhaltet vier Hauptgene, das *gag*, *pro*, *pol* und *env*. Zusätzlich zu dem exogenen, infektiösen JSRV gibt es auch eine endogene Form, die im Wirtsgenom fest integriert ist und als enJSRV bezeichnet wird. Die Genome von JSRV und enJSRV sind mit 90-98% Homologie sehr nah verwandt. Das JSRV infiziert Schafe, wobei es die Transformation von Epithelzellen der Bronchien und Alveolen verursacht. Schließlich kann es zu einem broncho-alveolären Adenokarzinom führen, welches das Analogon zum humanen bronchioloalveolären Karzinom (BAC) darstellt. Die Besonderheit dieser Viren ist die Eigenschaft, dass allein das virale Hüllprotein onkogen ist und das Genom keine weiteren Onkogene enthält. (Leroux et al., 2006; Caporale et al., 2006)

1.1.5 Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)

Das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) gehört, wie auch das JSRV und HERV-K, zu der Gattung der Betaretroviren. Wie auch die anderen Vertreter codiert das Genom des Virus für die Gruppenspezifische Antigene (Gag), die Enzyme, welche für die Genomreplikation benötigt werden (Pol) und die Hüllproteine (Env). Das MMTV infiziert Mäuse und wird von infizierten Müttern durch das Säugen über die Muttermilch an ihre Säuglinge weitergegeben. Es existiert neben der exogenen Form auch eine endogene Form des Virus, welches vor etwa 10-20 Millionen Jahren in das Mausgenom integriert wurde. Die große Mehrheit der endogenen Vertreter produzieren jedoch keine infektiösen Viren. Es wurden bisher 10 verschiedene

exogene und mehr als 30 endogene MMTVs identifiziert. Das MMTV infiziert Epithelzellen der Brust und kann letztendlich zu Tumoren in der Brust führen. (Ross, 2010; Luther and Acha-Orbea, 1997)

1.2 Das interferon-induzierte Protein IFI16

Das interferon-induzierte Protein 16, kurz IFI16, gehört zur PYHIN Protein Familie, zu welcher Proteine gehören die sowohl eine Pyrin- als auch eine HIN-Domäne besitzen (Unterholzner et al., 2010). Das Protein kommt natürlicherweise in menschlichen Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und blutbildenden Zellen vor (Dell'Oste et al., 2014).

1.2.1 Aufbau

IFI 16 ist ein etwa 85-95 kDa großes Protein, dessen Aufbau in Abbildung 6 dargestellt ist (Dawson und Trapani, 1995). Es besitzt zwei HIN-Domänen, welche als HINA und HINB bezeichnet werden und durch eine Spacer-Region getrennt werden. Die HIN-Domänen befähigen das IFI16 dazu sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA sequenzunspezifisch zu binden. Am N-Terminus besitzt das Protein außerdem eine Pyrin-Domäne, die es dem IFI16 möglich macht mit anderen Proteinen zu interagieren (Dell'Oste et al., 2014). Zwischen der Pyrin-Domäne und der HIN-Domäne besitzt das IFI16 eine Kernlokalisierungssequenz (NLS), die dafür sorgt, dass das Protein nach der Translation in den Kern transportiert wird und dort überwiegend lokalisiert ist (Li et al., 2012). Die Spacer-Region, welche die HIN-Domänen voneinander trennt, ist reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin und wird daher als S/T/P-Region bezeichnet. Die Größe dieser Region wird durch das Splicing der mRNA reguliert, wodurch sie ein, zwei oder drei Kopien der hoch konservierten, 56 Aminosäuren umfassenden, S/T/P-Domäne enthalten kann (Johnstone und Trapani, 1999). Aufgrund der Variation der S/T/P-Region gibt es drei verschiedene Isoformen (bezeichnet mit IFI16A-C), die sich nur durch eben diese Region und die variierende Anzahl der Kopien voneinander unterscheiden.

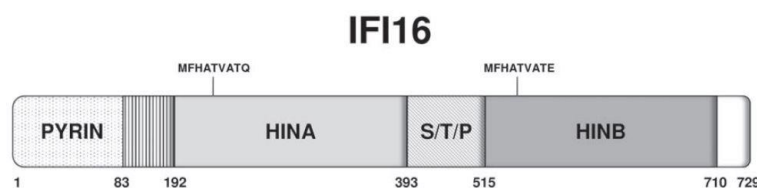


Abbildung 6: schematischer Aufbau des IFI16. Darstellung der verschiedenen Domänen des IFI16 mit den entsprechenden Aminosäure-Positionen. Zwischen den Aminosäure-Positionen 90 und 145 befindet sich die Kernlokalisierungssequenz. MFHATVATQ und MFHATVATE repräsentieren konservierte Aminosäuresequenzen innerhalb der HIN-Domänen. Übernommen aus Dell'Oste et al. (2014)

1.2.2 Funktion

Das IFI16 ist ein angeborener Immunsensor für intrazelluläre DNA und spielt somit eine Rolle bei der Abwehr von mikrobiellen Erregern (Jin et al., 2012). Das Protein kann dank seiner HIN-Domäne DNA binden und die Interaktion mit Proteinen ist mithilfe der Pyrin-Domäne möglich. Dem IFI16 wird ein breites Spektrum an Funktionen nachgesagt, wie etwa die Regulation der Apoptose, dem Zellwachstum und der Differenzierung von Zellen (Dell'Oste et al., 2014). IFI16 ist außerdem verantwortlich für eine entzündungsfördernde Gen-Stimulation und fungiert als Regulator der Entzündungsreaktion in Endothelzellen. Das IFI16 ist somit vermutlich in die frühen Schritte der Entzündungsreaktion involviert (Caposio et al., 2007). Des Weiteren vermittelt IFI16 die Induktion von Interferon- β im Zuge einer Immunantwort (Unterholzner et al., 2010).

1.2.3 Restriktion von Viren durch IFI16

Neben den Funktionen von IFI16 als Immunsensor oder bei der Regulation des Zellzyklus, wurden dem Protein auch antivirale Eigenschaften nachgewiesen. Für verschiedene Viren wurde gezeigt, dass das IFI16 in der Lage ist diese zu hemmen. Conrady et al. (2011) untersuchten die Resistenz gegenüber dem Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) in Epithelzellen und den Einfluss des IFI16 auf diese Resistenz. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass IFI16 die Produktion von Interferon- α aktiviert und somit eine wichtige Rolle bei der Eindämmung des HSV-1 einnimmt, da das Interferon- α für die Expression antiviraler Gene verantwortlich ist. IFI16 konnte demnach als wichtiger Faktor für die Resistenz gegen HSV-1 identifiziert werden. Das IFI16 wirkt auch für das humane Cytomegalovirus (HCMV) als Restriktionsfaktor. Gariano et al. (2012) stellten fest, dass eine Reduktion der IFI16-Expression zu einer erhöhten Replikation des HCMV und eine Überexpression wiederum zu einer Reduktion der viralen Partikelproduktion führte. Das IFI16 scheint folglich eine Rolle bei der Inhibition der Virusreplikation zu spielen, vermutlich durch die Beeinträchtigung der viralen DNA-Synthese. Neben HSV-1 und HCMV, welche beide zu den Herpesviren gehören, wurde auch das Humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) und die mögliche Restriktion durch IFI16 untersucht. Jakobsen et al. (2013) zeigten, dass IFI16 in der Lage ist DNA-Formen, die während der Replikation von HIV entstehen, zu detektieren und das angeborene Immunsystem zu stimulieren, wodurch es an der Kontrolle der Replikation von HIV-1 beteiligt ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Transkription von HIV-1 durch die Bindung von IFI16 an den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 inhibiert wird (Hotter et al., 2019). Die Replikation des humanen Papillomvirus wird ebenfalls durch das IFI16 gehemmt, indem die virale Genexpression reprimiert wird (Lo Cigno et al., 2015).

2. Zielsetzung

Das interferon-induzierte Protein 16 (IFI16) ist ein Protein, welches in Epithelien, Endothelien und blutbildenden Zellen exprimiert wird. Das Protein fungiert als Immunsensor und spielt eine Rolle im Laufe der Immunantwort und bei der Bildung von Entzündungsreaktionen. Das IFI16 fungiert außerdem als Regulator für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Neben seinen Funktionen als Immunsensor und Regulator von Zellfunktionen kann das IFI16 jedoch auch als viraler Restriktionsfaktor wirken. Für verschiedene Viren konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch IFI16 negativ reguliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das interferon-induzierte Protein 16 (IFI16) auch eine hemmende Wirkung auf Vertreter der Betaretroviren hat. Insbesondere sollte hierbei das HERV-K113 untersucht werden, aber auch das Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus und das Maus-Mammatumortumor-Virus sollten in die Untersuchungen mit eingeschlossen werden. Für die Versuche wurde das oriST-HERV-K113 verwendet. Dies ist ein Plasmid, welches einen vollständigen Moleklarklon des HERV-K(HML-2) enthält, wobei alle postinsertionalen Mutationen rückgängig gemacht wurden, um das Virus in seinem möglichst originalen Zustand zu untersuchen. In einer vorherigen Arbeit (Zumblick A., 2019, nicht veröffentlicht) konnte bereits gezeigt werden, dass bei einer gleichzeitigen Transfektion von IFI16 und HERV-K113 eine Hemmung erkennbar ist. In dieser Arbeit sollten diese ersten Ergebnisse zunächst verifiziert werden, um eine klare Aussage darüber treffen zu können, ob das HERV-K113 von IFI16 gehemmt wird. Um dies zu untersuchen sollten die Expressionsplasmide des HERV-K113 und des IFI16 in 293T-Zellen kotransfiziert werden und anschließend mithilfe eines PERT-Assays die Hemmung durch das IFI16 analysiert werden. Es wurde ebenfalls die Wirkung von IFI16 auf ein CMV-Konstrukt untersucht, um die Wichtigkeit der viralen LTR im Zuge der Hemmung zu analysieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, in welcher Phase des viralen Replikationszyklus die Restriktion durch das IFI16 stattfindet. Um dies zu untersuchen sollte das IFI16 zu späteren Zeitpunkten transfiziert werden als das HERV-K113. Im Gegensatz dazu sollte außerdem analysiert werden, ob es einen Einfluss hat, wenn das IFI16 schon vor dem HERV-K113 transfiziert wurde. Des Weiteren sollte die Wichtigkeit der verschiedenen Domänen des IFI16 für die Restriktion analysiert werden. Über die Transfektionen hinaus sollte die Wirkung des IFI16 auch in einem Infektionsexperiment untersucht werden. Für die Infektion wurde das HERV-K_{con} verwendet, ein GFP-Reportervirus, welches es ermöglicht zu erkennen, ob eine Zelle infiziert wurde und ob das Virusgenom in das Zellgenom integriert wurde. Mit diesem Virus sollten sowohl 293T- als auch CrFK-Zellen infiziert werden und somit der Effekt des IFI16 auf den Infektionsprozess von Zellen durch HERV betrachtet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Ursprung
CrFK	Katze	Niere
HEK293T	Mensch (Embryo)	Niere

3.1.2 Chemisch kompetente Bakterienstämme

Tabelle 2: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
One Shot™ TOP10	Invitrogen
Stbl3™	Invitrogen

3.1.3 Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	Beschreibung
ConGFP	codiert für die virale RNA des HERV-K113, besitzt ein GFP-Reportergen in der Env-Region (Lee und Bieniasz, 2007)
ConGPP	codiert für die viralen Strukturproteine und Enzyme (Lee und Bieniasz, 2007)
MB3	Kontrollplasmid für das IFI16 (Leervektor; wie das MB5 ohne codierende Sequenz für IFI16) (Hotter et al., 2019)
MB5	IFI16-Expressionsplasmid (Hotter et al., 2019)
MB20	Pyrin-Linker-Domäne des IFI16 (Hotter et al. 2019)
MB50	NLS-Mutante des IFI6 (Hotter et al., 2019)
oriST-HERV-K113	oriST-HERV-Molekularklon mit Rückmutation der nicht synonymen und stillen Mutationen (Lausch, 2013)
pCMV-oriST-HERV	oriST-HERV-Molekularklon mit einem CMV-Promotor (Lausch, 2013)
Staufen-Flag	Staufen-Flag, Protein zur Erhöhung der HERV-Partikelproduktion
HIV-Rev	Rev-Protein des Humanen Immundefizienz-Virus
VSV-G	Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus (VSV)
pCMV-JSRV	JSRV mit einem CMV-Promotor
pCMV-MMTV	MMTV mit einem CMV-Promotor

3.1.4 Primer, Sonden und Templates

Tabelle 4: Primer, Sonden, Templates

Primer	Sequenz/Hersteller
Horie2010_PERT-F	TCC TGC TCA ACT TCC TGT CGA G
Horie2010_PERT-R	CAC AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG
MS2-PERT_Horie-Probe (FAM)	Sigma-Aldrich
MS2-RNA-Template	Sigma-Aldrich

3.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Antikörper	Hersteller
IFI-16 Antikörper (1G7): sc-8023	Santa Cruz Biotechnologie
Anti-HA-Tag (ab130275)	abcam
Anti-Maus IRDye@680LT	LI-COR
Anti-GAPD	Sigma

3.1.6 Medien und Puffer

Tabelle 6: Medien und Puffer

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
5% Milchpuffer	5% Milchpulver in PBS-T
DMEM	Robert Koch-Institut
DMEMcomplete	DMEM + 10% FBS
Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 1% SDS, 0,25 M Tris
LB-Medium	Robert Koch-Institut
NP40complete-Lysepuffer	25 ml NP40-Lysepuffer + 1 Tablette cOmplete Protease Inhibitor
NP40-Lysepuffer	50 mM Hepes, 150 mM EDTA, 0,5% NP40
PBS	0,01 M NaH ₂ PO ₄ , 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,2
PBS-T	PBS + 0,1% Tween20
S.O.C-Medium	Invitrogen
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3
Tris-Puffer 1,5M und 0,5M	Bio-Rad
Virus-Lysepuffer	0,25% Triton X-100, 50 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 40% Glycerol, pH 7,4

3.1.7 Reagenzien, Chemikalien und Lösungen

Tabelle 7: Reagenzien, Chemikalien, Lösungen

Reagenz/Chemikalie/Lösung	Hersteller/Zusammensetzung
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH
2-Mercaptoethanol	ROTH
6x DNA Loading Dye	Fermentas
Ammoniumpersulfat (APS)	ROTH
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	ROTH
cOmplete Protease-Inhibitor	Roche
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH
Ethanol	ROTH
Ethidiumbromid	ROTH
FBS Superior	Biochrom
GeneRuler DNA Ladder (1 kb, 100 bp)	Thermo Scientific
HBS-Lösung (2x)	5 M CaCl ₂ -Lösung, 0,5 M HEPES (pH 7,1), 0,15 M Na ₂ HPO ₄
Hepes	ROTH
Laemmli-Puffer (6x)	Bio-Rad
Milchpulver	ROTH
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	ROTH
Penicillin-Streptomycin Lösung	Hyclone
Polybrene [1 mg/ml]	Sigma
Polyethylenimin (PEI) [2,5 µg/µl]	Polysciences
Röhrchen (round bottom tubes)	Micronic
Rotiphorese Gel 30	ROTH
SDS	Sigma
SensiFAST Probe No-ROX Mix (2x)	Bioline
Temed	Bio-Rad
Trypsin/EDTA	Biochrom
Tween20	ROTH

3.1.8 Enzyme

Tabelle 8: Enzyme

Enzym	Hersteller
AvaI	Thermo Scientific
PstI	New England BioLabs
EcoRI	Thermo Scientific
MluI	New England BioLabs
NotI	Thermo Scientific
XbaI	New England BioLabs

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6-Well-Platten	TPP (Techno Plastic Products AG)
12-Well-Platten	TPP (Techno Plastic Products AG)
96-Well-PCR-Platten	Bio-Rad
Cryo-Röhrchen	Greiner Bio One GmbH
Filterpapier	Bio-Rad
Microseal B Adhesive Sealer	Bio-Rad
Nitrocellulose Membran 0,45 µm	Bio-Rad
Pipettenspitzen	ART, Biozym, Brand, Sorenson, VWR
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	TPP (Techno Plastic Products AG)
Ultrazentrifugenröhrchen (25x89 mm)	Beckmann Coulter
Zellkulturflaschen	TPP (Techno Plastic Products AG)
Zellschaber S	TPP (Techno Plastic Products AG)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP (Techno Plastic Products AG)

3.1.10 Kits

Tabelle 10: Kits

Kit	Hersteller
Lipofectamine 3000 Transfection Kit	Thermo Fisher
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
HS-Mg RT Activity Kit	Cavidi

3.1.11 Geräte

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti Centrifuge J-20XP	Beckmann Coulter
Bakterien Brutschrank	Heraeus
Brutschrank eukaryotische Zellkultur	Binder
CFX96 Real-Time System C1000	Bio-Rad
Coulter Counter Z2	Beckmann Coulter
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
FACScalibur E3476	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse TS100
Gel-Gießstände	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich
Inkubationsschüttler C24	New Brunswick Scientific
Mikroskop	ZEISS
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab
Odyssey	LI-COR
PCR-Bank aura	nunc
pH-Meter MP220	Mettler Toledo
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank HERASafe	Heraeus, Kendro
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Ultrazentrifuge Optima L-Look	Beckmann Coulter
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	PolyScience
Zentrifugen 5415D, 5804R und 5810R	Eppendorf

3.1.12 Software zur Auswertung

Tabelle 12: Software

Software	Entwickler
CellQuest Pro	BD Biosciences
CFX Maestro	Bio-Rad
Image Studio Lite	LI-COR
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific

3.2 Methoden der Zellkultur

3.2.1 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Institutes zur Verfügung gestellt. Dank der Kryokonservierung ist es möglich nicht verwendete Zelllinien für sehr lange Zeiträume wegzufrieren ohne dass diese absterben oder ihre Funktion verlieren. Im Rahmen dieses Projektes wurden zwei verschiedene Zelllinien, HEK293T- und CrFK-Zellen, verwendet und demnach zu Beginn der Arbeit aufgetaut. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellsuspensionen wurden zum Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt und anschließend in etwas DMEMc gegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen von dem Einfriermedium zu trennen. Das Medium wurde schließlich entfernt und die Zellen in 10 ml frischem DMEM gelöst und im Brutschrank kultiviert.

Die verwendeten Zelllinien wurden in DMEMc in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Um die Zellen nicht zu dicht anwachsen zu lassen und das Absterben zu verhindern, wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage, beziehungsweise bei einer Konfluenz von etwa 80-90%, vereinzelt und verdünnt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen sind adhärent wachsende Zellen, was es nötig macht, die Adhäsionsproteine zunächst zu lösen, bevor die Zellen vereinzelt und verdünnt werden können. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend kurz für etwa drei bis fünf Minuten mit 2 ml Trypsin bei 37°C inkubiert, um die Zellen von dem Gefäßboden zu lösen. Zur Vereinzelung der Zellen wurde das Zellkulturgefäß mit 8 ml Medium gespült und durch mehrfaches Pipettieren die Zellen schließlich vereinzelt, anschließend wurde etwa ein Zehntel der Zellsuspension mit etwa 20 ml frischem Medium verdünnt.

