

## **Westfälische Wilhelms-Universität Münster**

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Zur Erlangung des akademischen Grades Master of Science  
im Studiengang Biowissenschaften

angefertigt am Robert Koch-Institut Berlin

*Fachgebiet 18: HIV und andere Retroviren*

Masterarbeit:

### **Analyse der Restriktion des Humanen Endogenen Retrovirus-K(HML-2) durch das Protein IFI-16**

Eingereicht von:

Josephine Friedrich

Matrikelnummer: 500754

Wintersemester 2020/2021

1. Prüfer: Prof. Dr. Stephan Ludwig
2. Prüfer: Prof. Dr. Norbert Bannert

## Zusammenfassung

Ein Immunsensor für intrazelluläre DNA und viraler Restriktionsfaktor ist das IFI16-Protein. Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der 13-fachen Hemmung der Viruspartikelproduktion von HERV-K(HML-2) durch IFI16. Verwendet wurde dabei der Moleklarklon eines rekonstruierten HERV-K113-Provirus, welcher ein vollständiges Provirus-Genom mit offenem Leserahmen für alle viralen Gene und intakte LTR-Sequenzen besitzt. Als Indikator für die virale Partikelproduktion diente die Aktivität der Reversen Transkriptase, die mithilfe des PERT-Assays bestimmt werden konnte. Der Austausch der U3-Region der 5'LTR mit einem CMV-Promotor resultierte in Außerkraftsetzen der Restriktion. Aufgrund dieser Tatsache wurden im Laufe dieser Arbeit verschiedene Konstrukte generiert, die ermöglichten, die Rolle der LTRs bei der Hemmung von HERV-K113 durch IFI16 zu analysieren. Zu Beginn erfolgte hierfür das Klonieren diverser Luciferase-Konstrukte, die sowohl die Möglichkeit boten, den Effekt von IFI16 auf die alleinstehende 5'LTR und 3'LTR als auch die vollständige LTR von HERV-K113 zu untersuchen. Die Verwendung dieser Luciferase-Konstrukte resultierte jedoch nicht in der Beantwortung der Frage nach der Rolle der LTRs bei der Hemmung von HERV-K113, da keine signifikanten Unterschiede zwischen der entsprechenden Kontrolle und dem IFI16-Expressionsplamid detektiert werden konnten und des Weiteren IFI16 in einigen Zelllinien trotz hoher Transfektionsrate nicht erfolgreich exprimiert wurde. Daher wurden zur Identifikation des funktionellen Bereichs des viralen Genoms, an dem IFI16 seine hemmende Wirkung entfaltet, ergänzende HERV-K(HML-2)-Konstrukte kloniert, die ermöglichen, sukzessiv den Bereich der 5' LTR oder der 3'LTR einzugrenzen. Die gewonnenen Daten stützen die Annahme, dass für die Restriktion von HERV-K113 die LTR eine essenzielle Rolle spielt, waren jedoch nicht in der Lage, den dabei funktionellen Bereich des Genoms näher einzugrenzen. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Masterarbeit humane Zelllinien bezüglich ihrer Transfektionseffizienz und hinsichtlich ihrer Vollängen- oder Teil-IFI16-Expression untersucht. Hierbei sind besonders die überzeugenden Daten der Hek293-T und HeLa-Zellen zu erwähnen. Zudem wurde nachgewiesen, dass der Bereich des IFI16-Proteins, welcher lediglich die Pyrimidomäne plus Linkerbereich umfasst, zur HERV-K(HML-2) Hemmung ausreicht. Dieser Bereich wurde abschließend in einen bicistronischen lentiviralen Vektor kloniert,

damit Reporterviren generiert und die Transduktionseffizienz verschiedener humanen Zelllinien bestimmt.