Nach Beendigung des Projektes wurden die nicht mehr verwendeten Zellen weggefroren. Die Zellen wurden dazu zunächst wie bei der Kultivierung vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und bei 500 x g zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in FBS mit 10% DMSO gelöst, wobei das Volumen so gewählt wurde, dass eine Zellmenge von einer Million Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend in 1 ml-Aliquots in Kryoröhrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefülltem Gefäß bei -80°C über Nacht eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank überführt und dort gelagert.

3.2.2 Zählung und Aussäen von Zellen

Für Experimente mit eukaryotischen Zellen ist es meist nötig eine gewisse Anzahl an Zellen in einer Zellkulturplatte auszusäen. Um die richtige Dichte an Zellen zu bekommen, müssen die Zellen zunächst gezählt werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und vereinzelt. Für die Zählung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 ml Isoton verdünnt und mithilfe des automatischen Zellzählers „Coulter Counter Z2“ gezählt. Die Zellen wurden anschließend auf die gewünschte Dichte mit Medium verdünnt und die gewünschte Zellmenge in Testplatten ausgesät. In 6-Well-Platten wurden pro Well 2 ml der Zellsuspension eingesetzt, für die 10 cm Schalen wurde ein Volumen von 20 ml eingesetzt.

3.2.3 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von fremdem genetischem Material in eukaryotische Zellen. Es gibt verschiedene Transfektionsmethoden, die jeweils verschiedene Ansätze verfolgen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zum Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen verwendet.

3.2.3.1 Transfektion mit Polyethylenimin

Polyethylenimin, kurz PEI, ist ein kationisches Polymer, welches durch die Polymerisation des Ethylenimin entsteht. PEI besitzt aufgrund der vielen enthaltenen Aminosäuren eine starke positive Ladung an der Oberfläche und ist aufgrund dieser Eigenschaft in der Lage große Mengen an negativ geladenen Molekülen, wie etwa DNA, zu binden (Bieber et al., 2002). Die Fähigkeit, dass das PEI in der Lage ist DNA zu komplexieren, kann genutzt werden, um Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Die Plasmid-DNA wird dazu mit dem PEI inkubiert, damit sich die DNA-PEI-Komplexe bilden können. Diese Komplexe werden anschließend durch Endozytose von den zu transfizierenden Zellen aufgenommen und die DNA gelangt so in das Zytoplasma und schließlich in den Zellkern (Longo et al., 2013).

Für die Transfektion mit PEI wurden am Tag vor der Transfektion 6-Well-Platten mit den zu transfizierenden Zellen ausgesät. Die Zellen wurden gezählt, auf $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml verdünnt und ausgesät. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Bei Erreichen der nötigen Konfluenz der Zellen von etwa 70% wurden die Zellen transfiziert. Die Menge von DNA zu PEI sollte im Verhältnis von 1:3 eingesetzt werden, so wurden für die Transfektion von einem Well 3 µg Plasmid-DNA und 9 µg PEI in 200 µl DMEM gelöst und für 15 Minuten inkubiert. Falls nicht anders erwähnt, wurden für die Transfektionen mit PEI in dieser

Arbeit immer 3 µg Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz verwendet. Von den Zellen wurde das Medium entfernt und 1,8 ml neues Medium zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde anschließend auf die Zellen getropft und je nach Experiment für mindestens eine und bis zu sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert.

3.2.3.2 Transfektion mit Lipofectamine

Die Transfektion mit Lipofectamine erfolgte mit dem Kit von Thermo Fisher. Das Prinzip beruht darauf, dass Lipofectamine aus kationischem Liposomen besteht, welche in der Lage sind die negativ geladene DNA zu komplexieren. Ein ebenfalls im Kit enthaltenes neutrales Helfer-Lipid wird anschließend dazugegeben, wodurch der Komplex von der Zielzelle aufgenommen werden kann.

Für die Transfektion mit Lipofectamine wurde eine 6-Well-Platte mit $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 70% transfiziert. Pro Well wurden 5,5 µl Lipofectamine 3000 Reagent und 2,5 µg DNA jeweils in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen mit 125 µl DMEM verdünnt. Zu dem DNA-Ansatz wurden 5 µl des P3000 Reagent zugegeben. Die verdünnte DNA wurde schließlich in das Reaktionsgefäß mit dem Lipofectamine 3000 Reagent gegeben, gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Medium der Zellen gewechselt. Der Transfektionsansatz wurde schließlich auf die Zellen getropft und diese für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.3.3 Transfektion mit Calciumphosphat

Bei dieser Methode werden Calciumchlorid und Natriumphosphat zusammengegeben, wodurch Calciumphosphat ausfällt. Die DNA bindet an diese Präzipitate, welche im Anschluss von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden.

Am Tag vor der Transfektion wurde eine 6-Well-Platte mit $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 70%. Für den Transfektionsansatz wurden 2,5 µg der Plasmid-DNA in 45 µl destilliertem Wasser verdünnt. Zu der DNA wurden anschließend 5 µl einer 2,5-molaren Calciumchlorid-Lösung gegeben und der Ansatz gemischt. Unter ständigem Schütteln auf einem Vortex wurden dem Ansatz 50 µl einer 2x HBS-Lösung zugegeben. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten wurde das Medium der Zellen

gewechselt und der Transfektionsansatz schließlich auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.4 Ernte der Transfektionen

Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und bei 500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellreste zu entfernen. Der zellfreie Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 3-4 Stunden bei 15000 rpm (Tischzentrifuge Mikro 200R) und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand angekippt und das aufkonzentrierte Pellet in 100 µl PBS gelöst. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Die verbliebenen Zellen wurden mit einem Milliliter PBS gewaschen und mit 200 µl NP40complete-Lysepuffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Platte gelöst, resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. Zur Lyse wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 15000 rpm (Tischzentrifuge Mikro 200R) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, welcher das Zelllysate enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse eingefroren.

3.2.5 Virusproduktion

Für die Durchführung von Infektions-Experimenten wurden zunächst Viren produziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur mit einem Virus gearbeitet, dem HERV-K_{con}, welches in der Lage ist Zellen zu infizieren und die virale DNA in das Zellgenom einzubauen, jedoch werden keine neuen infektiösen Partikel gebildet. Das Genom des produzierten Virus ist in Abbildung 7 dargestellt. Um die infektiösen Viruspartikel zu erhalten, müssen verschiedene Plasmide kotransfiziert werden. Das conGFP liefert das virale Genom, welches unter anderem ein GFP enthält, das als Reportergen genutzt werden kann, um den Einbau in das Zellgenom nachzuweisen. Die Strukturproteine, sowie die benötigten Enzyme werden durch das conGPP produziert. Damit das Virus an die Zielzelle binden kann wird außerdem ein Hüllprotein benötigt, wobei hier das Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus (VSV-G) verwendet wurde. Zusätzlich zu den drei genannten Plasmiden wurde noch HIV-Rev kontransfiziert, es sorgt nach der Expression dafür, dass alle Transkripte vom Zellkern in das Cytoplasma transportiert werden können.

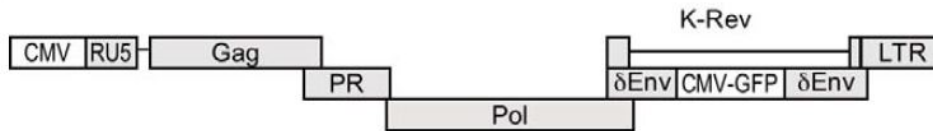


Abbildung 7: Genom des produzierten HERV-K_{con}. Übernommen aus Lee und Bieniasz, 2007

Für die Produktion der Viren wurden 12 Zellkulturschalen mit etwa $4 \cdot 10^5$ 293T-Zellen pro Milliliter ausgesät, wobei das Gesamtvolumen 20 ml umfasste. Bei einer Konfluenz von etwa 70% wurden die Zellen mit den Plasmiden transfiziert, die verwendeten Plasmide und ihre Konzentration sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Plasmide für die Transfektion einer Schale wurden in 2 ml DMEM gelöst und mit 36 μ l PEI für 15 Minuten inkubiert. Von den Zellen wurde das Medium abgenommen und 16 ml neues Medium dazugegeben. Der Transfektionsansatz wurde anschließend auf die Zellen getropft und diese im Brutschrank für insgesamt 48 Stunden inkubiert. Nach 6 Stunden wurde das Medium einmal gewechselt. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand steril filtriert, wobei der Überstand von zwei Schalen vereint wurde. Von einer 20-prozentigen Sucrose-Lösung wurden 5 ml in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und der filtrierte Überstand vorsichtig daraufgegeben, ohne dass dieser sich mit der Sucrose vermischte. Die Überstände wurden schließlich in der Ultrazentrifuge bei 31000 rpm und 4°C für 3 Stunden zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in 1,5 ml DMEMc gelöst. Die produzierten Viren wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 13: Konzentration der Plasmide für die Virusproduktion

Plasmid	c (μ g)
conGFP	6
conGPP	3,6
VSV-G	1,2
Rev	1,2

3.2.6 Infektion

Für die Infektion wurden entweder 293T-Zellen oder CrFK-Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Für beide Zelllinien wurde eine Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter gewählt und 2 Milliliter der Zellsuspension pro Well ausgesät. Für die Infektion wurde das HERV-K_{con}-Virus verwendet, welches im Rahmen dieser Arbeit produziert wurde. Um die Wirkung von IFI16 zu untersuchen, mussten die Zellen zunächst mit dem IFI16-Plasmid transfiziert werden. Bei einer Konfluenz von etwa 70% wurden die Zellen entweder mit dem IFI16-Expressionsplasmid oder

dem Kontrollplasmid MB3 transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit PEI und es wurden 3 µg Plasmid-DNA für jedes Well verwendet. Nach etwa 6 Stunden wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen schließlich infiziert. Für die Infektion eines Wells wurden 400 µl des HERV-K_{con} in 600 µl DMEMc gelöst und dem Ansatz 8 µl Polybrene zugegeben. Von den transfizierten Zellen wurde das Medium abgenommen und der Virusansatz vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Infektion der Zellen erfolgte über Nacht im Brutschrank. Nach 24 Stunden wurde das Medium der Zellen gewechselt und diese für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Zwei Tage nach der Infektion wurde zunächst das Fluoreszenzsignal des GFP unter dem Mikroskop betrachtet und mithilfe einer Kamera aufgezeichnet. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Für jeden Ansatz gab es mindestens Duplikate so konnten jeweils Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer (FACS) und Zellen für die Präparation von Lysaten verwendet werden. Um die Zellen im FACS zu messen wurden sie zunächst mit 400 µl Trypsin gelöst und kurz inkubiert. Die Reaktion wurde mit etwas Medium abgestoppt und die Zellen vom Gefäßboden gespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen vom Trypsin und dem Medium zu befreien wurden sie anschließend für 10 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen, wobei sie in einem Milliliter PBS gelöst, zentrifugiert und der Überstand entfernt wurde. Nach dem Waschen wurden die Zellen zur Fixierung in 2% PFA aufgenommen und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert. Die übrigen Zellen wurden wie in 3.2.4 beschrieben lysiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Transformation

Als Transformation wird das Einbringen von DNA in kompetente Bakterien bezeichnet. Für die Transformation wurde 1 µg Plasmid-DNA zu 50 µl chemisch kompetenter Bakterienzellen gegeben und diese für 30 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend wurde der Ansatz für 45 Sekunden bei 42°C in einen Heizblock gestellt. Der sogenannte Hitzeschock erzeugt Poren in der Bakterienmembran, wodurch die Plasmid-DNA aufgenommen werden kann. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen kurz auf Eis gestellt und darauffolgend bei Raumtemperatur 250 µl S.O.C.-Medium dazugegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert und schließlich auf einer Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatte enthielt zusätzlich ein

Antibiotikum, welches je nach der Resistenz des verwendeten Plasmids ausgewählt wurde. Die Plasmide in dieser Arbeit enthielten alle entweder ein Ampicillin- oder eine Kanamycin-Resistenzgen. Die Platte wurde über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.3.2 Plasmidpräparation

Von der Platte, auf welcher über Nacht transformierte Bakterien angewachsen sind, wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie gepickt, in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin oder Kanamycin gegeben (je nach Resistenz der Plasmid-DNA) und für zwei Stunden bei 37°C und 170 rpm geschüttelt. Die sogenannte Starterkultur wurde anschließend in 250 ml vorgewärmtes LB-Medium mit Ampicillin oder Kanamycin gegeben und bei 37°C und 180 rpm über Nacht geschüttelt. Um nicht für jede Plasmidpräparation eine Transformation durchführen zu müssen, wurde von der Bakteriensuspension ein Glycerol-Stock angefertigt. Dazu wurden 500 µl Glycerol in ein Kryoröhrchen gegeben und 500 µl der über Nacht inkubierten Bakterienkultur dazugegeben. Die Glycerolstocks wurden bei -80°C gelagert. Die restliche Bakterienkultur wurde für 15 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Der Überstand wurde entfernt und die Bakterien in 10 ml Puffer P1 des Plasmid Maxi Kits von Qiagen gelöst. Die Plasmidpräparation erfolgte schließlich exakt nach dem Protokoll des Qiagen Plasmid Maxi Kits.

War ein Glycerol-Stock des gewünschten Plasmids vorhanden, so wurde etwas von diesem in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin oder Kanamycin gelöst und für 2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Dieser Ansatz wurde dann als Starterkultur genutzt.

3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Nach einer neuen Präparation von Plasmiden ist es notwendig die Konzentration der enthaltenen DNA zu messen, um in anschließenden Experimenten die richtige Konzentration einzusetzen. Die Messung der DNA-Konzentration wurde mithilfe des NanoDrop 1000 durchgeführt, wobei 1 µl der gelösten Plasmid-DNA auf den Messplatz aufgetragen wurde. Das Spektrophotometer misst die Absorption der extrahierten DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Aus der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet die Software des NanoDrop 1000 die Konzentration der DNA nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm gibt außerdem die Reinheit der Probe an.

3.3.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die bestimmte Basensequenzen einer DNA erkennen können und in der Lage sind die DNA an eben dieser Position zu schneiden. Mithilfe von Restriktionsenzymen können Plasmide mit bekannter Basensequenz spezifisch an einer oder mehreren Stellen geschnitten werden und somit Fragmente verschiedener Größe erzeugt werden. Die in dieser Arbeit präparierten Plasmide wurden mithilfe von Restriktionsenzymen verdaut, um diese anhand ihrer spezifischen Schnittstellen zu identifizieren und mit anderen Plasmiden zu vergleichen. Es wurde für alle Restriktionsverdau die gleiche Menge an DNA, Enzymen und Puffern verwendet (Tabelle 14), wobei die von den Herstellern der Enzyme empfohlenen Puffer verwendet wurden und der Ansatz mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l ergänzt wurde. Der Verdau erfolgte jeweils bei 37°C für 45 Minuten.

Tabelle 14: Ansatz für einen Restriktionsverdau

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	1 μ g
Enzym	0,5 μ l
Puffer	1,5 μ l

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an den Restriktionsverdau der Plasmid-DNA wurden die erzeugten DNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Methodik beruht darauf, dass die negativ geladenen Nukleinsäuren bei Anlegen eines elektrischen Feldes durch das Agarose-Gel zum Pluspol wandern. Größere Fragmente wandern hierbei langsamer als kleine Fragmente und somit ist eine Separation der Fragmente möglich. Für diese Arbeit wurden je nach der Größe der erwarteten Fragmente verschieden-prozentige Gele gegossen. Für die Herstellung des Gels wurden je nach gewünschter Porengröße 0,8 - 2% Agarose in 50-100 ml TAE-Puffer gegeben und durch Erwärmen wurde die Agarose gelöst. Anschließend wurden 2 μ l Ethidiumbromid dazugegeben, um die DNA anzufärben und so im Gel sichtbar zu machen. Das Gel wurde schließlich in den Gießstand gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Taschen eingesteckt. Nachdem das Gel ausgehärtet ist, wurden die Ansätze mit den verdauten Plasmiden mit 2 μ l 6x DNA-Loading-Dye versetzt und anschließend in die Taschen des Gels gegeben. Es wurde neben den Proben ebenfalls ein DNA-Größenstandard auf das Gel aufgetragen, um die Größe der Fragmente zu identifizieren. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-

90 Volt für 60 Minuten. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt, womit die DNA-Banden sichtbar gemacht und fotografiert wurden. Die neu präparierten Plasmide wurden jeweils mit den alten Plasmiden verglichen, um zu überprüfen, ob die Präparation des gewünschten Plasmides erfolgreich war. Die Größe der DNA-Fragmente gibt ebenfalls Aufschluss, ob die Proben das richtige Plasmid enthalten. Die Gelbilder zur Verifizierung der präparierten Plasmide sind im Anhang (A1-A4) einzusehen.

3.3.6 PERT-Assay zur Bestimmung der RT-Aktivität

Der PERT-Assay ist ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass die reverse Transkriptase ein RNA-Template in cDNA umschreibt und die Menge der cDNA anschließend durch eine qPCR-Reaktion quantifiziert wird. Nachdem die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, binden spezifische Primer an die cDNA wodurch diese amplifiziert wird (Abbildung 8). Durch eine Farbstoff-markierte Sonde, kann die Menge an cDNA gemessen werden, wobei die Menge an cDNA proportional zur Aktivität der reversen Transkriptase ist. (Vermeire et al., 2012; Sastry et al., 2005)

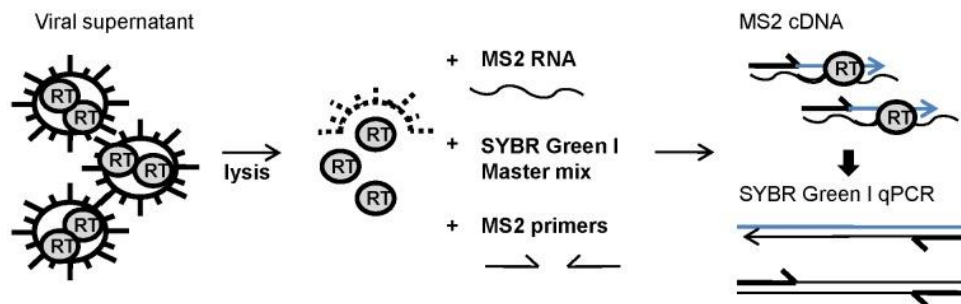


Abbildung 8: Prinzip des PERT-Assays. Die Abbildung zeigt die Methodik mit SYBR Green. In dieser Arbeit wurde die Sonde MS2-PERT_Horie-Probe (FAM) anstatt des SYBR Greens verwendet. Übernommen aus Vermeire et al., 2012.