## **Abstract**

An immune sensor for intracellular DNA and viral restriction factor is the interferon-inducible protein 16 (IFI16). At the beginning of this work, the 13-fold inhibition of the viral particle production of HERV-K(HML-2) by IFI16 was demonstrated using the molecular clone of a reconstituted HERV-K113 provirus, which has a complete provirus genome with open reading frame for all viral genes and intact LTR sequences. Within this master thesis, the activity of reverse transcriptase served as an indicator of viral particle production, which could be determined by using a PERT assay. The exchange of the U3-region of the 5'LTR with a CMV-promoter resulted in the annulment of the restriction. Based on this fact, different constructs were generated during this thesis, which made it possible to analyze the role of the LTR in the inhibition of HERV-K113 by IFI16. Initially, this was done by cloning various luciferase constructs that offered the possibility to study the effect of IFI16 on the stand-alone 5'LTR and 3'LTR as well as on the complete LTR of HERV-K113. However, the use of these luciferase constructs did not result in answering the question of the role of the LTRs in inhibiting HERV-K113, as no significant differences could be detected between the corresponding control and the IFI16 expression plasmid and, further, IFI16 was not successfully expressed in some cell lines despite a high transfection rate. Therefore, to identify the functional region of the viral genome at which IFI16 displays its inhibitory effect, complementary HERV-K(HML-2)-constructs were cloned that allowed successively narrowing down the region of the 5' LTR or the 3'LTR. The obtained data verified the assumption that for the restriction of HERV-K113 by IFI16 the LTR plays an essential role but was not able to further identify the functional region of the genome in more detail. In addition, human cell lines were analyzed in this master thesis regarding their transfection efficiency and their full-length or partial IFI16 expression. Here, the convincing data of Hek293T and HeLa cells are particularly worth mentioning. In addition, the region of IFI16 protein containing only the pyrin domain plus linker region was shown to be sufficient for HERV-K(HML-2) inhibition. This region was finally cloned into a bicistronic lentiviral vector to generate reporter viruses and to determine the transduction efficiency of various human cell lines.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1. Einleitung.....	- 1 -
1.1. Retroviren .....	- 1 -
1.1.1. Struktureller Aufbau .....	- 3 -
1.1.2. Genomischer Aufbau .....	- 4 -
1.1.3. Replikation .....	- 5 -
1.1.4. Humane endogene Retroviren (HERV).....	- 7 -
1.2. Interferon induziertes Protein 16 (IFI16).....	- 8 -
2. Zielsetzung .....	- 11 -
3. Materialien.....	- 12 -
3.1.1. Humane Zelllinien .....	- 12 -
3.1.2. Medien und Puffer.....	- 12 -
3.1.3. Chemisch kompetente Bakterienstämme .....	- 13 -
3.1.4. Enzyme .....	- 14 -
3.1.5. Primer .....	- 14 -
3.1.6. Plasmide .....	- 16 -
3.1.7. Antikörper .....	- 18 -
3.1.8. Chemikalien und Reagenzien .....	- 18 -
3.1.9. Kits.....	- 19 -
3.1.10. Software.....	- 20 -
4. Methoden .....	- 20 -
4.1.1. Zellkulturtechnische Arbeiten.....	- 20 -
4.1.1.1. Auftauen und Einfrieren der Zellen .....	- 20 -
4.1.1.2. Kultivierung, Aussaat und Einfrieren der Zellen .....	- 21 -
4.1.1.3. Transfektion .....	- 22 -

4.1.1.4.	Präparation der Zellen und Zellüberstände .....	- 24 -
4.1.1.5.	Transduktion .....	- 25 -
4.1.2.	Molekularbiologische Arbeiten .....	- 25 -
4.1.2.1.	RNA Extraktion und DNA Verdau .....	- 25 -
4.1.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 26 -
4.1.2.3.	Transformation.....	- 30 -
4.1.2.4.	Plasmidpräparation.....	- 31 -
4.1.2.5.	Restriktion mit Endonukleasen .....	- 32 -
4.1.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion .....	- 33 -
4.1.2.7.	Ligation .....	- 34 -
4.1.2.8.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot .....	- 34 -
4.1.2.9.	Durchflusszytometrie .....	- 36 -
4.1.2.10.	Luciferase-Assay .....	- 37 -
4.1.2.11.	PERT-Assay .....	- 37 -
4.2.	Statistische Auswertung.....	- 39 -
5.	Ergebnisse .....	- 40 -
5.1.	Restriktion von HERV-K113 durch IFI16.....	- 40 -
5.2.	Analyse der Relevanz der viralen LTR in pGL3 Konstrukten .....	- 43 -
5.2.1.	Klonierung eines Luciferase-Konstruktes mit vollständiger LTR .....	- 43 -
5.2.2.	Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien.....	- 49 -
5.2.3.	Restriktion der pGL3 Konstrukte durch IFI16.....	- 50 -
5.2.4.	Restriktion der pGL3 Konstrukte durch die Pyrimidomäne und den Linkerbereich von IFI16.....	- 52 -
5.3.	Analyse der Relevanz der viralen LTR im ori HERV-K113.....	- 54 -
5.3.1.	Analyse der 5'LTR .....	- 54 -
5.3.2.	Analyse der 3'LTR .....	- 57 -

5.4.	Expression von IFI16 und seiner PYD plus Linkerregion .....	- 62 -
5.5.	Transduktion von IFI16 .....	- 64 -
5.5.1.	Klonierung der Transduktionsvektoren .....	- 65 -
5.5.2.	Restriktion von HERV-K113 durch die IFI16 PYD plus Linkerbereich..	- 66 -
5.5.3.	Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien .....	- 68 -
6.	Diskussion .....	- 70 -
7.	Ausblick .....	- 85 -
8.	Anhang .....	- 86 -
8.1.	Klonierung eines Luciferase-Konstruktes mit vollständiger LTR .....	- 86 -
8.2.	Transfektionseffizienz .....	- 89 -
8.3.	Transduktion von IFI16 .....	- 90 -
8.4.	Transduktionseffizienz .....	- 91 -
9.	References .....	- 92 -

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Phylogenie der Retroviren	- 2 -
Abbildung 1-2: Aufbau eines retroviralen Viruspartikel	- 3 -
Abbildung 1-3: RNA-Genom eines infektiösen Partikels	- 4 -
Abbildung 1-4: Integrierte Provirus DNA	- 6 -
Abbildung 1-5: Retrovirale Replikation und Partikelproduktion	- 6 -
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der PYHIN Protein Familie	- 9 -
Abbildung 3-1: Reaktionsprinzip PERT	- 39 -
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung ori/ oriST HERV-K113	- 40 -
Abbildung 4-2: Restriktion von oriST HERV-K113 durch IFI16	- 41 -
Abbildung 4-3: Restriktion von CMV_oriST HERV-K113 durch IFI16	- 42 -
Abbildung 4-4: Schematische Darstellung CMV_oriST HERV-K113	- 42 -
Abbildung 4-5: Restriktionsverdau der Luciferase-Konstrukte mit LTR	- 46 -
Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der pGL3 Konstrukte	- 47 -
Abbildung 4-7: Restriktion der pGL3 Konstrukte in Hek293T durch IFI16	- 48 -
Abbildung 4-8: Transfektionseffizienz der verschiedenen humanen Zelllinien	- 49 -
Abbildung 4-9: Restriktion der pGL3 Konstrukte in verschiedenen Zelllinien durch IFI16	- 51 -
Abbildung 4-10: Restriktion der pGL3 Konstrukte in verschiedenen Zelllinien durch die PYD plus Linkerbereich	- 53 -
Abbildung 4-11: Schematische Darstellung der erhaltenen Moleklarklone zur Analyse der 5'LTR	- 55 -
Abbildung 4-12: Luciferase Aktivität der ori- Luciferase-Konstrukte in verschiedenen Zelllinien	- 56 -
Abbildung 4-13: Schematische Darstellung der 3'LTR Konstrukte	- 58 -
Abbildung 4-14: Restriktion der 3'LTR Konstrukte durch IFI16	- 61 -
Abbildung 4-15: Nachweis von IFI16 mittels Western-Blot-Analyse	- 63 -
Abbildung 4-16: Nachweis der IFI16 PYD plus Linkerregion mittels Western-Blot-Analyse	- 63 -
Abbildung 4-17: Restriktionsverdau des Transduktionsvektors	- 66 -
Abbildung 4-18: Restriktion von ori HERV-K113 durch die IFI16 PYD plus Linkerbereich	- 67 -

Abbildung 4-19: Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien	- 69 -
Abbildung 7-1: Vektorkarte des pGL3 basic	- 86 -
Abbildung 7-2: Amplifikations-PCR und Restriktionsverdau mit XbaI/SalI	- 87 -
Abbildung 7-3: Restriktionsverdau mit (A) XbaI/SalI und (B) KpnI/XbaI	- 88 -
Abbildung 7-4: Transfektionseffizienz der verschiedenen humanen Zelllinien	- 89 -
Abbildung 7-5: Vektorkarte des pLVX-IRES-ZsGreen1	- 90 -
Abbildung 7-6: Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien	- 91 -

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Humane Zelllinien und ihr Ursprung.....	- 12 -
Tabelle 3-2: Medien .....	- 12 -
Tabelle 3-3: Bakterienstämme .....	- 13 -
Tabelle 3-4: Enzyme .....	- 14 -
Tabelle 3-5: Primer und ihre Sequenzen .....	- 14 -
Tabelle 3-6: Verwendete Plasmide .....	- 16 -
Tabelle 3-7: Antikörper und ihre Verdünnungen .....	- 18 -
Tabelle 3-8: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	- 18 -
Tabelle 3-9: Kits und die entsprechenden Hersteller .....	- 19 -
Tabelle 3-10: Software.....	- 20 -
Tabelle 3-11: Reaktionsansatz zur Virusproduktion.....	- 23 -
Tabelle 3-12: Reaktionsansatz Amplifikations-PCR.....	- 27 -
Tabelle 3-13: Temperaturprogramm Amplifikations-PCR .....	- 27 -
Tabelle 3-14: Reaktionsansatz Sequenzierungs-PCR.....	- 28 -
Tabelle 3-15: Temperaturprogramm Sequenzierungs-PCR.....	- 28 -
Tabelle 3-16: Reaktionsansatz RT-qPCR .....	- 29 -
Tabelle 3-17: Reaktionsansatz der Negativkontrolle RT-qPCR .....	- 29 -
Tabelle 3-18: Temperaturprogramm RT-qPCR.....	- 30 -
Tabelle 3-19: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes .....	- 34 -
Tabelle 3-20: Ansatz für zwei Gele .....	- 35 -
Tabelle 3-21: Reaktionsansatz PERT-Assay .....	- 38 -
Tabelle 3-22: Temperaturprogram PERT-Assay.....	- 38 -
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Luciferase-Assays .....	- 57 -

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
cDNA	(engl.: <i>complementary DNA</i> ) komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTE	(engl.: <i>constitutive transport element</i> ) Transport Element
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
env	Virales Genom für Hüllproteine
FACS	(engl.: <i>fluorescence-activated cell sorting</i> ) Durchflusszytometrie
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FBS	(engl.: <i>fetal bovine serum</i> ) fetales Kälberserum
g	Zentrifugalkraft
gag	Gruppen-spezifische Antigene
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HERV-K113	HERV-K113 (HML-2)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HML-2	<i>Human mouse mammary tumor virus like-2</i>
IFI16	Interferon-induzierbares Protein 16
IN	Integrase
JF	Josephine Friedrich
Kan	Kanamycin