Für die Analyse im PERT-Assay wurden die Zellüberstände verwendet, die nach der Transfektion geerntet und konzentriert wurden. Zunächst wurde der Master-Mix pipettiert und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert. Die Reagenzien des Master Mix wurden zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert. Die verwendeten Reagenzien und die entsprechenden Mengen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Master Mix für den PERT-Assay

Reagenz	Konzentration	Volumen für eine Reaktion (µl)	Volumen für eine Platte (µl)
SensiFAST Probe No-ROX Mix	2x	8	840
Reference Dye ROX	2 µM	0,3	31,5
Rnase Out 1:10	4 U/µl	0,1	10,5
Horie2010_PERT-F	10 µM	1	105
Horie2010_PERT-R	10 µM	1	105
MS2-PERT_Horie-Probe (FAM)	10 µM	0,5	52,5
MS2 RNA Template	8 µg/µl	0,1	10,5

Für die Lyse der Viruspartikel wurde RNase Out 1:50 in Virus-Lysepuffer verdünnt und 5 µl in die genutzten Wells einer 96-Well-PCR-Platte gegeben. Zu dem Lysepuffer wurden je 5 µl der konzentrierten Zellüberstände gegeben, wobei jeder Überstand in zwei Wells pipettiert wurde. Neben den Proben wurden außerdem PBS als Negativkontrolle und eine Standardreihe in die Platte pipettiert. Als Standard wurde der HIV-1 RT Standard aus dem HS-Mg RT Activity Kit von Cavidil verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 90 µl destilliertem Wasser abgestoppt. In eine neue, vorgekühlte 96-Well-PCR-Platte wurden pro Well 11 µl des Master Mix gegeben und anschließend 9 µl der lysierten Proben in die Platte mit dem Master Mix gegeben. Die Platte wurde anschließend mit Folie verschlossen und für die qPCR-Reaktion in den CFX96 Real-Time Cycler der Firma Bio-Rad gestellt. Das Protokoll mit den Schritten für die Amplifizierung, die der Real-Time-Cycler ausgeführt hat, ist in Tabelle 16 dargestellt. Zur Auswertung wurde die Software CFX Maestro verwendet.

Tabelle 16: Protokoll für die qPCR-Reaktion im CFX96 Real-Time Cycler.

Schritt	Temperatur	Dauer (min)
1	42°C	20 min
2	95°C	10 min
3	95°C	0:30 min
4	60°C	0:30 min
5	72°C	0:15 min

← 45x

3.3.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich einzelne Zellen zu analysieren. Dabei können die Größe, Form und eventuelle Färbung der Zellen determiniert werden. Einige Modelle können auch zur Sortierung von Zellen verwendet werden, um beispielsweise fluoreszierende Zellen von anderen Zellen zu separieren. Bei der Durchflusszytometrie in einem FACS-Gerät werden Zellen durch eine sehr dünne Kapillare geleitet und somit ist es möglich, dass immer nur eine Zelle zur gleichen Zeit analysiert wird. In einer Messküvette werden die einzelnen Zellen mit einem Laserstrahl beleuchtet, wobei das Licht von der bestrahlten Zelle gestreut wird und eventuell die Emission eines Fluoreszenzsignals angeregt wird. Ein Detektor fängt diese Strahlungen ein und wertet sie aus.

In dieser Arbeit wurde ein GFP-Reportervirus verwendet. Bei Einbau der viralen DNA in die Zielzelle wird ein GFP-Gen exprimiert und bei Bestrahlung der Zelle mit der richtigen Wellenlänge fluoresziert die Zelle grün, wenn ein Einbau stattgefunden hat. Für die Auswertung der Anzahl grün-fluoreszierender Zellen wurde das FACScalibur E3476 von der Firma Becton Dickinson verwendet. Von der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Institutes wurde eine Vorlage zur Messung grüner Fluoreszenz erstellt, welche für die Auswertung verwendet wurde. Zunächst wurden nicht infizierte Zellen im FACS gemessen, um einen Kontrollwert zu erhalten. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal der fixierten Zellen der Infektion mithilfe des FACS gemessen. Zur Auswertung wurde ein Marker gesetzt, welcher nur die fluoreszierenden Zellen eingrenzen sollte. Hierzu wurde die Kontrollprobe verwendet und der Marker so gesetzt, dass möglichst 0% der Zellen in diesem Markerbereich vorhanden sind, denn in der Kontrolle sind keine fluoreszierenden Zellen vorhanden (Abbildung 9). Der Marker wurde in der Region gesetzt, in welchem das Signal des GFP zu erwarten ist, bis zu dem Punkt, an welchem nicht-fluoreszierende Zellen detektiert werden. Der Marker wurde anschließend auf die infizierten Zellen angewendet und so die Anzahl an grün-fluoreszierenden Zellen erhalten.

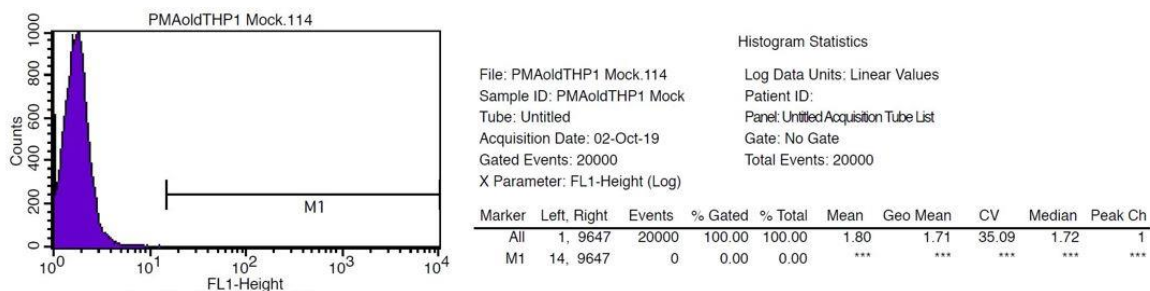


Abbildung 9: Ergebnis der FACS-Messung von 293T Zellen. Zur Auswertung des GFP-Signals wurde in der Kontrolle ein Marker gesetzt, der keine nicht-fluoreszierenden Zellen einschließt und in dem Bereich gesetzt wurde, in welchem das GFP-Signal zu erwarten ist

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine zunächst in einer Gelelektrophorese ihrer Masse nach aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Auf der Membran können die Proteine schließlich mithilfe von Antikörpern detektiert werden.

3.4.1.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen in einem Gel aufgrund ihrer molekularen Masse. Es handelt sich hierbei um eine Gelelektrophorese, bei welcher ein Polyacrylamid-Gel verwendet wird. Ein wichtiger Bestandteil des Gels ist das Natriumdodecylsulfat (SDS) welches die Eigenladung der Proteine überdeckt und ihnen eine konstante negative Ladung verleiht. Die negativ geladenen Proteine wandern entlang des Gels zum Pluspol und trennen sich hierbei gemäß ihrer Masse auf.

Für die SDS-PAGE wurden die Zelllysate verwendet, welche im Zuge der Transfektion und Infektion generiert wurden. Es sollte nachgewiesen werden, dass in den Zellen das IF116 exprimiert wurde. Zunächst wurde das Gel gegossen, welches aus einem Trenngel und einem Sammelgel besteht, die Bestandteile sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die verschiedenen Gele unterscheiden sich in ihrer Porengröße und dem pH-Wert. Im Sammelgel werden die Proteine zunächst konzentriert und im Trenngel schließlich nach ihrer Masse aufgetrennt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele, Ansatz für ein Gel

Reagenz	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Destilliertes Wasser	4,1 ml	2,9 ml
30% Acrylamid	3,3 ml	850 µl
Tris-Puffer 1,5 M	2,5 ml	nur im Trenngel
Tris-Puffer 0,5 M	nur im Sammelgel	1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
10% APS	50 µl	25 µl
Temed	5 µl	5 µl

Für die Herstellung des Gels wurde ein Gießstand verwendet, in dem die Glasplatten befestigt werden, zwischen welche das Gel gegossen wird. Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels zusammengegeben und gemischt, wobei das APS und Temed als letzte Komponente hinzugegeben werden sollten, da sie die Polymerisierungsreaktion starten. Das Gemisch wurde anschließend zügig zwischen die Glasplatten gegossen bis etwa dreiviertel gefüllt waren und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Gels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel hergestellt und auf das Trenngel gegossen. Um Taschen für die Auftragung der Proteine zu generieren, wurde ein Kamm oben in das Sammelgel gesteckt.

Die Proben wurden zunächst denaturiert, wozu 20 µl der Zelllysate mit 4 µl 6x Laemmli-Puffer gemischt wurden und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert wurden. Der Laemmli-Puffer enthält ebenfalls SDS, was die Eigenladungen der Proteine überdecken soll. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Um die Größe der Proteine auswerten zu können wurde außerdem neben den Proben ein Größenstandard, der PageRuler-Protein Standard, mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 Volt für 100 Minuten, wobei die Kammer mit Laufpuffer befüllt wurde.

3.4.1.2 Semi-Dry-Blot

Der sogenannte Semi-Dry-Blot ist eine Methode, um Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von einem Gel auf eine Membran zu transferieren. In dieser Arbeit wurde die Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio-Rad verwendet.

Es wurde eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Die Membran wurde vor dem Blot kurz in Transferpuffer inkubiert. Nach der SDS-Page wurde das Gel ebenfalls kurz in Transferpuffer geschwenkt. Auf die Blotapparatur wurde zunächst ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt, worauf anschließend die Membran platziert wurde. Auf die Membran wurden das Gel und abschließend wieder ein getränktes Filterpapier geschichtet. Der Blot erfolgte bei 20 Volt für eine Stunde.

3.4.1.3 Antikörperfärbung

Um die gewünschten Proteine, welche auf die Membran übertragen wurden zu detektieren, wurden sie spezifisch durch Antikörper gebunden. In dieser Arbeit sollte das IFI16 nachgewiesen werden. Es wurde ein Antikörper der Firma Santa Cruz verwendet, welcher das IFI16 direkt bindet. Nach dem Blot wurde die Membran zunächst für 90 Minuten in 5% Milchpuffer geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem IFI16-Antikörper inkubiert, welcher 1:500 in 5% Milchpuffer verdünnt wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit PBS-T gewaschen und für 90 Minuten mit dem sekundären Antikörper, welcher 1:3000 in 5% Milchpuffer verdünnt wurde, inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde der fluoreszenzmarkierte Antikörper IRDye 680LT verwendet, welcher ein Maus-Antikörper ist. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde der Odyssey-Imager von der Firma LI-COR verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Restriktion von oriST-HERV-K113 durch IFI16

Um die Wirkung des IFI16 auf das humane endogene Retrovirus zu untersuchen, wurden gleichzeitig Expressionsplasmide für das IFI16 und das oriST-HERV-K113 in 293T-Zellen transfiziert. Das Plasmid zur Expression des IFI16 enthält die Sequenz zur Produktion des Vollängenproteins und einen C-terminalen HA-Tag, außerdem enthält es eine IRES- und eine BFP-Sequenz. Zur Verfügung gestellt wurde das Plasmid vom Institut für molekulare Virologie des Universitätsklinikum Ulm. Zur Expression des rekonstituierten Molekularklons des HERV-K113 wurde die Sequenz in ein pBSK-Plasmid kloniert, wobei alle nötigen genetischen Informationen enthalten sind. Das Plasmid enthält demnach die LTR's sowie die codierenden Sequenzen für Gag, Pro, Pol, Env und Rec. Die Rekonstitution des Molekularklons erfolgte durch die Arbeitsgruppe des Robert Koch-Institutes und demnach wurde das Plasmid auch von dieser zur Verfügung gestellt (Lausch, 2013). Zusätzlich zum Molekularklon wurde außerdem das Protein Staufen-Flag kotransfiziert, da es nachweislich die Partikelproduktion erhöht. Als Kontrolle wurde der Molekularklon außerdem mit einem Leervektor (MB3) anstatt des IFI16 transfiziert. Dieser ist bis auf die codierende Sequenz analog zum IFI16-Plasmid und wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe aus Ulm zur Verfügung gestellt.

Die Transfektion der Plasmide erfolgte mittels PEI, wobei die 293T-Zellen 6 Stunden mit den Plasmiden inkubiert wurden und 48 Stunden nach der Transfektion der Überstand entnommen wurde. Die Konzentration der Plasmid DNA kann Tabelle 18 entnommen werden. Die Zellüberstände wurden aufkonzentriert und die RT-Aktivität in einem PERT-Assay gemessen.

Tabelle 18: Verwendete Plasmid-DNA-Konzentrationen für die Kotransfektion von 293T-Zellen mit oriST-HERV-K113 und IFI16

Plasmid	Konzentration (μg)
IFI16 (MB5) / Kontrolle (MB3)	3
oriST-HERV-K113	2,4
Staufen-Flag	0,6

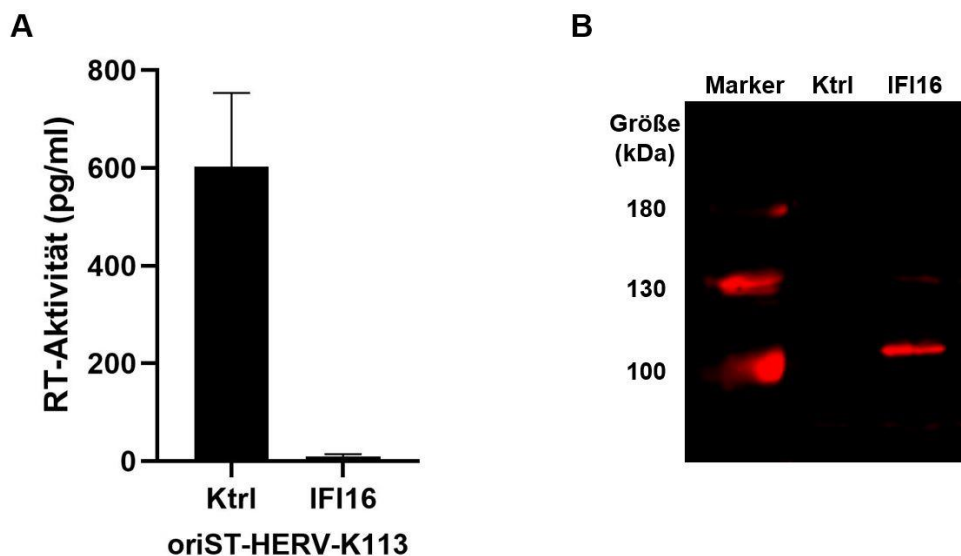


Abbildung 10: Ergebnis der Transfektion. 293T-Zellen wurden mit IFI16 und oriST-HERV-K113 kotransfiziert (A) Gemessene RT-Aktivität in den aufkonzentrierten Überständen. (B) Western-Blot zur Visualisierung des IFI16. Die 293T-Zellen wurden nach der Transfektion lysiert und anschließend das IFI16 in einem Western Blot mit Antikörpern gebunden und visualisiert. Primärer Antikörper: IFI16-Antikörper (sc-8023), sekundärer Antikörper: Anti-Maus IRDye®680LT. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder

Wie in Abbildung 10A ersichtlich wird, konnte mittels des PERT-Assay gezeigt werden, dass die Aktivität der reversen Transkriptase und somit die virale Partikelproduktion für das IFI16 in etwa 67-fach geringer ist als für die Kontrolle. Demnach lässt sich aussagen, dass das IFI16 in der Lage ist die virale Partikelproduktion von HERV zu inhibieren. Um das Ergebnis validieren zu können, wurden die Zellen nach Abnahme des Überstandes lysiert und in einem Western Blot auf das Vorhandensein des IFI16 analysiert. Das IFI16 hat eine Größe von etwa 85-95 kDa und es wurde demnach im Western Blot eine Bande auf Höhe der 100 kDa Bande des Markers erwartet. Wie zu erwarten ist auf dieser Höhe für das Zelllysate mit IFI16 eine Bande zu sehen (Abbildung 10B), für die Kontrolle hingegen ist keine Bande erkennbar. Die Bande, welche das angefärbte IFI16 zeigt, befindet sich etwas oberhalb des 100 kDa-Markers, was sich vermutlich dadurch erklären lässt, dass sich am C-terminalen Ende des Proteins noch ein HA-Tag und ein BFP befinden. Durch den Western Blot konnte bestätigt werden, dass die Transfektion von IFI16 erfolgreich war und das Protein exprimiert wurde, demnach konnten die Ergebnisse des PERT-Assays validiert werden, wonach IFI16 die virale Partikelproduktion von HERV inhibiert.

4.2 Bedeutung der viralen LTR für die Hemmung durch IFI16

Hotter et al. publizierten im Juni 2019 Ergebnisse, wonach HIV-1 durch IFI16 gehemmt wird, wenn es die originale LTR enthält, jedoch nicht, wenn Konstrukte verwendet werden, die einen CMV-Promotor enthalten. HERV gehören wie auch HIV-1 zu den Retroviren und daher liegt die Vermutung nahe, dass die Ergebnisse auch auf HERV übertragbar sind. Für die Untersuchung,

ob IFI16 in der Lage ist die virale Partikelproduktion zu reduzieren, wenn der Molekularklon einen CMV-Promotor enthält, wurde das entsprechende Konstrukt zusammen mit dem IFI16-Plasmid in 293T-Zellen transfiziert. Das verwendete Plasmid, CMV-oriST-HERV-K113, unterscheidet sich von dem oriST-HERV-K113 lediglich durch das Fehlen der U3 Region der LTR und dem Vorhandensein eines CMV-Promotors anstatt dessen. Die Transfektion der Plasmide erfolgte analog zum Experiment mit oriST-HERV-K113, sowie auch die Ernte der Überstände und die Präparation der Zelllysate. Die konzentrierten Überstände wurden ebenfalls mithilfe eines PERT-Assays analysiert.