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	(engl.: <i>lysogeny broth</i> ) komplexes Nährmedium
LTR	(engl.: <i>long terminal repeats</i> ) lange DNA-Wiederholungseinheit
M	Marker
MCS	(engl. <i>multiple cloning site</i> ) modifizierten Restriktionsschnittstellenbox
min	Minute
ml	Milliliter
MMTV	Maus-Mammatumor Virus
mRNA	Messenger RNA
n.p.	Nicht publiziert
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NI	Nicht infizierte Kontrolle
NLS	(engl.: <i>nuclear localization signal</i> ) Kernlokalisierungssignal
NT	Nicht transfizierte Kontrolle
NTC	(engl.: <i>no template control</i> ) Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
ORF	(engl.: <i>open reading frame</i> ) offene Leserahmen
P + L	Pyrindomäne und Linkerbereich
PBS	(engl.: <i>phosphate buffered saline</i> ) phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	(engl.: <i>polymerase chain reaction</i> ) Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PERT	<i>qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase</i>
PFA	Paraformaldehyd
<i>pol</i>	Retrovirales Genom für enzymatische Aktivitäten
PR	Protease
PYD	Pyrindomäne
RcRE	(engl.: <i>Rec responsive element</i> ) Transport Element
Rec	Virales Protein
Rev	Virales Protein
RLU	(engl.: <i>relative light unit</i> )

RNA	Ribonukleinsäure
RRE	(engl.: <i>Rev responsive element</i> ) Transport Element
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
rxn	Reaktionsansatz
s	Sekunde
SDS	(engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide</i> ) Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	(engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
U3/U5	<i>Unique Region 3/5</i>
XMRV	(engl.: <i>Xenotropic murine leukemia virus-related virus</i> )
α	anti

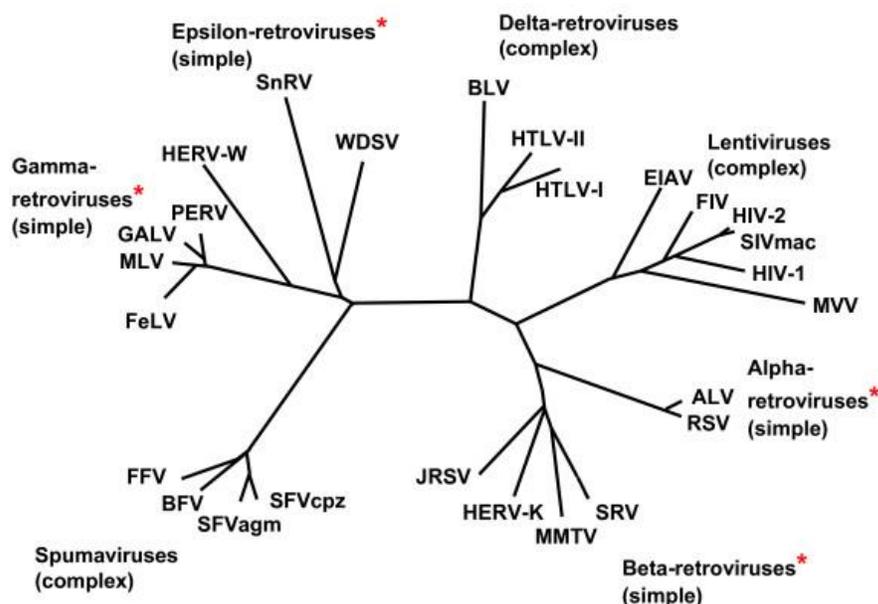
## 1. Einleitung

### 1.1. Retroviren

Bereits vor über 110 Jahren konnten Retroviren durch Ellermann und Bang erstmalig beschrieben werden. Die beiden waren in der Lage zu zeigen, dass Leukämie bei Mäusen durch Ultrazentrifugate übertragen werden kann [Ellermann & Bang; 1909]. In den darauffolgenden Jahren wurden viele weitere Entdeckungen und Fortschritte in der retroviralen Forschung gemacht und unser Wissen über die Familie der Retroviren ist bereits sehr komplex. Einige Fragestellungen sind jedoch weiterhin zu beantworten.

Die Retroviren bilden die Familie der *Retroviridae*. Diese besitzt ein umhülltes, in zweifacher Ausführung vorliegendes einzelsträngiges RNA Genom, welches in der Lage ist, mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase ihre ssRNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Des Weiteren besitzt die Familie der Retroviren das onkogene Potential, ihr in DNA-vorliegendes, Genom in das Wirtsgenom zu integrieren. Dies stellt das sogenannte Provirus dar [Coffin *et al.*; 1997].