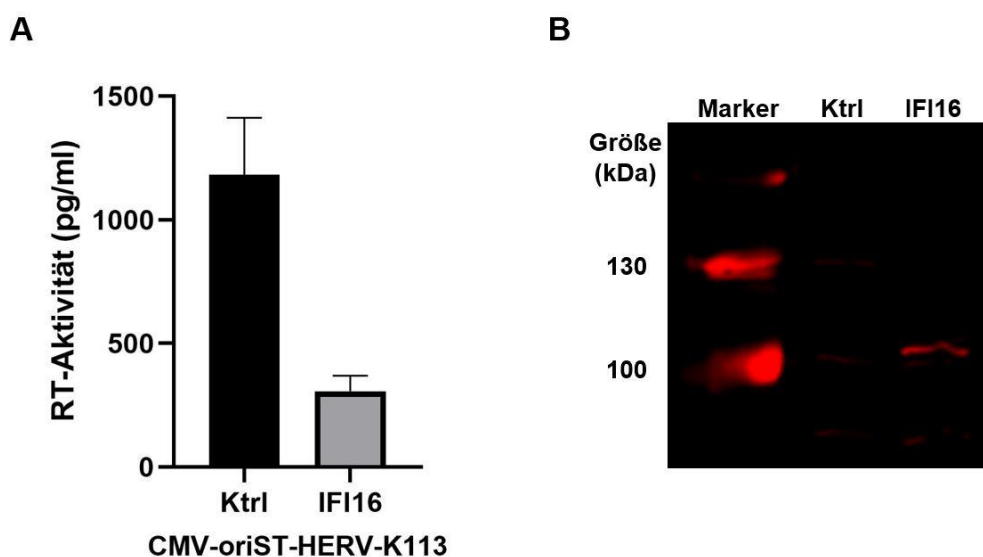


Abbildung 11: Ergebnis der Transfektion. 293T-Zellen wurden mit CMV-oriST-HERV-K113 und IFI16/Ktrl kotransfiziert (A) Aktivität der reversen Transkriptase in den konzentrierten Zellüberständen. Die Zellüberstände wurden aufkonzentriert und in einem PERT-Assay die Aktivität der RT gemessen. (B) Western-Blot zur Visualisierung des IFI16. Die 293T-Zellen wurden nach der Transfektion lysiert und anschließend das IFI16 in einem Western Blot mit Antikörpern gebunden und visualisiert. Primärer Antikörper: IFI16-Antikörper (sc-8023), sekundärer Antikörper: Anti-Maus IRDye@680LT. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder

Die im PERT-Assay gemessene Aktivität der reversen Transkriptase war für die Kontrolle nur etwa viermal so hoch, wie der Wert für die Überstände der mit IFI16 transfizierten Zellen (Abbildung 11A). Die 4-fache Reduktion durch IFI16 ist zwar nicht annähernd so deutlich wie die des oriST-HERV-K113, dennoch ist eine leichte Reduktion der Partikelproduktion auch für das CMV-Konstrukt erkennbar. Es kann geschlussfolgert werden, dass das IFI16 die virale Partikelproduktion von HERV deutlich weniger stark reduziert, wenn das in die Zelle eingebrachte Konstrukt einen CMV-Promotor anstelle der U3 enthält. Das Ergebnis suggeriert, dass die hemmende Wirkung des IFI16 auf HERV abhängig ist von der LTR, insbesondere der U3-Region. Im Western Blot (Abbildung 11B) konnte bestätigt werden, dass die transfizierten Zellen das IFI16 produziert haben.

4.3 Wirkung des IFI16 auf CMV-JSRV und CMV-MMTV

Neben dem Moleklarklon des HERV sollten weitere Betaretroviren untersucht werden. Die Wirkung von IFI16 auf das Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV) und das Maus-Mammatumovirus (MMTV) sollte untersucht werden. Die Problematik in der Analyse bestand darin, dass sowohl für JSRV als auch MMTV lediglich Konstrukte zur Verfügung standen, welche anstelle der U3-Region einen CMV-Promotor enthalten. Die Plasmide wurden von der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Institutes zur Verfügung gestellt. Trotzdem keine Konstrukte mit der vollständigen LTR vorhanden waren, wurden die CMV-Konstrukte auf eine Hemmung durch IFI16 getestet. Wie in den vorherigen Versuchen, wurden die Plasmide gleichzeitig mit dem IFI16-Plasmid beziehungsweise dem Kontrollplasmid (MB3) transfiziert. Zusätzlich zu diesen Plasmiden wurde für JSRV und MMTV ein VSV-G-Plasmid kotransfiziert (Tabelle 19). VSV-G ist ein Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus (VSV) und liefert die nötigen Hüllproteine für die Viruspartikel.

Tabelle 19: Plasmid-DNA Konzentrationen für die Kotransfektion von 293T-Zellen mit pCMV-JSRV/pCMV-MMTV und IFI16

Plasmid	Konzentration	Plasmid	Konzentration (µg)
IFI16/MB3	3	IFI16/MB3	3
pCMV-JSRV	2,4	pCMV-MMTV	2,4
Staufen-Flag	0,6	Staufen-Flag	0,6
VSV-G	0,4	VSV-G	0,4

Die Transfektion erfolgte mit PEI und die Zellen wurden für sechs Stunden inkubiert. Der Überstand wurde nach 48 Stunden abgenommen und aufkonzentriert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Zelllysate im Western Blot analysiert. Die RT-Aktivität in den konzentrierten Zellüberständen wurde schließlich mittels eines PERT-Assays gemessen. Für die Zellen, welche mit JSRV und IFI16 kotransfiziert wurden, konnte eine Reduktion der viralen Partikelproduktion um weniger als die Hälfte im Gegensatz zur Kontrolle determiniert werden (Abbildung 12A). Das Ergebnis spiegelt demnach die Erwartungen wider, denn da das JSRV-Konstrukt einen CMV-Promotor enthält, wurde keine signifikante Hemmung erwartet. Für MMTV war kaum ein Unterschied zwischen den gemessenen RT-Aktivitäten des IFI16 und der Kontrolle erkennbar, wobei für die Kontrolle eine minimal höhere RT-Aktivität gemessen wurde (Abbildung 12B). Die Werte für das MMTV beliefen sich generell in einem sehr niedrigen Bereich von etwa 5 pg/ml bis 10 pg/ml, was eine Bewertung dieser Ergebnisse erschwert. Es lässt sich dennoch vermuten, dass IFI16 die virale Partikelproduktion von MMTV in Anwesenheit eines CMV-Promotors nicht wesentlich hemmt. Mithilfe des Western-Blots der Zelllysate konnte

bestätigt werden, dass IFI16 in den Zellen enthalten war (Abbildung 12C und D), wobei die Bande für die Lysate der Transfektion mit pCMV-MMTV recht klein ausfiel und nicht wie üblich als klare waagerechte Linie erkennbar ist. Eventuell hat sich das Lysat mit den Proteinen nicht richtig am Sammelgel ansammeln können und ist somit nur als halbe Bande erkennbar.

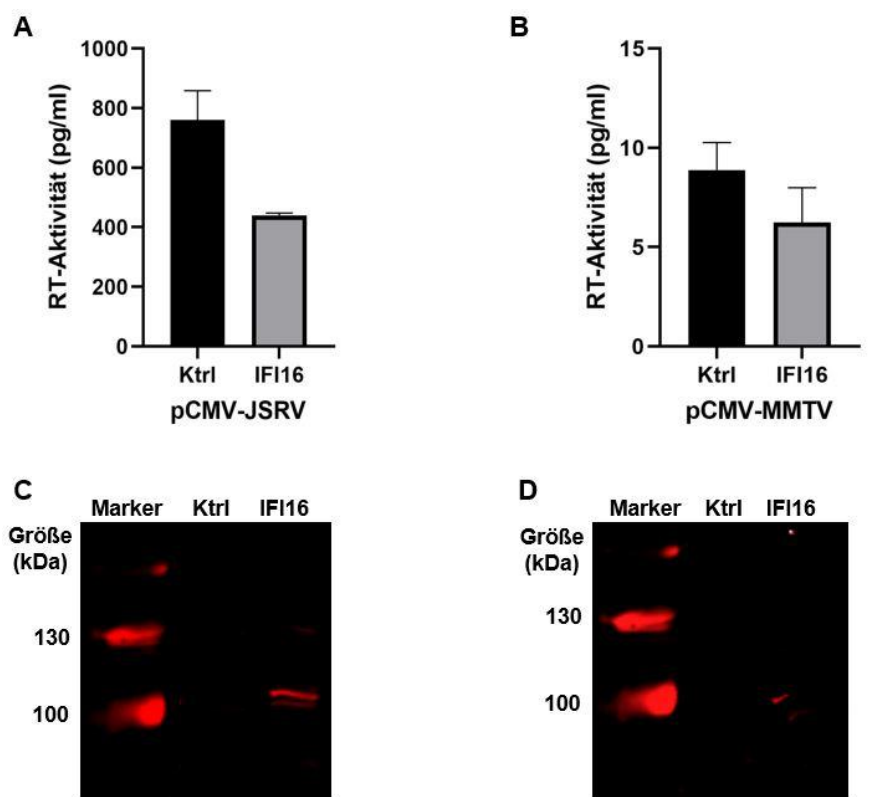


Abbildung 12: Ergebnis der Transfektion von 293T-Zellen mit pCMV-JSRV/pCMV-MMTV und IFI16. (A) RT-Aktivität in den konzentrierten Zellüberständen der Transfektion mit JSRV (B) Ergebnis des PERT für die Transfektion mit pCMV-MMTV (C) Western-Blot der Transfektion mit pCMV-JSRV (primärer AK: anti-IFI16, sekundärer AK: anti-mouse). (D) Western-Blot der Transfektion mit pCMV-MMTV (primärer AK: anti-IFI16, sekundärer AK: anti-mouse).

4.4 Bedeutung der Domänen des IFI16 für die Restriktion des oriST-HERV-K113

Das IFI16 besitzt verschiedene Domänen mit unterschiedlichen Funktionen. Um zu untersuchen, welche Domänen für die Restriktion des humanen endogenen Retrovirus wichtig sind und welche funktionell nicht von Belang sind, wurde einerseits ein Konstrukt verwendet, welches nur die Pyrin-Linker-Domäne enthielt und andererseits ein Konstrukt, in dem die NLS-Sequenz mutiert wurde (Tabelle 20). Die Transfektion der Zellen und die anschließende Analyse erfolgte analog zu den bisherigen Versuchen (4.1-4.3).

Tabelle 20: Plasmid-DNA-Konzentrationen für die Kotransfektion von 293T mit MB20/MB50 und IFI16

Plasmid	Konzentration	Plasmid	Konzentration (μg)
MB20 (Pyrin-Linker)	1	MB50 (NLS Mutante)	3
oriST-HERV-K113	2	oriST-HERV-K113	2,4
Staufen-Flag	0,5	Staufen-Flag	0,5

Die Ergebnisse des PERT-Assays zeigen, dass ein Konstrukt, welches nur die Pyrin-Linker-Domäne des IFI16 enthält, in der Lage ist die virale Partikelproduktion um das 20-fache zu verringern und somit ausreichend ist für die hemmende Wirkung auf das humane endogene Retrovirus. Im Gegensatz dazu ergibt sich für das Konstrukt ohne das Kernlokalisierungssignal eine 3-fache Erhöhung der Partikelproduktion, wonach diese für die Restriktion des Virus essenziell zu sein scheint (Abbildung 13A). Es war zu erwarten, dass bei Verlust des Kernlokalisierungssignals keine Hemmung sichtbar wird, jedoch war es eher nicht zu erwarten, dass die Partikelproduktion dreifach so hoch ist wie die der Kontrolle. Eine dreifache Erhöhung kann jedoch auch auf Abweichungen bei der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein, wie etwa durch den Verlust von Zellen und somit einer unterschiedlichen Zellzahl, und muss daher nicht zwingend für eine erhöhte Partikelproduktion durch die NLS-Mutante sprechen. Im Western Blot (Abbildung 13B) konnte für das Pyrin-Linker-Konstrukt eine Bande bei etwa 25 kDa detektiert werden, was belegt, dass nur ein Teil des Proteins exprimiert wurde. Für die NLS-Mutante sind hingegen zwei Banden zu erkennen, bei etwa 100 kDa und bei etwa 55 kDa. Bei diesem Konstrukt ist lediglich die Kernlokalisierungssequenz mutiert, weshalb es den Erwartungen entspricht eine Bande bei etwa 100 kDa zu sehen, denn in diesem Bereich wurde auch das vollständige Protein detektiert. Die zusätzliche Bande ist vermutlich ein Abbauprodukt des Proteins.

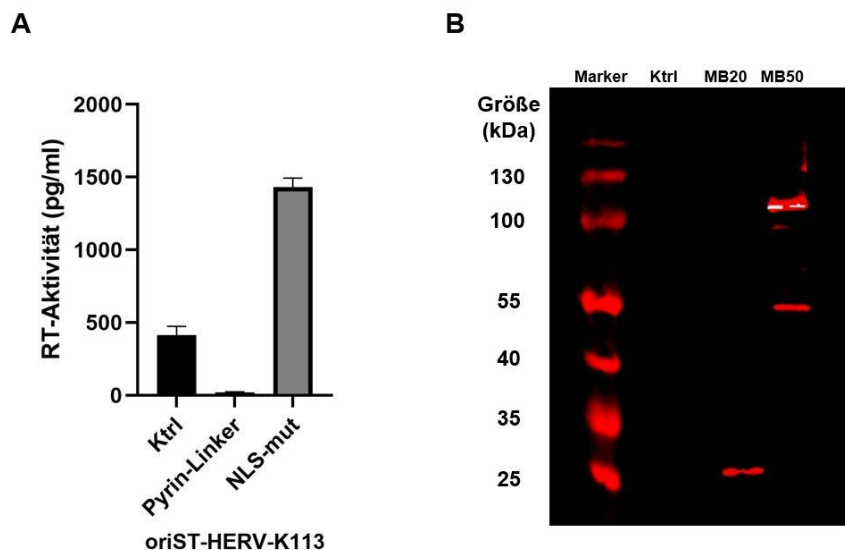


Abbildung 13: Ergebnisse der Kotretransfektion von 293T-Zellen mit oriST-HERV-K113 und MB20/MB50. (A) RT-Aktivität der konzentrierten Zellüberstände. (B) Western Blot der Zellysate. Anfärbung der IFI16-Domänen (primärer AK: anti-IFI16, sekundärer AK: anti-mouse)

4.5 Einfluss des Zeitpunktes der IFI16-Transfektion auf die Hemmung des oriST-HERV-K113

Um genauer zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt des Replikationszyklus das IFI16 seine hemmende Wirkung entfaltet, wurden 293T-Zellen mit oriST-HERV-K113 transfiziert und erst nach verschiedenen Zeitpunkten wurde zusätzlich das IFI16 transfiziert. Zum Vergleich wurden die beiden Plasmide erneut auch zur gleichen Zeit transfiziert. Die Transfektion wurde mit PEI durchgeführt und die Inkubation erfolgte aufgrund der erneuten Transfektion in diesem Experiment nur für eine Stunde. Die Zellüberstände wurden 48 Stunden nach der letzten Transfektion entnommen und die Zellen lysiert. Die konzentrierten Überstände wurden in einem PERT-Assay analysiert. Im Ergebnis des PERT-Assays (Abbildung 14) ist erneut gut zu erkennen, dass bei einer gleichzeitigen Transfektion beider Plasmide eine signifikante Reduktion der viralen Partikelproduktion zu erkennen ist für die Zellen, die mit IFI16 transfiziert wurden. Bei einer späteren Transfektion des IFI16-Plasmides ist schon nach einer Stunde und auch nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Für den Zeitpunkt nach 12 Stunden wurde sogar eine geringere RT-Aktivität für die Kontrolle gemessen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine nachträgliche Zugabe des IFI16 die Zellen nicht mehr „retten“ kann und die virale Partikelproduktion davon nicht beeinflusst wird.

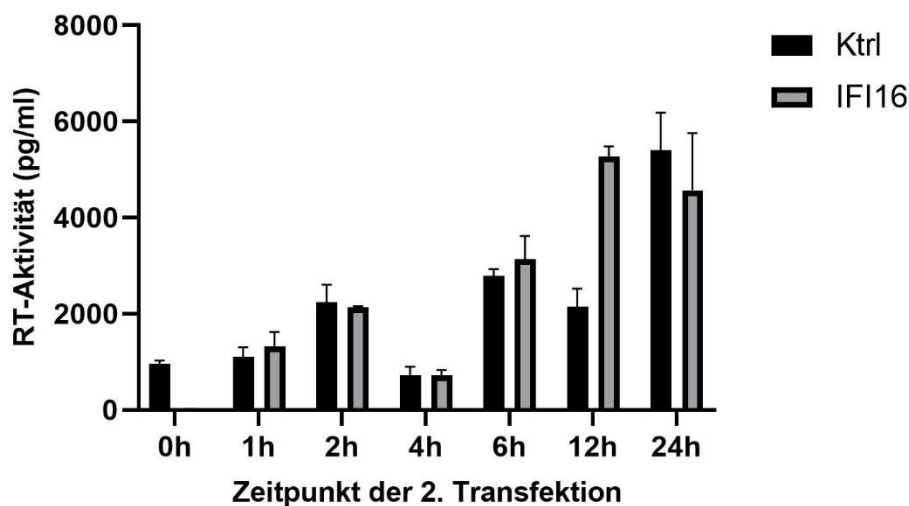


Abbildung 14: RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen. Transfektion von 293T-Zellen mit oriST-HERV-K113 und nach verschiedenen Zeitpunkten mit IFI16. Die Zellkulturüberstände wurden konzentriert und im PERT-Assay gemessen.

Um zu verifizieren, dass es nicht an der Abwesenheit von IFI16 liegt, dass zu späteren Zeitpunkten keine Reduktion durch IFI16 mehr erkennbar ist, wurde ein Western Blot mit den Lysaten der Zellen durchgeführt (Abbildung 15). Für die gleichzeitige Transfektion (0h) ist nur schwer eine kleine Bande zu erkennen. In allen anderen Experimenten, in denen die Plasmide gleichzeitig transfiziert wurden, konnte eine klare Bande detektiert werden, demnach ist davon auszugehen, dass hierbei ein Problem mit der Methodik vorlag oder aufgrund des langen Inkubationszeitraums das Protein zu großen Teilen abgebaut wurde. Für alle anderen Zeitpunkte kann für die Zellen, die mit IFI16 transfiziert wurden, eine klare Bande auf der erwarteten Höhe erkannt werden. Die Signalstärke ist ebenfalls ähnlich, wonach die Ergebnisse des PERT unabhängig von der Expressionsstärke des IFI16 betrachtet werden können.

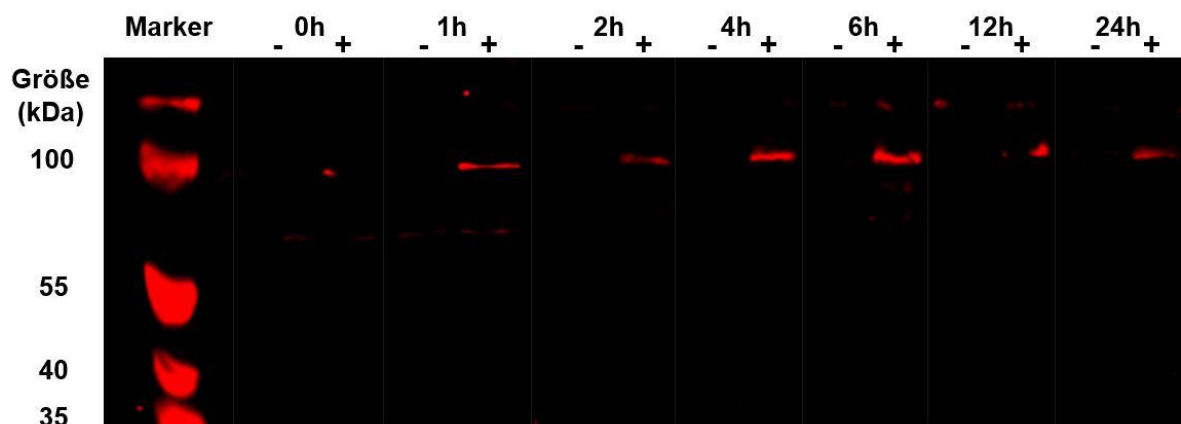


Abbildung 15: Western Blot der Zelllysate. 293T-Zellen wurden mit oriST-HERV-K113 transfiziert und zu späteren Zeitpunkten wurde IFI16 kotransfiziert. Die Zellen wurden 48h nach der letzten Transfektion lysiert. Das - kennzeichnet die Kontrolle, das + steht für die Lysate der Zellen, die mit IFI16 transfiziert wurden.