Die Retroviren können in zwei große Unterfamilien eingeteilt werden. Zum einen die Retroviren mit einfachem Genom und zum anderen die Retroviren mit einem komplexen Genom. Die Unterteilung erfolgt aufgrund von Besonderheiten bei der Infektion und zusätzlich anhand von morphologischen und genetischen Unterschieden. Einfache Retroviren besitzen die genetischen Informationen für die gruppenspezifischen Antigene (*gag*), enzymatische Proteine (*pol*) und Glykoproteine (*env*). In diese Untergruppe gehören die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Retroviren. Zu der Untergruppe der komplexen Retroviren gehören die  $\delta$ -, *Lenti*- und *Spumaviren*, welche in der Lage sind, weitere spezifische Proteine zu codieren [Löwer; 1999; Modrow *et al.*; 2003]. Die Unterteilung der Retroviren ist vereinfacht in folgender Abbildung dargestellt:



**Abbildung 1-1: Phylogenie der Retroviren**

Unterteilung der Retroviren anhand ihrer spezifischen Eigenschaften. Gattungen, welche ein endogenes Genom enthalten, sind mit einem roten Sternchen markiert. Abbildung entnommen aus [Weiss; 2006].

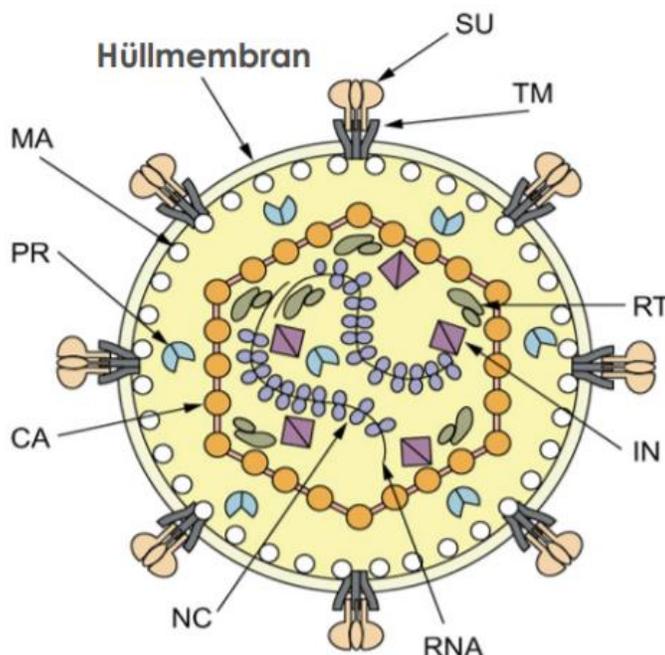
Weiterhin kann man bei den Retroviren zwischen *endogenen* und *exogenen* Viren unterscheiden. Endogene Viren sind das Resultat der Endogenisierung ehemals exogener Viren, welche zuvor in der Lage waren, ein oder mehrmals in das Genom zu integrieren. Ihre Übertragung erfolgt vertikal über die Keimbahnzellen und sie sind heutzutage in einer Vielzahl von Zellen des Organismus nachweisbar. Unter bestimmten Bedingungen können diese aktiviert werden und es folgt die Produktion von exogenen und infektiösen Viruspartikeln. Jedoch ist dies nur bei wenigen Vertretern der endogenen Retroviren möglich, da viele der bekannten endogenen Viren genetisch nicht mehr vollständig im Wirt vorhanden sind. Alle humanen proviralen Loci, welche heutzutage nachweisbar sind, haben durch Mutationen und Deletionen ihre Replikationsfähigkeit verloren. Sie enthalten lediglich ORF für die long terminal repeats (LTR)-Regionen oder Teile dieser, die das ursprüngliche Provirusgenom flankieren und inaktive virale Proteine. Exogene Viren besitzen im Gegensatz zu den endogenen Retroviren bereits in ihrem Genom alle nötigen Informationen, um einen kompletten Infektionszyklus zu durchlaufen und anschließend funktionelle Viruspartikel zu bilden. Zusätzlich beinhaltet das Genom einiger exogener Retroviren die Sequenz für

spezifische Onkogene. Diese Viren können sich von Organismus zu Organismus verbreiten.

Retroviren sind in der Lage, verschiedene Organismen zu infizieren, jedoch weisen sie speziell bei Wirbeltieren eine hohe Wirtsspezifität auf. Im Anschluss an eine Infektion treten eine Vielzahl von Symptomen auf wie Tumore, Immundefizienz oder neurologische Defekte. Jedoch kann eine Infektion auch einen harmlosen Verlauf nehmen [Modrow *et al.*; 2003].

### 1.1.1. Struktureller Aufbau

Alle infektiösen Partikel der verschiedenen Retroviren haben einen ähnlichen Aufbau und eine Größe von circa 100-120 nm. Anhand von Abbildung 1-2 wird der Aufbau eines humanen endogenen retroviralen (HERV) Partikels erklärt:



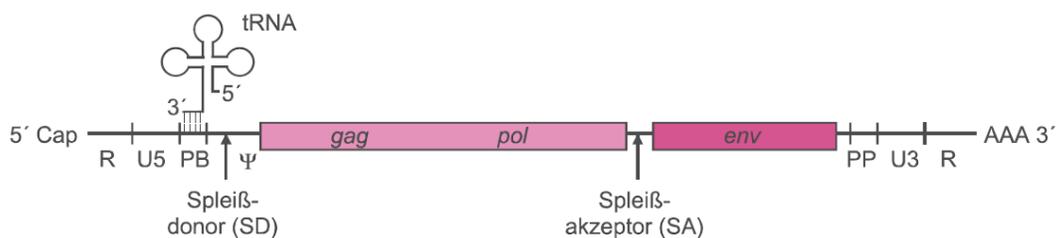
**Abbildung 1-2: Aufbau eines retroviralen Viruspartikel**

Das Virus besteht aus einer Lipidmembran, in der das virale Hüllprotein verankert ist. Matrixproteine umgeben das Capsid, in welchem sich das ssRNA-Genom befindet. Beschriftung siehe Text. Abbildung entnommen und modifiziert aus [Coffin *et al.*; 1997].