4.6 Abhängigkeit der Hemmung vom Zeitpunkt der Transfektionen

Um den Einfluss des Transfektionszeitpunktes auf die Hemmung durch IFI16 weiter zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit IFI16 transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen zusätzlich mit oriST-HERV-K113 transfiziert. Die Zellen wurden jeweils für 3 Stunden mit dem Transfektionsansatz inkubiert und 48 Stunden nach der letzten Transfektion geerntet. Es wurde erwartet für alle Zeitpunkte der Transfektion eine signifikante Hemmung der viralen Partikelproduktion zu sehen, da das IFI16 in allen Fällen schon in der Zelle exprimiert werden sollte, wenn das oriST-HERV-K113 transfiziert wurde. Die gemessene Aktivität der Reversen Transkriptase in den konzentrierten Zellüberständen ist in Abbildung 16A aufgeführt. Für die gleichzeitige Transfektion ergibt sich eine etwa 35-fache Hemmung im Gegensatz zur Kontrolle, für die anderen Zeitpunkte ist entgegen der Erwartungen keinerlei Reduktion der viralen Partikelproduktion zu erkennen. Im Western Blot (Abbildung 16B) konnte bestätigt werden, dass zu allen Zeitpunkten IFI16 in der Zelle vorhanden war und demnach kein Indiz dafür gegeben ist, warum es nicht zu einer Hemmung des oriST-HERV-K113 gekommen ist. Es ist außerdem zu erkennen, dass die Partikelproduktion der Kontrolle nach drei Stunden deutlich geringer ist, was jedoch durch einen Verlust einiger Zellen durch die erneute Transfektion erklärt werden könnte.

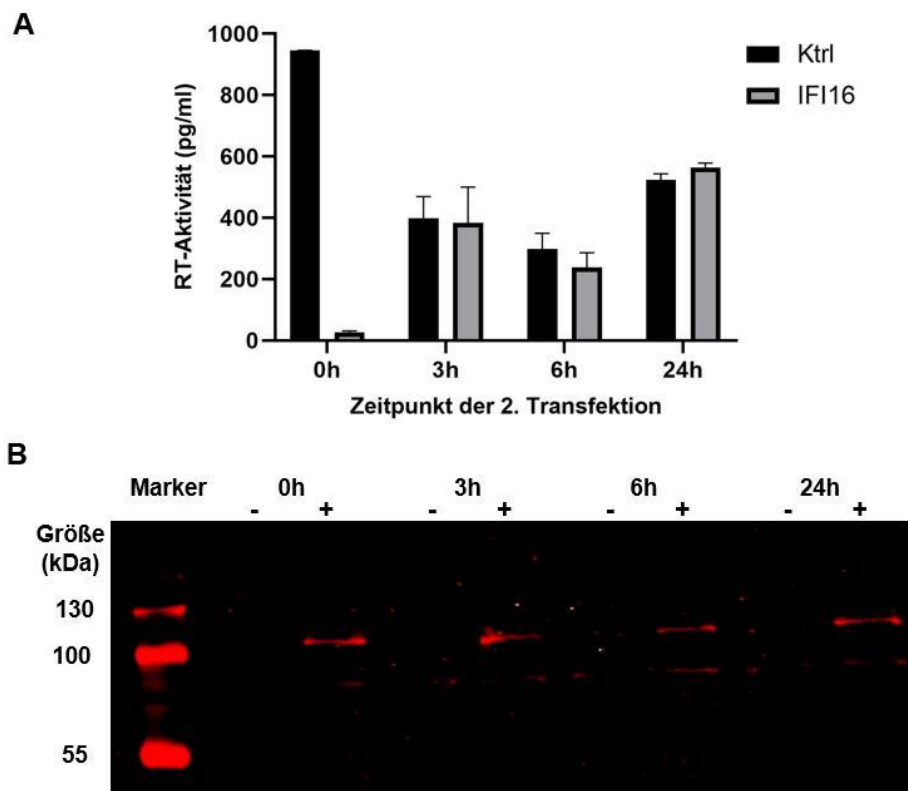


Abbildung 16: Ergebnis der Transfektion. 293T-Zellen wurden mit IFI16 transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit oriST-HERV-K113 kotransfiziert. (A) RT-Aktivität in den konzentrierten Zellüberständen. (B) Western Blot der Zelllysate. Anfärbung des IFI16 mithilfe von Antikörpern. Mit - sind die Zelllysate gekennzeichnet, deren Zellen mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Mit + bezeichnet wurden die Zelllysate der Zellen, welche mit IFI16 transfiziert wurden.

4.7 Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden

Um einen Einfluss der Transfektionsmethode auf die Ergebnisse auszuschließen und zu testen, ob mit anderen Methoden bessere Ergebnisse erzielt werden können, wurden 293T-Zellen sowohl mit PEI als auch mit Lipofectamine und Calciumphosphat transfiziert. Darüber hinaus wurden für die gleichzeitige Transfektion mit PEI zwei separate Transfektionsansätze für die Plasmide verwendet. Es wurden wie in den vorherigen Experimenten 293T-Zellen gleichzeitig mit dem IFI16 und dem oriST-HERV-K113-Plasmid transfiziert. Die Zellüberstände wurden aufkonzentriert und mittels PERT die RT-Aktivität bestimmt. In Abbildung 17 ist ersichtlich, dass alle Methoden eine signifikante Hemmung durch IFI16 zeigen. Die Transfektion mit Calciumphosphat führte zu einer deutlich höheren viralen Partikelproduktion als die anderen Methoden und zeigte somit auch die stärkste Hemmung durch IFI16. Bei der Transfektion mit PEI, wobei jedoch das IFI16-Plasmid und das oriST-HERV-K113-Plasmid in verschiedenen Ansätzen mit PEI inkubiert wurden, zeigte sich keine Hemmung durch das IFI16. Dass die Inkubation in zwei verschiedenen Ansätzen nicht zu einer Restriktion des oriST-HERV-K113

fürte entspricht nicht den Erwartungen, deckt sich jedoch mit den Ergebnissen des Versuchs, in welchem erst das IFI16 transfiziert wurde und anschließend das oriST-HERV-K113.

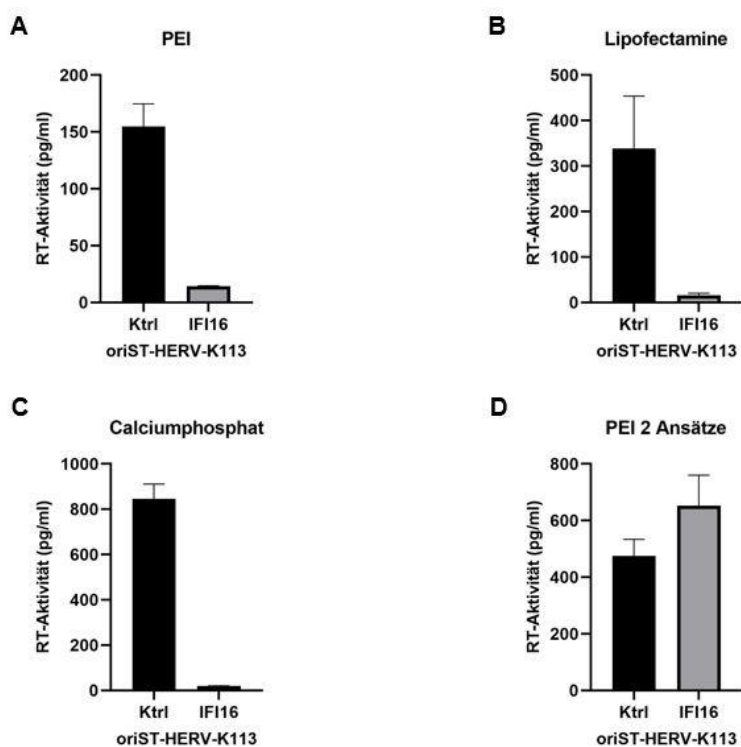


Abbildung 17: RT-Aktivität in der Zellkulturüberständen. 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Methoden transfiziert. Transfiziert wurden die Plasmide zur Expression des IFI16 und des oriST-HERV-K113 (A) Transfektion mit PEI. (B) Transfektion mit Lipofectamine. (C) Transfektion mit Calciumphosphat. (D) Transfektion mit PEI. Das IFI16 wurde in einem separaten Transfektionsansatz mit PEI inkubiert und oriST-HERV-K113 wurde mit dem Staufen-Flag in einem Ansatz mit PEI inkubiert. Die Zugabe zu den Zellen erfolgte gleichzeitig.

4.8 Einfluss von IFI16 auf die Infektion von Zellen mit HERV-K_{con}

Durch die Transfektion wird fremde DNA in eukaryotische Zellen eingebracht und die gewünschten Konstrukte exprimiert. Der natürliche Weg, auf dem Viren ihre genomische Information in eine Wirtszelle und ihr Genom integrieren, ist jedoch die Infektion. Es wurde untersucht, ob IFI16 einen Einfluss auf die Infektion von eukaryotischen Zellen hat. Verwendet wurden die Viren, die im Zuge dieser Arbeit generiert wurden. Das sogenannte HERV-K_{con} trägt in der *env*-Region ein GFP, welches durch einen CMV-Promotor gesteuert wird. Nach der Integration des viralen Genoms in die Wirtszelle wird der CMV-Promotor aktiviert und anhand des GFP-Signals kann bewertet werden, welche Zellen durch das Virus infiziert wurden. Vor der Infektion wurden die Zellen zunächst mit dem IFI16 oder dem Kontrollplasmid transfiziert und 24 Stunden später wurden die Zellen infiziert. Es wurden sowohl CrFK-Zellen als auch 293T-Zellen mit dem HERV-K_{con} infiziert und anschließend das Fluoreszenzsignal unter dem Mikroskop

bewertet. Anschließend wurde der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie gemessen.

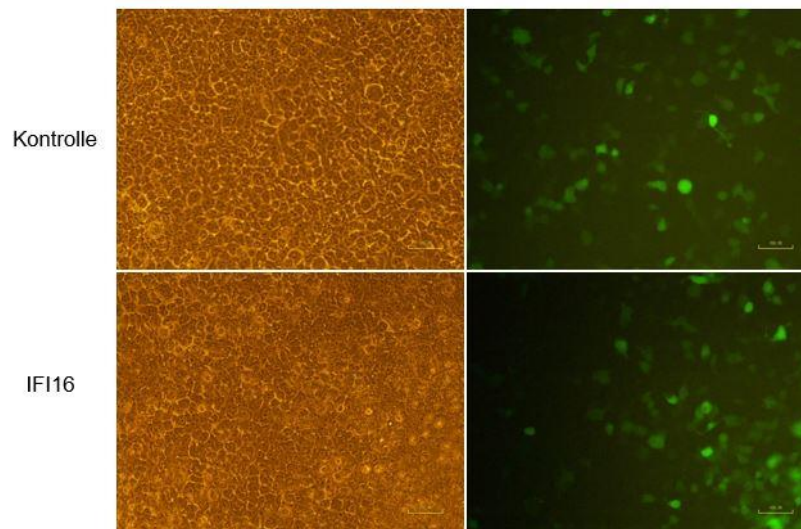


Abbildung 18: GFP-Signal nach der Infektion. 293T-Zellen wurden mit HERV-K_{con} infiziert und das GFP-Signal unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

Bei Betrachtung der infizierten 293T-Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurde eine große Anzahl grüner Zellen sichtbar, was auf eine gute Infektionseffizienz schließen lässt (Abbildung 18). Ein Unterschied zwischen den Zellen, welche mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden und den Zellen, welche mit IFI16 transfiziert wurden, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die ähnliche Anzahl grüner Zellen für beide Transfektionen lässt vermuten, dass das IFI16 keinen Einfluss auf den Infektionszyklus bis einschließlich dem Einbau der viralen DNA in das Wirtsgenom hat. Das visuelle Ergebnis spiegelt sich auch in der Auswertung mittels der Durchflusszytometrie wider. Für die Kontrolle wurde ein Anteil an grünen Zellen von 16,32% gemessen (Abbildung 19, Mitte), für die mit IFI16 transfizierten Zellen ein Anteil grüner Zellen von 15,5% (Abbildung 19, unten). Die prozentualen Anteile an grün fluoreszierenden Zellen unterscheiden sich nur sehr minimal, daher bestätigt dies die vorherige Annahme, dass die Integration der viralen DNA nicht durch das IFI16 beeinträchtigt wird.

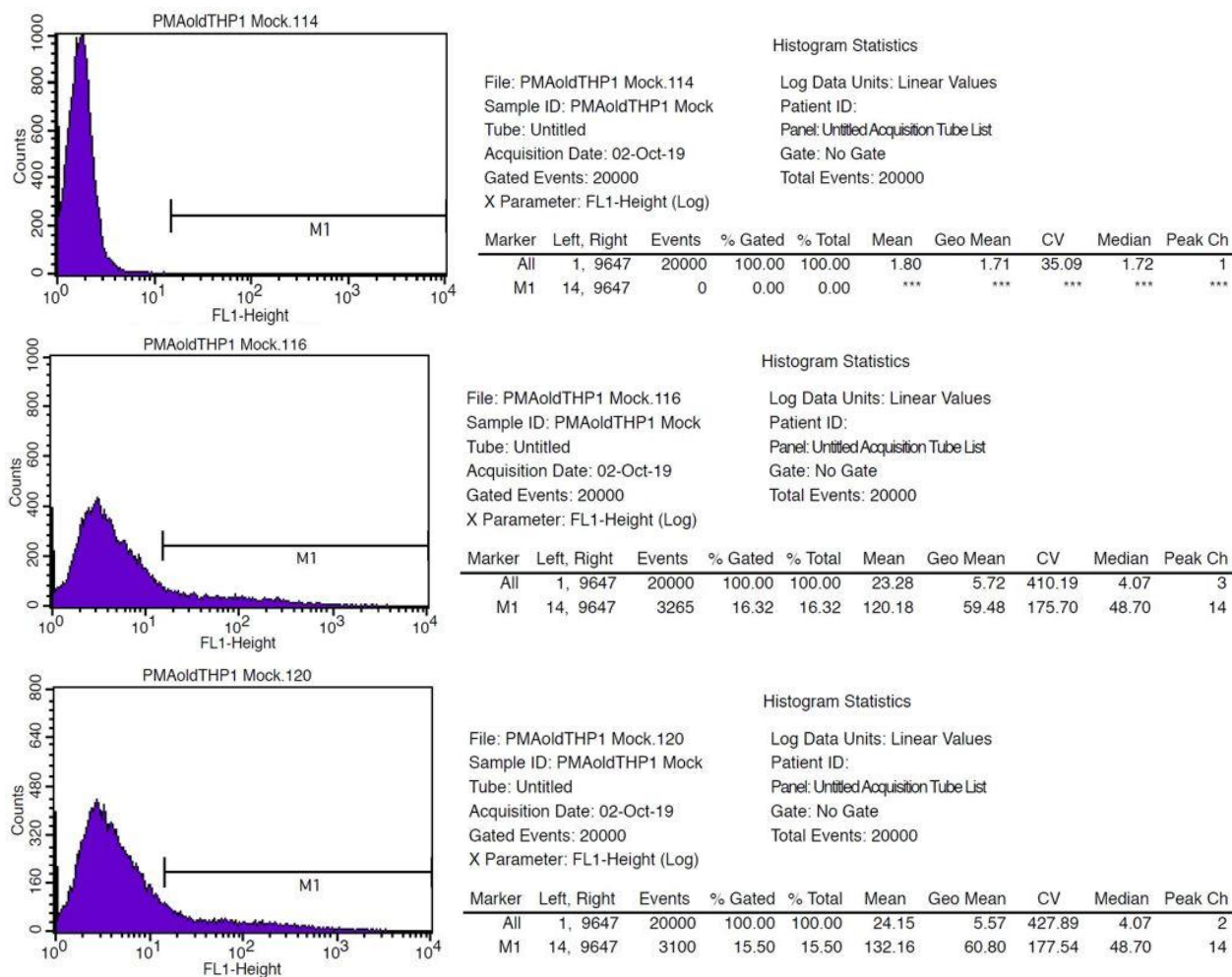


Abbildung 19: FACS-Ergebnis der Infektion. 293T-Zellen wurden mit MB3/IFI16 transfiziert und mit HERV-K_{con} infiziert. Mithilfe des FACS wurden die grün-fluoreszierenden Zellen gemessen. %Total gibt den prozentualen Anteil an grünen Zellen an. Oben: 293T-Zellen als Vergleichswert. Mitte: 293T-Zellen transfiziert mit dem Kontrollplasmid und infiziert mit HERV-K_{con}. Unten: 293T-Zellen transfiziert mit IFI16 und infiziert mit HERV-K_{con}.

Die gleiche Aussage kann auch für die CrFK-Zellen getroffen werden. Die visuelle Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte für die Infektion der CrFK-Zellen eine deutlich schlechtere Infektionsrate als für die 293T-Zellen (Abbildung 20). Die Durchflusszytometrie bestätigte die niedrige Anzahl grüner Zellen, wobei für die Kontrolle 3,76% grüne Zellen und für die Zellen, die das IFI16 enthielten, 3,6% grüne Zellen gemessen wurden (Abbildung 21). Die Anzahl grüner Zellen und somit die Infektionsrate unterscheiden sich demnach auch für die CrFK-Zellen nicht zwischen Kontrolle und den Zellen mit IFI16.

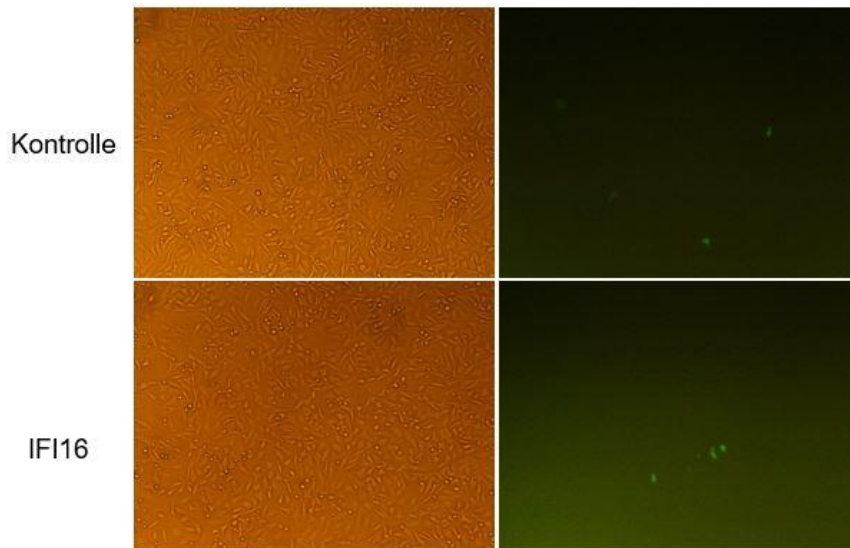


Abbildung 20: GFP-Signal nach der Infektion. CrFK-Zellen wurden mit MB3/IFI16 transfiziert und anschließend mit *HERV-K_{con}* infiziert und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

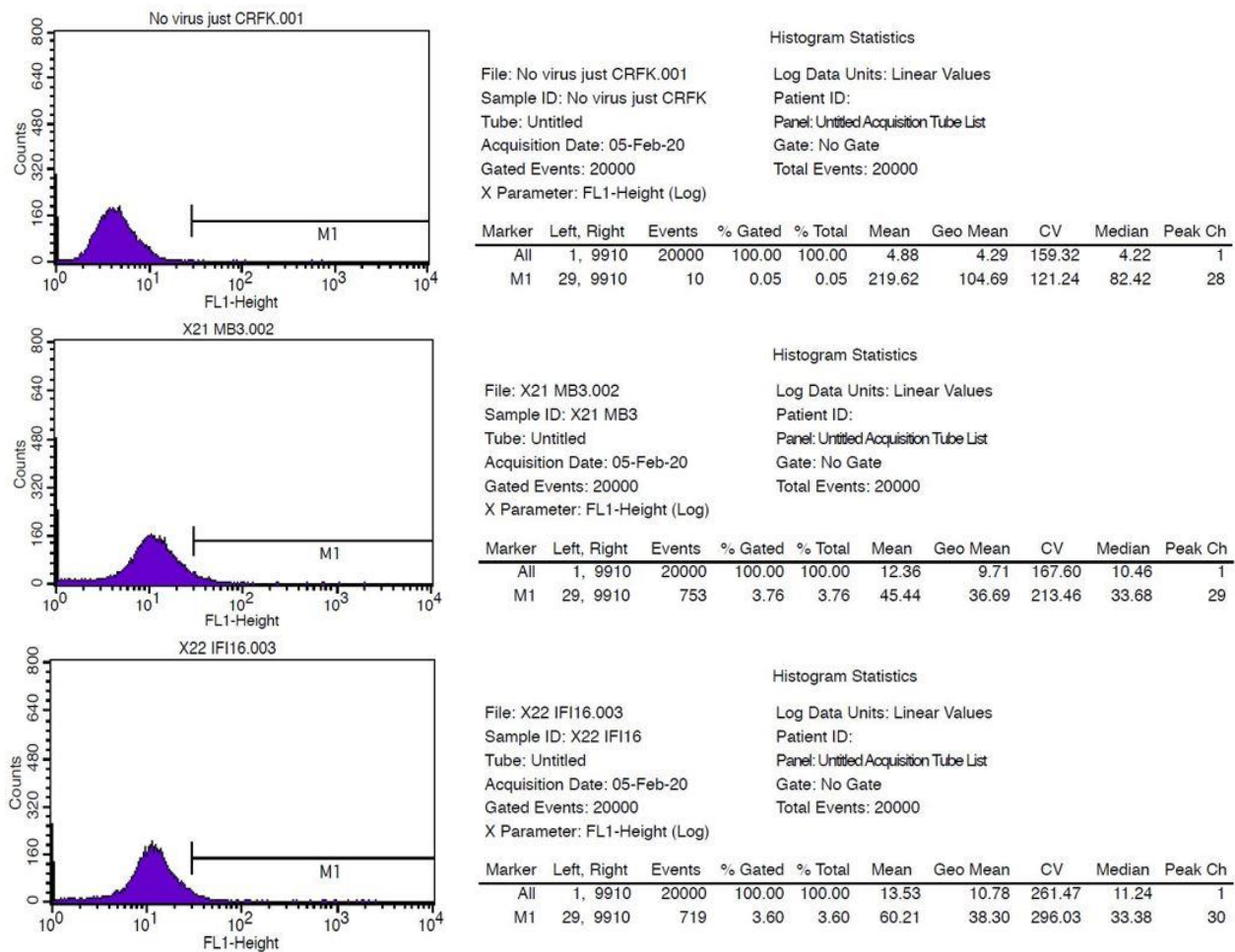


Abbildung 21: FACS-Ergebnis der Infektion. CrFK-Zellen wurden mit MB3/IFI16 transfiziert und anschließend mit *HERV-K_{con}* infiziert. Die grün-fluoreszierenden Zellen wurden mithilfe des FACS gezählt. %Total gibt den prozentualen Anteil an grünen Zellen an. Oben: CrFK-Zellen als Vergleichswert. Mitte: CrFK-Zellen transfiziert mit dem Kontrollplasmid und infiziert mit *HERV-K_{con}*. Unten: CrFK-Zellen transfiziert mit IFI16 und infiziert mit *HERV-K_{con}*.

Wie für die Transfektionen wurde auch für die Infektionen ein Western Blot der Zelllysate durchgeführt, um zu bestätigen, dass das IFI16 in den jeweiligen Zellen vorhanden war. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, konnte sowohl für die 293T- als auch die CrFK-Zellen nachgewiesen werden, dass IFI16 in den Zellen vorhanden war.

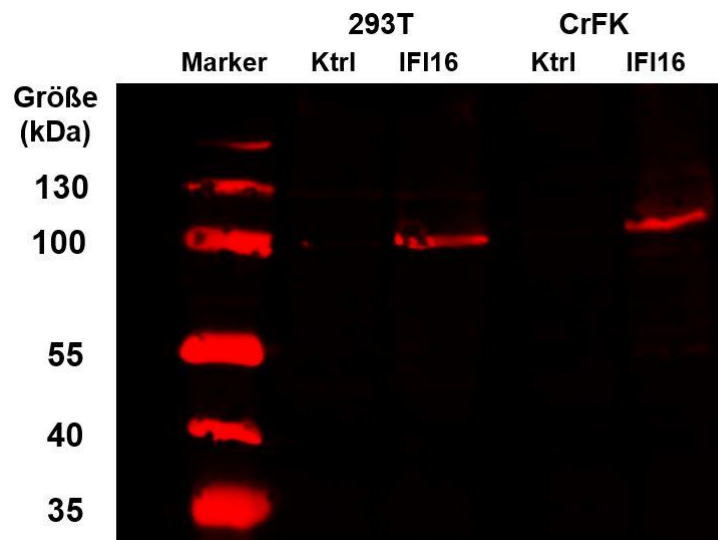


Abbildung 22: Western Blot der Zelllysate der Infektion. 293T- und CrFK-Zellen wurden zunächst mit IFI16 transfiziert und anschließend mit HERV-K_{cor} infiziert.

293T-Zellen sind Zellen humanen Ursprungs und tragen demnach natürlicherweise Sequenzen der endogenen Retroviren. Um die Expression von humanen endogenen Retroviren zu untersuchen können demnach keine humanen Zelllinien verwendet werden. In dieser Arbeit wurden aus diesem Grund neben den 293T-Zellen auch CrFK-Zellen verwendet. Um zwischen dem Signal des CMV-getriebenen GFP und der Aktivität der integrierten LTR zu differenzieren sollte nach der Infektion der Zellen mit einer qPCR die Menge der tatsächlichen Virustranskripte bestimmt werden. Da die Integration der viralen DNA nicht beeinflusst wurde, sollte mit dieser Methode analysiert werden, ob das IFI16 einen Effekt auf die Transkription der viralen Proteine hat. Aufgrund der sehr schlechten Ausbeute an infizierten Zellen und eines bekannt hohen Hintergrund-Signals bei dieser Methode wurde die geplante qPCR jedoch nicht durchgeführt, da es nicht als sinnvoll erachtet wurde mit einer derart niedrigen Anzahl infizierter Zellen eine Analyse der HERV-Transkripte durchzuführen.

5. Diskussion

Das Interferon-induzierte Protein 16 (IFI16), welches vor allem als Immunsensor und Regulator von Zellfunktionen bekannt ist, besitzt nachweislich auch eine antivirale Funktion. Eine Vielzahl von Viren wurde bereits auf eine mögliche Restriktion von IFI16 untersucht. Aus den Ergebnissen dieser Studien kann im Grunde die allgemeine Aussage getroffen werden, dass IFI16 in der Lage ist die virale Replikation negativ zu regulieren. Auf dieser Grundlage wurde in dieser Arbeit die Wirkung des IFI16 auf die Betaretroviren HERV-K113, JSRV und MMTV untersucht, wobei eine Hemmung der viralen Partikelproduktion erwartet wurde, denn auch für HIV-1, welches wie die Betaretroviren zu den Retroviren gehört, wurde bereits eine virale Restriktion durch IFI16 belegt (Hotter et al., 2019; Jakobsen et al., 2013). Der Fokus dieser Arbeit wurde auf das Humane endogene Retrovirus K113 (HERV-K113) gelegt, denn für die anderen Betaretroviren waren nur Konstrukte vorhanden, die einen CMV-Promotor enthalten. Da das IFI16 seine antivirale Wirkung scheinbar über die Interaktion mit der LTR-Region entfaltet, wurden JSRV und MMTV aufgrund des Fehlens von Konstrukten mit der vollständigen LTR-Sequenz eher hintergründig behandelt.

IFI16 hemmt die virale Partikelproduktion von oriST-HERV-K113 bei gleichzeitiger Transfektion

Bei der gleichzeitigen Transfektion wurde sowohl ein Plasmid für das IFI16 als auch ein Plasmid für das oriST-HERV-K113 in 293T-Zellen eingebracht. Die Plasmide gelangen nach der Aufnahme durch die Zellen weiter in den Zellkern und werden dort von der zellulären Transkriptionsmaschinerie transkribiert. Das IFI16 ist ein Protein, so sollte die DNA des Plasmides in mRNA transkribiert werden, und nach Transport in das Cytoplasma in das fertige Protein translatiert werden. Das oriST-HERVK113-Plasmid enthält alle nötigen viralen Gene, die zur Bildung eines viralen Partikels nötig sind. Für das verwendete Konstrukt wurde bereits nachgewiesen, dass Viruspartikel gebildet werden und diese auch RT-Aktivität zeigen (Lausch, 2013). Die gebildeten Viruspartikel sind jedoch nicht in der Lage sich zu replizieren, weshalb die Anzahl der gebildeten Partikel nicht durch die Infektion weiterer Zellen determiniert werden kann, wie es bei Analysen von HIV-1 geschehen ist (Hotter et al., 2019). Durch die Aktivität der reversen Transkriptase konnte die virale Partikelproduktion jedoch mithilfe eines PERT-Assays analysiert werden. Das IFI16 besitzt ein Kernlokalisierungssignal, wodurch es nach der Translation im Cytoplasma in den Zellkern transportiert wird. Es wurde erwartet, dass das IFI16 im Zellkern die Expression der viralen Proteine hemmt.

Die Erwartungen konnten durch diesen Versuch bestätigt werden. Wie in Abbildung 10A zu sehen ist, produzierten die Zellen, welche mit dem IFI16 transfiziert wurden, 67mal weniger virale Partikel, als die Zellen, welche mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Es konnte somit auch für das HERV-K113 bestätigt werden, dass IFI16 als viraler Restriktionsfaktor wirkt.

IFI16 hemmt oriST-HERV-K113 nur bei Anwesenheit der LTR signifikant

Zur weiteren Untersuchung der Funktionsweise des IFI16 wurde zur Transfektion das CMV-oriST-HERV-K113 verwendet. Dieses Plasmid enthält statt der U3-Region, welche natürlicherweise in der 5'-Region der Gensequenz lokalisiert und Teil der LTR ist, einen CMV-Promotor. CMV ist ein sehr starker Promotor und kann verwendet werden, um die Transkriptionsrate zu erhöhen. Da bereits vermutet wurde, dass die hemmende Wirkung des IFI16 über die Interaktion mit der LTR zustande kommt, war es zu erwarten, dass die Aktivität der reversen Transkriptase in diesem Versuch nicht signifikant geringer sein würde für die mit IFI16 transfizierten Zellen. Das CMV-Konstrukt wurde wie im vorherigen Versuch gleichzeitig mit dem IFI16 transfiziert. Das Ergebnis des PERT-Assays (Abbildung 11) lässt eine leichte Hemmung durch IFI16 erkennen. Es wurde erwartungsgemäß keine sehr starke Reduktion der viralen Partikelproduktion gemessen, dennoch ist aufgrund der Ergebnisse davon auszugehen, dass das IFI16 einen Effekt auf die Expression des CMV-oriST-HERV-K113 hat. Die R-U5-Region der LTR, die im CMV-oriST-HERV-K113 noch vorhanden ist, scheint an der Hemmung durch IFI16 beteiligt sein, da eine immerhin 4-fache Reduktion der Partikelproduktion gezeigt werden konnte. Eine wichtige Rolle für die virale Restriktion scheint jedoch vor allem die U3-Region der LTR zu spielen, denn ist diese Region vorhanden, wird die virale Partikelproduktion deutlich stärker gehemmt. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Hemmung durch IFI16 mit dem Vorhandensein der LTR zusammenhängt, was die These, dass die Restriktion über die Interaktion mit der LTR erfolgt, weiter stützt.

CMV-JSRV und CMV-MMTV werden nicht durch IFI16 gehemmt

Wie eingangs erwähnt standen für die Analyse von JSRV und MMTV nur CMV-Konstrukte zur Verfügung. Die Konstrukte enthalten statt der U3-Region einen CMV-Promotor. Die Plasmide wurden gleichzeitig mit dem Plasmid für das IFI16 transfiziert, um einen möglichen Effekt auf dessen Expression zu untersuchen. MMTV und JSRV sind eng verwandt mit den Viren der HERV-K(HML-2)-Familie und zusammen mit den simianen Retroviren (SRV) bilden sie die Gattung der Betaretroviren (Abbildung 5). Aufgrund dieser Verwandtschaft liegt die Vermutung nahe, dass auch JSRV und MMTV anfällig für die Restriktion durch IFI16 sind.

Die Analyse der CMV-Konstrukte zeigte grundsätzlich Ergebnisse, die so zu erwarten waren. Für JSRV ergibt sich ein sehr ähnliches Bild, wie für den vorherigen Versuch mit dem CMV-HERV-Konstrukt (Abbildung 12A). Die virale Partikelproduktion des JSRV war für die Kotransfektion mit IFI16 zwar geringer als die der Kontrolle, jedoch belief sich die Reduktion nicht einmal um das Zweifache. Für MMTV waren die Werte für die RT-Aktivität sehr nah beieinander, die Bewertung ist jedoch aufgrund einer insgesamt geringen Partikelbildung recht schwierig (Abbildung 12B). Die Ergebnisse dieses Versuchs können eher weniger als Indiz für die Restriktion durch das IFI16 gesehen werden, dennoch sind es weitere wichtige Ergebnisse für die Bewertung, ob das IFI16 auch eine Wirkung hat, wenn die U3-Region durch einen CMV-Promotor ausgetauscht wurde und somit nicht mehr die vollständige LTR vorhanden ist. Die Messwerte decken sich mit den Ergebnissen des vorherigen Versuchs mit dem CMV-HERV, wodurch bestätigt werden kann, dass IFI16 bei einer unvollständigen LTR nicht seine volle Wirkung entfalten kann.

Um die Vermutung bestätigen zu können, dass auch JSRV und MMTV als weitere Vertreter der Betaretroviren durch IFI16 gehemmt werden, müssten Plasmide mit der originalen LTR-Sequenz generiert werden. Da bisher noch keine solche Konstrukte zur Verfügung stehen, ist es vorstellbar, dass sich die Konstruktion einer solchen Sequenz schwierig gestaltet, oder die Expression eines solchen Konstruktes zu schwach ist. Denkbar ist auch, dass keine große Notwendigkeit für ein solches Plasmid besteht, da das Konstrukt mit dem CMV-Promotor für viele Analysen gut geeignet ist und eine gute Expression der viralen Gene garantiert.

Das Kernlokalisierungssignal des IFI16 ist essenziell und die Pysin-Linker-Domäne ausreichend für die Restriktion des oriST-HERV-K113

Neben der Funktionsweise des IFI16 ist es ebenfalls interessant zu untersuchen, welche Domäne des Proteins für die antivirale Wirkung verantwortlich ist. Hotter et al. (2019) haben die verantwortlichen Domänen für die Restriktion des HIV-1 bereits identifiziert. Sie veröffentlichten Ergebnisse, die suggerieren, dass die Pysin-Linker-Domäne ausreichend für die hemmende Wirkung des IFI16 ist, jedoch bei Fehlen der Kernlokalisierungssequenz keine Reduktion der Partikelproduktion mehr erkennbar ist. Die Konstrukte, die Hotter et al. (2019) für die Untersuchungen an HIV-1 verwendet haben, wurden der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Institutes zur Verfügung gestellt und konnten demnach für diese Arbeit verwendet werden. Es wurde einerseits das Plasmid MB20, welches für die Pysin-Linker-Domäne codiert und andererseits das MB50, welches eine Mutation der Kernlokalisierungssequenz besitzt, verwendet. Die Kernlokalisierungssequenz befindet sich in der Linker-Region und ist somit in der

Pyrin-Linker-Domäne enthalten. Das IFI16 besitzt außerdem zwei HIN-Domänen, welche die Interaktion mit Nukleinsäuren ermöglichen, daher liegt die Vermutung eigentlich nahe, dass diese Domänen eine Rolle während der Restriktion durch das IFI16 spielen. Dennoch zeigen die Ergebnisse von Hotter et al. (2019), dass die HIN-Domänen keine Rolle für die antivirale Wirkung spielen.