Die Viren werden von einer Lipiddoppelmembran umgeben, auf welcher die Hüllproteine, auch Env-Proteine genannt, verankert sind. Der in der Membran verankerte Teil wird als transmembrane Untereinheit (*TM*) bezeichnet und kann mit dem externen Part des Glykoproteins (*SU*) kovalent oder nicht kovalent verbunden sein. Im Inneren des Viruspartikels befinden sich die Matrixproteine (*MA*), welche eine netzähnliche Proteinschicht bilden, aufgrund ihrer Verbindung mit Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran. Im Inneren der Matrixproteine befindet sich das Viruscapsid (*Core*), welches aus Capsidproteinen (*CA*) besteht und je nach Retrovirus unterschiedliche Formen annehmen kann. Das Capsid umhüllt das virale Genom, welches in einzelsträngiger RNA vorliegt. Sie wird mit Nucleocapsid-Proteinen (*NC*) komplexiert und codiert die essenziellen Enzyme: Reverse Transkriptase (*RT*), Integrase (*IN*) und Protease (*PR*) [Coffin *et al.*; 1997; Modrow *et al.*; 2003].

### 1.1.2. Genomischer Aufbau

Das Genom der Retroviren liegt in zweifacher Kopie innerhalb des Capsids vor. Je nach Vertreter der Retroviren weist das Genom eine Länge von 7000 bp, beispielsweise beim MLV (Mausleukämievirus), bis 12000 bp beim humanen Spumaretrovirus auf. Die einzelsträngige RNA weist eine CAP Struktur am 5'- und Polyadenylierung am 3'Ende vor, welche auch bei eukaryotischer mRNA nachweisbar ist. Insgesamt setzt sich das Genom aus zwei regulatorischen Kontrollsequenzen sowie den Genen *gag*, *pol* und *env* zusammen.



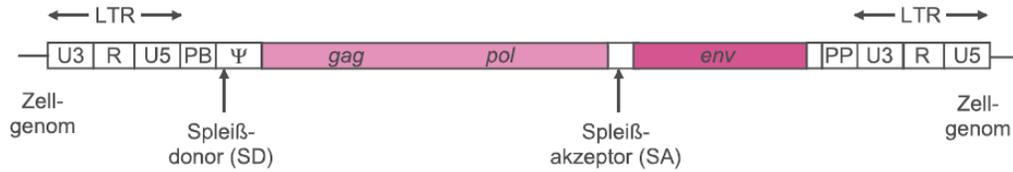
**Abbildung 1-3: RNA-Genom eines infektiösen Partikels**

Dargestellt sind die Sequenzen und Gene, welche in allen Retroviren vorhanden sind. Abbildung entnommen aus [Modrow *et al.*; 2003].

Die R-Region (*redundant*) schließt am 5'-Ende direkt an die CAP Struktur an und am 3'-Ende das virale Genom vor der Polyadenylierung ab. Sie liegt im Genom jeweils mit derselben Basenabfolge und Orientierung zweimal vor. An die R-Region folgt im Bereich der 5'LTR die U5-Region (*unique*), welche die für die Integration des Provirus essenzielle Basensequenz enthält. Darauf folgen eine Primerbindestelle, an welcher die spezifische tRNA binden kann und somit die Polymeraseaktion startet und die sogenannte  $\psi$ -Region, welche für die Verpackung der RNA in Viruspartikel verantwortlich ist. Darauf folgen die Sequenzen für die codierenden Gene *gag*, *pol* und *env*. Das gruppenspezifische Antigen Polyprotein (Gag) bildet die Strukturproteine sowie Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine. Das *pol*-Gen codiert für die essenziellen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR). Abschließend folgt der codierende Bereich für das Glykoprotein im *env*-Gen. Der codierenden Region schließt sich folgend ein Polypurintrakt an, welcher eine essenzielle Rolle bei der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der Reversen Transkription spielt. Abschließend folgt die U3-Region, das Gegenstück zur U5-Region und die erneute R-Region [Modrow *et al.*; 2003; Bannert & Kurth; 2006].