Die Ergebnisse für HIV-1 spiegeln sich in den hier generierten Ergebnissen für HERV-K113 wider. Die Zellen, welche mit dem MB20-Plasmid transfiziert wurden und folglich die Pyrin-Linker-Domäne des Proteins exprimierten, produzierten deutlich weniger virale Partikel, als die Kontrolle (Abbildung 13A). Die RT-Aktivität in den konzentrierten Überständen der Zellen, welche mit dem MB50 transfiziert wurden und somit das Konstrukt mit der mutierten NLS exprimierten, war etwa dreimal so hoch, wie die der Kontrolle (13A). Die dreifache Erhöhung im Gegensatz zur Kontrolle ist nicht so hoch, als dass sie als signifikant angesehen werden müsste, vielmehr ist hier die Aussage wichtig, dass bei einer Mutation der NLS und somit dem Verlust des Kernlokalisierungssignal keine Reduktion der viralen Partikelproduktion mehr erkennbar ist. Die Kernlokalisierungs-Domäne des IFI16 sorgt dafür, dass das Protein in den Zellkern transportiert wird. Durch die Mutation der NLS-Sequenz ist es dem IFI16 folglich nicht mehr möglich in den Zellkern zu gelangen, woraus sich schlussfolgern lässt, dass die Hemmung durch das IFI16 im Zellkern lokalisiert ist. Die Pyrin-Linker-Domäne hingegen enthält die NLS, jedoch nicht die HIN-Domänen, dennoch zeigt sich eine Hemmung der Partikelproduktion, was suggeriert, dass die HIN-Domänen nicht für die virale Restriktion verantwortlich sind.

oriST-HERV-K113 wird nicht von IFI16 gehemmt, wenn dessen Transfektion zu späteren Zeitpunkten erfolgt

Um den Verlauf der Hemmung weiter zu charakterisieren, wurden 293T-Zellen mit oriST-HERV-K113 transfiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten mit IFI16 kotransfiziert. Mit diesem Versuch sollte der Zeitpunkt der Hemmung auf den viralen Replikationszyklus analysiert werden. Sollte die Restriktion zu einem späten Zeitpunkt der Virusreplikation ansetzen, so würde eine Hemmung auch nach einer späteren Transfektion des IFI16 erwartet werden. Sollte die Restriktion von IFI16 während einer frühen Phase auftreten, so sollte bei der Transfektion zu späteren Zeitpunkten keine Hemmung mehr sichtbar sein. Die Ergebnisse suggerieren eine Restriktion in einer frühen Phase des viralen Zyklus (Abbildung 14). Bei einer gleichzeitigen Transfektion der Plasmide wurde, wie auch in den vorherigen Ergebnissen, eine signifikante Hemmung der viralen Partikelproduktion der mit IFI16 transfizierten Zellen gemessen. Zu allen anderen Zeitpunkten konnte jedoch keine Hemmung festgestellt werden, was darauf hindeuten würde, dass nach Aktivierung der Transkription viraler Proteine das IFI16 nicht mehr als

Restriktionsfaktor wirken kann. Schlussfolgernd lassen die Ergebnisse vermuten, dass IFI16 vor der Transkription des viralen Genoms im Zellkern vorhanden sein muss, um seine antivirale Wirkung entfalten zu können.

Die vorherige Transfektion von IFI16 zeigt keine Wirkung auf oriST-HERV-K113

Um die These zu stützen, dass für eine virale Hemmung das IFI16 bereits im Zellkern vorhanden sein muss, bevor die virale Transkription aktiviert wird, wurde der vorherige Versuch nochmal in der umgekehrten Reihenfolge durchgeführt. Es wurden 293T-Zellen mit IFI16 transfiziert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten mit oriST-HERV-K113. Mit diesem Experiment konnte untersucht werden, ob der Verlust der Hemmung wirklich an der späteren Transfektion von IFI16 lag, oder ob es vielleicht aufgrund der Methodik die Plasmide zu verschiedenen Zeitpunkten zu transfizieren, zu einem Verlust der Hemmung kam. Bei der Transfektion von IFI16 in 293T-Zellen kommt es zur Produktion des Proteins, sodass zum Zeitpunkt der zweiten Transfektion mit oriST-HERV-K113 bereits IFI16 im Zellkern lokalisiert sein sollte. Als Ergebnis dieses Versuchs wurde demnach erwartet, dass zu allen Zeitpunkten der Transfektion von oriST-HERV-K113 eine Reduktion der viralen Partikelproduktion zu erkennen ist. Die Ergebnisse des Versuchs zeigten jedoch wiederum nur für die gleichzeitige Transfektion eine signifikante Hemmung (Abbildung 16A). Für die anderen Zeitpunkte konnte kein aussagekräftiger Unterschied verglichen mit der Kontrolle festgestellt werden. Die Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass der Verlust der Hemmung aufgrund der Methodik auftreten könnte, denn es ist schwer eine Erklärung dafür zu finden, warum die Hemmung bei vorheriger Transfektion des IFI16 nicht auftritt. Es ist denkbar, dass bei einer getrennten Transfektion der Plasmide, nur jeweils ein Plasmid von einer Zelle aufgenommen wird und somit die Anzahl der Zellen, die beide Plasmide enthalten und exprimieren, sehr gering ist und folglich kein Effekt sichtbar wird. Um diese These zu überprüfen wurden 293T-Zellen erneut gleichzeitig mit dem IFI16 und dem oriST-HERV-K113 transfiziert, diesmal wurden die Plasmide jedoch jeweils in einem separaten Reaktionsgefäß mit dem PEI inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden anschließend direkt hintereinander auf die Zelle getropft, wobei die Reihenfolge variiert wurde. Bei einer gleichzeitigen Transfektion wurde bisher in jedem Experiment eine starke Reduktion der viralen Partikelproduktion gemessen, demnach sollte auch für diesen Versuchsansatz eine Hemmung erkennbar sein. Wie in Abbildung 17D zu erkennen ist, kam es zu keiner Reduktion der viralen Partikelproduktion durch IFI16. Das Ergebnis dieses Versuches bestätigt die Vermutung, dass die separate Inkubation der Plasmide mit dem PEI die Ursache für den Verlust der Hemmung durch IFI16 ist. Bei der Inkubation mit dem PEI bilden sich Komplexe aus der Plasmid DNA und dem PEI. Es liegt die Vermutung nahe, dass bei einer

gemeinsamen Inkubation der Plasmide Komplexe entstehen, die sowohl das IFI16-Plasmid als auch das oriST-HERV-K113-Plasmid enthalten. Werden die Komplexe schließlich von der Zelle aufgenommen, so kann davon ausgegangen werden, dass die Zelle beide Plasmide aufnimmt. Werden die Plasmide separat inkubiert, bilden sich einerseits Komplexe aus PEI und dem IFI16 und andererseits Komplexe aus PEI und dem oriST-HERV-K113. Bei der Zugabe zu den Zellen könnten demnach entweder nur Komplexe mit dem IFI16 oder nur Komplexe mit dem oriST-HERV von einer Zelle aufgenommen werden. Diese Schlussfolgerung würde eine logische Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse liefern, dennoch sollte diese Annahme durch weitere Experimente untersucht werden. Das IFI16 trägt ein Gen, welches für ein blau-fluoreszierendes Protein (BFP) codiert. Diese Eigenschaft könnte sich zu Nutze gemacht werden, um die Zellen zu detektieren, welche mit dem IFI16 transfiziert wurden. Es könnte außerdem ein Plasmid für oriST-HERV-K113 konstruiert werden, welches ein Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) oder für ein beliebiges anderes fluoreszierendes Protein, außer dem BFP, trägt. Wäre ein solches Konstrukt vorhanden, könnte man detektieren, welche Zellen mit welchem Plasmid transfiziert wurden und demnach auch welche Zellen beide Plasmide enthalten und exprimieren.

Die Schlussfolgerung, dass die antivirale Wirkung durch das IFI16 sich nur entfalten kann, wenn die Plasmide gemeinsam in einem Ansatz inkubiert werden, stellt wiederum die Ergebnisse der vorherigen Versuche infrage. Die Ergebnisse des Versuchs, in welchem zunächst das oriST-HERV-K113 und anschließend das IFI16 transfiziert wurde, deuteten zunächst darauf hin, dass das IFI16 die frühen Schritte der viralen Replikation hemmen. Vor dem Hintergrund, dass die erfolgreiche Transfektion beider Plasmide in die Zellen eventuell nur erreicht werden kann, wenn sie im gleichen Ansatz mit PEI inkubiert werden, könnte die nicht vorhandene Hemmung nach den verschiedenen Zeitpunkten wohl auch in diesem Versuch an der Transfektionsmethode liegen und nicht daran, dass nur die frühen Schritte der Replikation gehemmt werden. Es ist dabei trotzdem nicht auszuschließen, dass das IFI16 tatsächlich nur die frühe Phase des viralen Replikationszyklus hemmt und eine spätere Transfektion durch IFI16 nicht mehr wirksam ist. Dieser Versuch könnte ebenfalls mit fluoreszenzmarkierten Plasmiden wiederholt werden, um letztendlich die richtigen Schlüsse aus dem Ergebnis ziehen zu können.

Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden

Zusätzlich zu der Transfektion mit PEI wurden noch zwei weitere Methoden verwendet, um die Plasmid-DNA in die Zielzellen einzubringen. Die Plasmide wurden für diese Vergleiche im gleichen Ansatz inkubiert und demnach auch gleichzeitig transfiziert. Alle Methoden zeigten eine signifikante Reduktion der viralen Partikelproduktion der Zellen, welche mit IFI16 transfiziert

wurden. Sowohl die Transfektion mit Lipofectamine als auch die Transfektion mit Calciumphosphat ergaben eine höhere Partikelproduktion als die Transfektion mit PEI, wenn man jeweils die Kontrollen vergleicht. Die Hemmung durch das IFI16 ist ebenfalls höher bei den Transfektionen mit Lipofectamine und Calciumphosphat. Die höchste Partikelproduktion und ebenfalls die stärkste Hemmung durch IFI16 zeigte die Transfektion mit Calciumphosphat. Für weitere Transfektionsexperimente wäre es demnach ratsam mit Lipofectamine oder Calciumphosphat zu arbeiten, wobei Calciumphosphat die bessere Ausbeute liefert, Lipofectamine jedoch einfacher in der Handhabung ist.

IFI16 bewirkt keine Hemmung der Infektion durch HERV-K_{con}

Die humanen endogenen Retroviren besitzen keine natürlich vorkommende infektiöse Form, jedoch gelang es Lee und Bieniasz (2007) ein infektiöses HERV zu rekonstituieren. Durch die Transfektion von Plasmiden, die für alle nötigen viralen Bestandteile codieren, war es möglich infektiöse Viren zu produzieren. Die Plasmide der Arbeitsgruppe wurden dem Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellt und konnten so in dieser Arbeit für die Produktion infektiöser HERV-Viren genutzt werden, die als HERV-K_{con} bezeichnet werden. Das Virus trägt in der Env-Region des Genoms ein GFP, welches hinter einen CMV-Promotor kloniert wurde. Das HERV-K_{con} ist in der Lage Zellen zu infizieren und den Infektionszyklus bis zur Integration ins Wirtsgenom zu durchlaufen. Es werden jedoch keine neuen infektiösen Partikel gebildet, so dass der Replikationszyklus nicht komplettiert werden kann. Nach dem Einbau der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle wird die CMV-getriebene Expression des GFP-Gens aktiviert und somit kann die Infektion der Zelle und der Einbau der DNA durch das GFP-Signal analysiert werden.

Es wurden 293T-Zellen mit dem HERV-K_{con} infiziert, nachdem sie mit dem IFI16 transfiziert wurden. Sowohl die visuelle Auswertung (Abbildung 18) als auch die Analyse der grün-fluoreszierenden Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie (Abbildung 19) zeigen, was die Anzahl der grünen Zellen angeht, keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Zellen, welche IFI16 exprimieren. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Infektion bis hin zur Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom nicht durch das IFI16 beeinflusst wird. Es bleibt jedoch die Frage, ob das IFI16 die Transkription der viralen Gene beeinflusst. Die GFP-Expression wird durch einen separaten CMV-Promotor aktiviert, daher sagt das GFP-Signal nichts darüber aus, ob die virale LTR, die als Promotor für die viralen Gene fungiert, in ihrer Aktivität durch das IFI16 gehemmt wird. Eine Möglichkeit, die Aktivität der LTR zu untersuchen, wäre die Analyse der viralen Transkripte. Die Quantität der Transkripte könnte durch die Anwendung einer qPCR

analysiert werden. Die Verwendung von 293T-Zellen für eine solche qPCR würde wenig Sinn machen, da dies eine humane Zelllinie ist und humane Organismen von Natur aus HERV-Sequenzen im Genom integriert haben, die das Ergebnis verfälschen würden. Aus diesem Grund wurden im Folgenden CrFK-Zellen für die Infektion mit HERV-K_{con} verwendet. Die Infektionsrate dieser Zellen war jedoch um einiges geringer als die Infektionsrate der 293T-Zellen. Mit nur 3% grünen Zellen hätte es wenig Sinn gemacht eine qPCR zur Quantifizierung der viralen Transkripte durchzuführen, denn die Methodik weist erfahrungsgemäß auch ein hohes Hintergrundsignal auf. Dennoch bleibt eine qPCR der viralen Transkripte ein interessanter Ansatz, um die Aktivität der integrierten viralen LTR zu analysieren.

Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Transfektion von oriST-HERV-K113 und IFI16, eine Restriktion der viralen Partikelproduktion vorliegt. Das interferon-induzierte Protein IFI16 scheint demnach auch auf das Humane endogene Retrovirus K113 als viraler Restriktionsfaktor zu wirken. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die antivirale Wirkung von der Pyrin-Linker-Domäne des IFI16 abhängig ist. Die Frage wie genau und in welchem Schritt der viralen Replikation das IFI16 wirkt bleibt weiterhin zu klären, jedoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die virale Transkription durch die Interaktion von IFI16 mit der LTR gehemmt wird. Ist die Kernlokalisierungssequenz des IFI16 mutiert, so kann es seine antivirale Funktion nicht entfalten, woraus geschlossen werden kann, dass die Hemmung von HERV-K113 durch das IFI16 im Zellkern stattfindet. Die Infektion von Zellen durch HERV-K_{con} und der Einbau der viralen DNA werden nicht von IFI16 beeinflusst.

6. Ausblick

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass IFI16 in der Lage ist humane endogene Retroviren zu hemmen. Es bleibt jedoch weiterhin zu klären auf welche Weise die Restriktion zustande kommt und zu welchem Zeitpunkt des Replikationszyklus. Um diese offenen Fragen weiter zu untersuchen, ist es zunächst notwendig die Methodik zu überprüfen. In dieser Arbeit wurde herausgearbeitet, dass einige unerwartete Ergebnisse ihren Ursprung in der unterschiedlichen Transfektionseffizienz haben könnten. Aufgrund dieser Annahme ist es unbedingt nötig, eine Methodik zu entwickeln, die es möglich macht zu erkennen welche Plasmide von den Zellen tatsächlich aufgenommen wurden. Das Expressionsplasmid des IFI16 trägt bereits ein BFP-Gen, sodass es mit den passenden Geräten möglich ist die Transfektionseffizienz des IFI16-Plasmids zu determinieren. Für die Untersuchung der Wirkung von IFI16 auf das HERV ist es jedoch wichtig zu wissen, ob die Zellen nach der Transfektion beide Plasmide enthalten. Aus diesem Grunde wäre es wichtig einen Molekularklon des HERV zu konstruieren, mit dem es schließlich auch möglich ist, diejenigen Zellen zu identifizieren, welche das HERV-Plasmid aufgenommen haben. Es wäre denkbar ein GFP-Gen in das oriST-HERV-K113 zu klonieren. Nach erfolgreicher Klonierung dieses Konstruktes wäre es schließlich möglich mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes festzustellen, welche Zellen die jeweiligen Plasmide aufgenommen haben. Es wäre ebenfalls hilfreich eine Zelllinie zu etablieren, die das IFI16 stabil exprimiert. So könnte gewährleistet werden, dass alle Zellen das IFI16 exprimieren. Die Zellen müssten folglich für Untersuchungen nur mit dem HERV-Plasmid transfiziert werden und als Kontrolle würde die ursprüngliche Zelllinie dienen. Es wäre denkbar für diesen Ansatz 293T-Zellen und CrFK-Zellen zu verwenden, da diese Zelllinien das IFI16 natürlicherweise nicht exprimieren.

Für die Infektion von CrFK-Zellen mit HERV-K_{con} ergab sich die Schwierigkeit, dass die Infektionsrate sehr niedrig war und somit weitere Untersuchungen erschwert wurden. In dieser Hinsicht gilt es Wege zu finden, die Infektionsrate zu erhöhen oder andere nicht-humane Zelllinien zu finden, die sich effektiv durch das HERV-K_{con} infizieren lassen. Bei Erreichen eines guten Prozentsatzes an infizierten Zellen, wäre es möglich die geplante qPCR durchzuführen, welche es ermöglicht die Anzahl an viralen Transkripten und somit die Aktivität der integrierten LTR zu analysieren.

Es wäre außerdem wünschenswert weitere Untersuchungen mit JSRV und MMTV durchzuführen. Da diese Viren auch zur Gattung der Betaretroviren gehören, ist zu erwarten, dass auch sie durch IFI16 inhibiert werden. Die Herausforderung für diese Analysen liegt sicherlich darin Konstrukte für JSRV und MMTV zu entwerfen, welche die ursprüngliche LTR enthalten.

Literaturverzeichnis

- Baggetta R., De Andrea, M., Gariano G. R., Mondini M., Rittà M., Caposio P., Cappello P., Giovarelli M., Gariglio M. and Landolfo S. (2010): *The interferon-inducible gene IFI16 secretome of endothelial cells drives the early steps of the inflammatory response*. Eur. J. Immunol. 2010. 40: 2182-2189. doi:10.1002/eji.200939995
- Bannert N. and Kurth R. (2004): *Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation*. PNAS, October 5, 2004, Vol. 101, Suppl. 2, p14572-14579.
- Bannert N. and Kurth R. (2006): *The Evolutionary Dynamics of Human Endogenous Retroviral Families*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2006. 7:149-73. doi:10.1146/annurev.genom.7.080505.115700
- Bannert N., Hofmann H., Block A. and Hohn O. (2018): *HERVs New Role in Cancer: From Accused Perpetrators to Cheerful Protectors*. Front. Microbiol., 13 February 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.00178
- Barbulescu M., Turner G., Seaman M. I., Deinard A. S., Kidd K. K., Lenz J. (1999): *Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans*. Current Biology, Volume 9, Issue 16, 26 August 1999, Pages 861-868, S1. doi:10.1016/S0960-9822(99)80390-X
- Beimforde N., Hanke K., Ammar I., Kurth R., Bannert N. (2008): *Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113*. Virology, 2008 Feb 5;371(1):216-25. doi:10.1016/j.virol.2007.09.036
- Bieber T., Meissner W., Kostin S., Niemann A., Elsasser H-P. (2002): *Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes*. Journal of Controlled Release 82 (2002) 441-454.
- Briggs L. J., Johnstone R. W., Elliot R.M., Xiao C-Y., Dawson M., Trapani J. A. and Jans D. A. (2001): *Novel properties of the protein kinase CK-2-site-regulated nuclear-localization sequence of the interferon-induced nuclear factor IFI 16*. Biochem. J. (2001) 353, 69-77.
- Büscher K., Trefzer U., Hofmann M., Sterry W., Kurth R. and Denner J. (2005): *Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines*. Cell and Tumor Biology. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2983
- Caporale M., Centorame P., Giovannini A., Sacchini F., Di Ventura M., de las Heras M., Palmarini (2005): *Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep*. Virology. Volume 338, Issue 1, 20 July 2005, Pages 144-153. doi:10.1016/j.virol.2005.05.018
- Caporale M., Cousens C., Centorame P., Pinoni C., De las Heras M., Palmarini (2006): *Expression of the Jaagsiekte Sheep Retrovirus Envelope Glycoprotein Is Sufficient to Induce Lung Tumors in Sheep*. Journal of Virology. doi:10.1128/JVI.00474-06
- Caposio P., Gugliesi F., Zannetti C., Sponza S., Mondini M., Medico E., Hiscott J., Young H. A., Gribaudo G., Gariglio M. and Landolfo S. (2007): *A Novel Role of the Interferon-inducible Protein IFI16 as Inducer of Proinflammatory Molecules in Endothelial Cells*. The journal of biological chemistry, Vol. 282, NO. 46, pp. 33515-33529, November 16, 2007.
- Conrady CD, Zheng M., Fitzgerald KA, Liu C. and Carr DJJ (2011): *Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16*. Mucosal Immunology, Volume 5, Number 2, March 2012. doi:10.1038/mi.2011.63
- Dawson M. J. and Trapani J. A. (1995): *IFI16 Gene Encodes a Nuclear Protein Whose Expression Is Induced by Interferons in Human Myeloid Leukaemia Cell Lines*. Journal of Cellular Biochemistry 57:39-51 (1995).
- Dawson M. J. and Trapani J. A. (1995): *The Interferon Inducible Autoantigen, IFI16: Localization to the Nucleolus and Identification of a DNA-Binding Domain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 214, Issue 1, 5 September 1995, Pages 152-162. doi:10.1006/bbrc.1995.2269
- Dell'Oste V., Gatti D., Giorgio A. G., Gariglio M., Landolfo S., De Andrea M. (2014): *The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response*. New Microbiologica, 38, 5-20, 2015.

- Fuchs N. V., Kraft M., Tondera C., Hanschmann K-M., Löwer J. and Löwer R. (2011): *Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promotor Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3*. Journal of Virology, Apr. 2011, p. 3436-3448. doi:10.1128/JVI.02539-10
- Freimanis G. L. (2014): *The Detection and Role of Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) In Rheumatoid Arthritis*. Dissertation.
- Gariano G. R., Dell'Oste V., Bronzini M., Gatti D., Luganini A., De Andrea M., Gribaudo G., Gariglio M., Landolfo S. (2012): *The Intracellular DNA Sensor IFI16 Gene Acts as Restriction Factor for Human Cytomegalovirus Replication*. PLoS Pathog 8(1): e1002498. doi:10.1371/journal.ppat.1002498
- Goff S. P. (2004): *Retrovirus Restriction Factors*. Molecular Cell, Volume 16, Issue 6, 22 December 2004, Pages 849-859. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.001
- Hanke K., Hohn O. and Bannert N. (2016): *HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep*. APMIS 124: 67-87. doi:10.1111/apm.12475
- Hanke K., Hohn O., Liedgens L., Fidgeke K., Wamara J., Kurth R., Bannert N. (2013): *Staufen-1 Interacts with the Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML-2) Rec and Gag Proteins and Increases Virion Production*. Journal of Virology 87(20). doi:10.1128/JVI.03031-12
- Hanke K., Kramer P., Seeher S., Beimforde N., Kurth R., Bannert N. (2009): *Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain*. J Virol. 2009 Dec;83(24):12790-800. doi:10.1128/JVI.01368-09
- Hohn O., Hanke K. and Bannert N. (2013): *HERV-K(HML-2), the best preserved family of HERVs: endogenization, expression, and implications in health and disease*. Frontiers in Oncology, September 2013, Volume 3, Article 246.
- Holt M. P., Shevach E. M. and Punkosdy G. A. (2013): *Endogenous mouse mammary tumor viruses (Mtv): new roles for an old virus in cancer, infection, and immunity*. Front. Oncol., 26. November 2013. doi:10.3389/fonc.2013.00287
- Hotter D., Bosso M., Jonsson K. L., Krapp C., Stürzel C. M., Das A., Littwitz-Salomon E., Berkhout B., Russ A., Wittmann S., Gramberg T., Zheng Y., Martins L. J., Planelles V., Jakobsen M. R., Hahn B. H., Dittmer U., Sauter D. and Kirchhoff F. (2019): *IFI16 Targets the Transcription Factor Sp1 to Suppress HIV-1 Transcription and Latency Reactivation*. Cell Host & Microbe 25, 858-872, June 12, 2019. doi:10.1016/j.chom.2019.05.002
- Jakobsen M. R., Bak R. O., Andersen A., Berg R. K., Jensen S. B., Jin T., Laustsen A., Hansen K., Ostergaard L., Fitzgerald K. A., Xiao T. S., Mikkelsen J. G., Mogensen T. H. and Paludan S. R. (2013): *IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication*. PNAS, October 23, 2013, E4571-E4580.
- Jin T., Perry A., Jiang J., Smith P., Curry J. A., Unterholzner L., Jiang Z., Horvath G., Rathinam V. A., Johnstone R. W., Hornung V., Latz E., Bowie A. G., Fitzgerald K. A. and Xiao T. S. (2012): *Structures of the HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor*. Immunity 36, 561-571, April 20, 2012. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.014
- Johnson K. E., Chitoki L., Chandran B. (2013): *Herpes Simplex Virus 1 Infection Induces Activation and Subsequent Inhibition of the IFI16 and NLRP3 Inflammasomes*. Journal of Virology. doi:10.1128/JVI.00082-13
- Johnstone R. W., Kerry J. A. and Trapani J. A. (1998): *The Human Interferon-inducible Protein, IFI16, Is a Repressor of Transcription*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 27, Issue of July 3, pp. 17172-17177, 1998.
- Johnstone R. W. and Trapani J. A. (1999): *Transcription and Growth Regulatory Functions of the HIN-200 Family of Proteins*. Molecular and Cellular Biology, Sept. 1999, Vol. 19, No. 9 p.5833-5838.
- Kerur N., Veetil M. V., Sharma-Walia N., Bottero V., Sadagopan S., Otageri P., Chandran B. (2011): *IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection*. Cell Host and Microbe, Volume 9, Issue 5, 19 May 2011, Pages 351-353. doi:10.1016/j.chom.2011.04.008
- Konstantoulas C. J. and Indik S. (2014): *Mouse mammary tumor virus-based vector transduces non-dividing cells, enters the nucleus via a TNPO3-independent pathway and integrates in a less biased fashion than other retroviruses*. Retrovirology 2014, 11:34

- Kurth R. and Bannert N. (2009): *Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses*. International Journal of Cancer, Volume 126, Issue 2. doi:10.1002/ijc.24902
- Lausch V. (2013) *Etablierung eines Verfahrens zur Kombination der Elektronenmikroskopie (EM) mit der Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) sowie Untersuchungen zum Infektionsprozess und der Ultrastruktur des Humanen Endogenen Retrovirus K (HERV-K)*. Dissertation.
- Lee Y. N. (2010): *Reconstitution and Characterization of Human Endogenous Retrovirus-K*. Student Theses and Dissertations. Paper 78.
- Lee Y.N. and Bieniasz P. D. (2007): *Reconstitution of an Infectious Human Endogenous Retrovirus*. PLoS Pathog. 3(1): e10. doi:10.1371/journal.ppat.0030010
- Lefkowitz E. J., Dempsey D. M., Hendrickson R. C., Orton R. J., Siddell S. G. and Donald B. Smith (2017): *Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Nucleic Acids Research, 2018, Vol. 46, Database issue. doi:10.1093/nar/gkx932
- Leroux C., Girard N., Cottin V., Greenland T., Mornex J-F., Archer F. (2006): *Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep*. Vet. Res. 38 (2007) 211-228. doi:10.1051/vetres:2006060
- Li T., Diner A., Chen J. and Cristea I. M. (2012): *Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16*. PNAS, June 26, 2012, Vol. 109, No. 26, p.10558-10563.
- Liechtenstein T., Perez-Janices N. and Escors D. (2013): *Lentiviral Vectors for Cancer Immunotherapy and Clinical Applications*. Cancers 2013, 5, 815-837. doi:10.3390/cancers5030815
- Lo Cigno I., De Andrea M., Borgogna C., Albertini S., Landini M. M., Peretti A., Johnson K. E., Chandran B., Landolfo S., Gariglio M. (2015): *The Nuclear DNA Sensor IFI16 Acts as a Restriction Factor for Human Papillomavirus Replication through Epigenetic Modifications of the Viral Promoters*. Journal of Virology, August 2015, Volume 89, Number 15. doi:10.1128/JM.00013-15
- Longo P. A., Kavran J. M., Kim M-S. and Leahy D. J. (2013): *Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI)*. Methods Enzymol. 2013, 529:227-240. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5
- Löwer R. (1999): *The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies*. Trends in Microbiology, Vol. 7, No. 9, September 1999.
- Löwer R., Löwer J. and Kurth R. (1996): *The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 5177-5184, May 1996.
- Luther S. A. and Acha-Orbea H. (1997): *Mouse Mammary Tumor Virus: Immunological Interplays between Virus and Host*. Advances in Immunology, Vol. 65.
- Mayer J., Ehlhardt S., Seifert M., Sauter M., Müller-Lantzsch N., Mehraein Y., Zang, K-D., Meese E. (2004): *Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity*. Virology, Volume 322, Issue 1, Pages 190-198. doi:10.1016/j.virol.2004.01.023
- Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. (2010): *molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage, Kapitel 18.
- Montejo M. G., Doucet-O'Hare T., Henderson L., Nath A. (2018): *Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review*. Critical Reviews in Microbiology 44(4005):1-24. doi:10.1080/1040841X.2018.1501345
- Ono M., Yasunaga, Miyata T. and Ushikubo H. (1986): *Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome*. Journal of Virology, 1986 Nov, 60(2): 589-598.
- Orzalli M. H., DeLuca N. A. and Knipe D. M. (2012): *Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein*. PNAS October 30, 2012 109 (44) E3008-E3017. doi:10.1073/pnas.1211302109
- Palmarini M., Sharp J. M., De Las Heras M. and Fan H. (1999): *Jaagsiekte Sheep Retrovirus Is Necessary and Sufficient To Induce a Contagious Lung Cancer in Sheep*. Journal of Virology, Aug. 1999, p.6964-6972.

- Peters G., Brookes S., Smith R. and Dickson C. (1983): *Tumorigenesis by Mouse Mammary Tumor Virus: Evidence for a Common Region for Provirus Integration in Mammary Tumors*. Cell, Vol. 33, June 1983.
- Ross S. R. (2010): *Mouse Mammary Tumor Virus Molecular Biology and Oncogenesis*. Viruses 2010, 2, 2000-2012. doi:10.3390/v2092000
- Sastry L., Xu Y., Duffy L., Koop S., Jasti A., Roehl H., Jolly D. and Cornetta K. (2005): *Product-Enhanced Reverse Transcriptase Assay for Replication-Competent Retrovirus and Lentivirus Detection*. Human Gene Therapy 16:1227-1236 (October 2005).
- Schattgen S. A. and Fitzgerald K. A. (2011): *The PYHIN protein family as mediators of host defenses*. Immunological Reviews 2011, Vol. 243: 109-118.
- Seifarth W., Frank O., Zeilfelder U., Spiess B., Greenwood A. D., Hehlmann R., Leib-Mösch C. (2004): *Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Transcriptional Activity in Human Tissues with a Retrovirus-Specific Microarray*. Journal of Virology. doi:10.1128/JVI.79.1.341-352.2005.
- Stoye J. P. (2001): *Endogenous retroviruses: Still active after all these years?* Current Biology 2001, 11:R914-R916. doi:10.1016/S0960-9822(01)00553-X
- Subramanian R. P., Wildschutte J. H., Russo C. and Coffin J. M. (2011): *Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses*. Retrovirology 8, Article number 90 (2011).
- Unterholzner L., Keating S. E., Baran M., Horan K. A., Jensen S. B., Sharma S., Sirois C. M., Jin T., Latz E., Xiao T. S., Fitzgerald K. A., Paludan S. R. and Bowie A. (2010): *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nature Immunology, Volume 11, Number 11, November 2010. doi:10.1038/ni.1932
- Varmus H. (1988): Retroviruses. Articles, Science, Vol. 240, p.1427-1434.
- Vermeire J., Naessens E., Vanderstraeten H., Landi A., Lannucci V., Van Nuffel A., Taghon T., Pizzato M. and Verhasselt B. (2012): *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): e50859. doi:10.1371/journal.pone.0050859
- Weiss R. A. (2006): *The discovery of endogenous retroviruses*. Retrovirology 2006, 3:67. doi:10.1186/1742-4690-3-67
- Xin H., Pereira-Smith O. M. and Choubey D. (2004): *Role of IFI 16 in cellular senescence of human fibroblasts*. Oncogene (2004) 23, 6209-6217. doi:10.1038/sj.onc.1207836
- Zumblick A. (2019): *Restriktion von HERV-K(HML-2) durch IFI-16*. Masterarbeit, nicht veröffentlicht.

Anhang

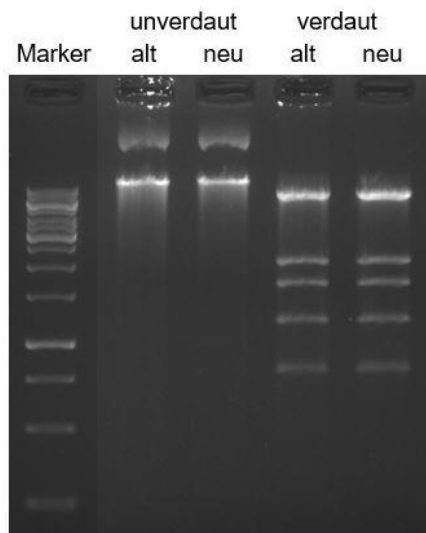


Abbildung A1: Restriktionsverdau von oriST-HERV-K113 mit den Enzymen EcoRI und NotI. Vergleich des neu präparierten Plasmids mit dem alten. Es wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel verwendet und die Elektrophorese erfolgte bei 80 Volt für 60 Minuten. Marker = GeneRuler 1kb.

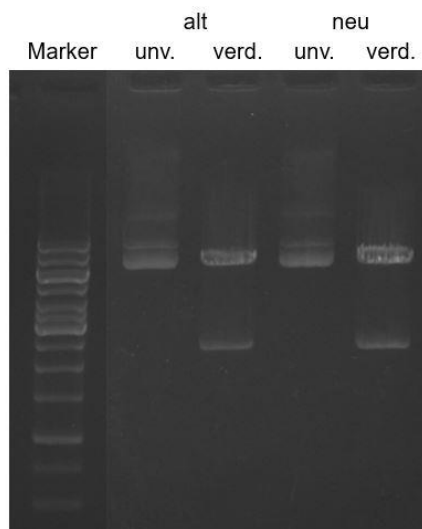


Abbildung A2: Restriktionsverdau von MB5 (IFI16) mit den Enzymen XbaI und MluI. Vergleich des neu präparierten Plasmids mit dem alten. Es wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel verwendet und die Elektrophorese erfolgte bei 90 Volt für 60 Minuten. Marker = GeneRuler 1kb. unv.=unverdaut, verd.=verdaut.

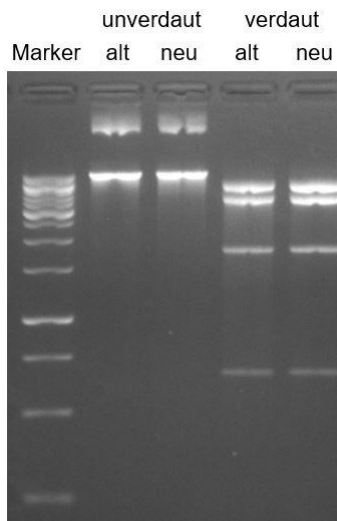


Abbildung A3: Restriktionsverdau von CMV-JSRV mit dem Enzym PstI. Vergleich des neu präparierten Plasmids mit dem alten. Es wurde ein 2%iges Agarose-Gel verwendet und die Elektrophorese erfolgte bei 80 Volt für 60 Minuten. Marker = GeneRuler 1kb.

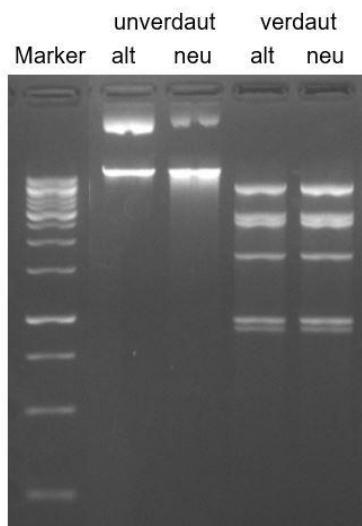


Abbildung A4: Restriktionsverdau von CMV-MMTV mit dem Enzym Aval. Vergleich des neu präparierten Plasmids mit dem alten. Es wurde ein 2%iges Agarose-Gel verwendet und die Elektrophorese erfolgte bei 80 Volt für 60 Minuten. Marker = GeneRuler 1kb.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Norbert Bannert bedanken, der mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit im FG18 am Robert Koch-Institut anzufertigen. Weiterhin möchte ich mich für die Betreuung während der gesamten Zeit, die Beantwortung jeglicher Fragen und schließlich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel bedanken, der netterweise diese Arbeit seitens der FU Berlin begutachtet.

Ich danke allen Mitgliedern des FG18 für das sehr angenehme, nette Arbeitsklima und den regen Austausch über fachliche und auch nicht fachliche Angelegenheiten. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Oliver Hohn bedanken, der mir bei allen fachlichen, sowie technischen Fragen immer weiterhelfen konnte. Weiterhin möchte ich mich bei Monika Jaensch und Martina Keller für die sehr nette technische Unterstützung danken. Einen lieben Dank an Monika auch für die vielen netten Gespräche, die mir den Laboralltag erleichtert haben. Danke auch an Adriana Block, die mir viele gute Anregungen bezüglich meiner Ergebnisse geben konnte.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben, mich immer unterstützen und bedingungslos für mich da sind.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Aylin Savas (Matrikelnummer: 5175580), geboren am 14.06.1993 in Berlin, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem Thema „Inhibition von Betaretroviren durch das interferoninduzierte Protein IFI16“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß anderen Schriften entnommen wurden, sind kenntlich gemacht. Ich erkläre weiterhin, dass diese Arbeit noch nicht im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens eingereicht wurde.

Ort, Datum

Aylin Savas