### 1.1.3. Replikation

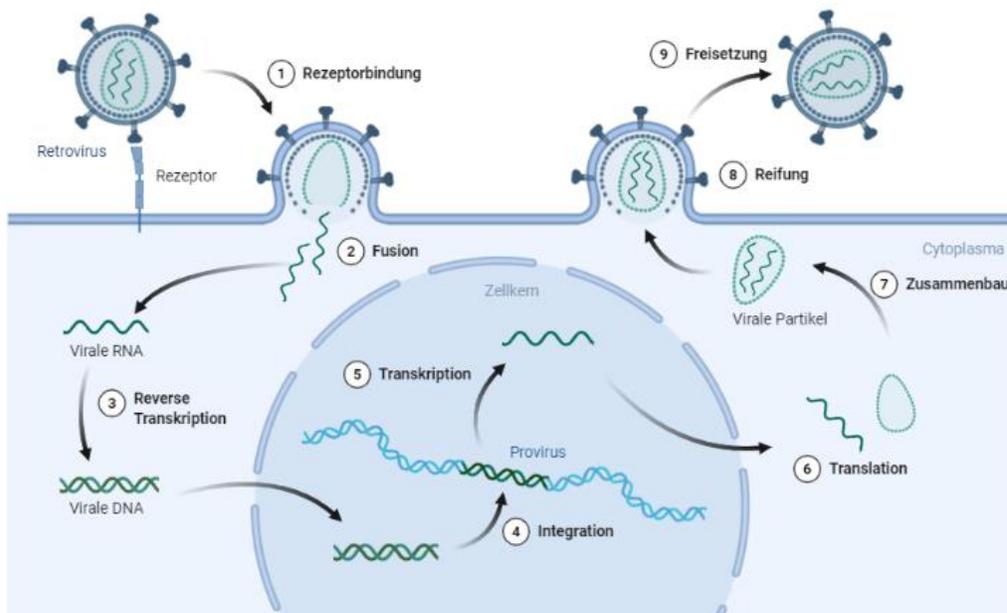
Bei allen Retroviren ist das Env-Protein für die erste Anheftung der viralen Glykoproteine an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle verantwortlich. Der erste Schritt für eine effektive virale Infektion ist somit die Env-vermittelte Fusion zwischen der viralen Hülle und der zellulären Membran [Garcia-Montojo *et al.*; 2018]. Anschließend löst sich das Capsid auf und setzt die viralen Enzyme RT, IN und PR ins Cytoplasma der Zielzelle frei. Es bildet sich mithilfe der zellulären tRNA der reverse Transkriptionskomplex und die RT schreibt daraufhin die einzelsträngige virale RNA in doppelsträngige DNA um [Singh *et al.*; 2020]. Diese wird anschließend in den Zellkern transloziert, durch die Endonuclease- und Ligase- Aktivität der IN in das Wirtsgenom integriert und wird als Provirus bezeichnet [Boris-Lawrie & Temin; 1994].



**Abbildung 1-4: Integrierte Provirus DNA**

Dargestellt ist das Genom des in die Wirtszelle integrierten Provirus. Abbildung entnommen aus [Modrow *et al.*; 2003].

Nach Integration in das Wirtsgenom besitzt das Provirus zwei identische LTRs an beiden Enden, welche als Promotor für die Transkription der viralen DNA dient [Modrow *et al.*; 2003]. Die Integration des Provirus geschieht an einer beliebigen Stelle und kann folglich funktionelle Gene des Wirtes zerstören oder aktivieren. Das Provirus wird anschließend wie die weiteren zellulären Gene transkribiert, in das Cytoplasma transportiert und in die entsprechenden viralen Proteine translatiert. Die vollständig translatierten viralen Proteine lagern sich anschließend erneut zu viralen Partikel zusammen und setzen neue Viren frei, welche weitere Zellen infizieren [Boris-Lawrie & Temin; 1994; Telesnitsky; 2010].



**Abbildung 1-5: Retrovirale Replikation und Partikelproduktion**

Schematische Darstellung des Replikationszyklus und die Herstellung von neuen viralen Partikeln von Retroviren. Abbildung selbstständig erstellt mit BioRender.com

#### 1.1.4. Humane endogene Retroviren (HERV)

Das menschliche Genom enthält eine Vielzahl von endogenen retrovirusähnlichen Sequenzen. Diese humanen endogenen Retroviren sind Überreste von früheren exogenen Viren, welche die Menschheit über Jahrhunderte infiziert hat und welche anschließend erfolgreich über die Keimbahnen weitervererbt wurden. Etwa 8% unseres heutigen Genoms besteht aus Überbleibseln von retroviralen Elementen, vor allem vieler LTR Strukturen [Bannert & Kurth; 2004, 2006].

HERV können anhand ihrer Ähnlichkeit zu anderen Retroviren in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden. Innerhalb dieser Klassen wird in Familien unterteilt. Zu einer der jüngsten Familie gehört HERV-K, welche vor circa. 35 Millionen Jahren in die Keimbahn integriert wurde. Die Familie der humanen endogenen Retroviren vom Typ K (HERV-K) umfasst mehr als 90 fast vollständig erhaltene Mitglieder pro haploidem Genom beim Menschen [Subramanian *et al.*; 2011] und ist bei Altweltaffen und Affen hoch konserviert [Tönjes *et al.*; 1996]. Jedoch hat sie, wie die meisten HERV, ihre Fähigkeit zu Replikation und Produktion von vollständigen viralen Partikeln durch verschiedene Mutationen und Deletionen über die Jahrtausende verloren und ist somit nicht mehr infektiös. Die Namensgebung vieler HERV Familien entstand anhand der Aminosäuren-Spezifität der tRNA, welche an der Primerbindestelle hybridisiert. Dies ist im Falle von HERV-K Lysin [Hohn *et al.*; 2013].

Die HERV-K Familie gehört zu den Betaretroviren (Abbildung 1-1) und wird in weitere Untergruppen eingeteilt. Die am jüngsten integrierten und am besten erhaltenen menschlichen Proviren gehören zu einer Untergruppe der HERV-K-Elemente mit der Bezeichnung HERV-K(HML-2). Die Bezeichnung HML steht hierbei für „Human MMTV-like“ und entstand aufgrund der Ähnlichkeit zu dem Maus-Mammatumor-Virus (MMTV). Mehr als 90 verschiedene Proviren der HML-2-Familie sind gut erhalten und besitzen intakte und funktionale Leserahmen für virale Proteine. Aufgrund dieser Fähigkeit können diese im Menschen kodiert und exprimiert werden [Hohn *et al.*; 2013]. Darüber hinaus haben zwei Forschergruppen gezeigt, dass Konsensus-Sequenzen von HERV-K(HML-2)-Elementen in der Lage sind, infektiöse Partikel zu produzieren [Dewannieux *et al.*; 2006; Lee & Bieniasz; 2007]. HERV-K-Proviren lassen sich in zwei

Typen einteilen. Typ I Proviren haben eine 292-bp-Deletion, die die Expression des sogenannten *rec*-Gens verhindert und exprimieren stattdessen ein alternatives Protein namens Np9 [Armbruster *et al.*; 2002]. Nur Typ II-Proviren exprimieren das akzessorische Rec-Protein, das funktionell dem HIV Rev- und HTLV Rex-Proteinen ähnelt [Magin *et al.*; 1999; Macfarlane & Simmonds; 2004].

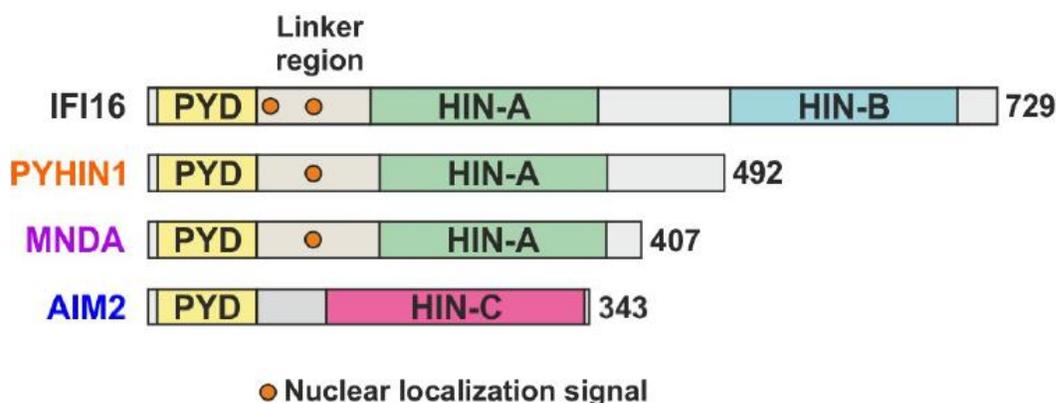
Ein Vertreter der Typ II-Proviren HERV-K(HML-2) Familie ist HERV-K113 [Turner *et al.*; 2001]. Die ursprüngliche Provirus Sequenz ist nicht replikationsfähig und weist einige Punktmutationen auf, die die Funktionalität des *env*-Gens und der RT beeinträchtigen [Beimforde *et al.*; 2008]. Durch die Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts erfolgte die Wiederherstellung der Funktionalität der RT und des *env*-Gens in einem abgeleiteten Molekularklon, dieser wird in der Arbeit als ori HERV-K113 bezeichnet und verwendet [George *et al.*; 2011]. Er besitzt ein infektiöses vollständiges Provirus Genom mit offenem Leserahmen für alle viralen Gene und intakte LTR Sequenzen, welche als Promotor für die Expression der folgenden viralen Proteine wirkt. Das für den Typ II spezifische Rec-Protein wird hoch exprimiert und akkumuliert im Nucleus. Es wurde ebenfalls der oriST HERV-K113 Molekularklon verwendet, in dem alle synonymen postinsertionalen Mutationen revertiert wurden und ein vollständig rekonstruiertes virales Genom vorliegt. Zwischen den beiden Molekularklonen konnten jedoch keine Unterschiede in Bezug auf Morphologie, RT-Aktivität und Proteinexpression gezeigt werden [Lausch; 2013].

## **1.2. Interferon induziertes Protein 16 (IFI16)**

Retroviren können, neben epigenetischen Kontrollmechanismen, durch verschiedene virale Restriktionsfaktoren gehemmt werden. Ein in den letzten beiden Jahren sehr gut beschriebener Restriktionsfaktor für Retroviren ist das Interferon induzierenden Protein 16 (IFI16) [Hotter *et al.*; 2019; Bosso *et al.*; 2020]. IFI16 ist ein Mitglied der IFN-induzierbaren PYHIN-200-Genfamilie und besitzt die Fähigkeit, an verschiedene Zielproteine zu binden und im Gegenzug eine Vielzahl von Zellfunktionen zu beeinflussen, einschließlich der Infektion, Proliferation, Differenzierung, Apoptose/Pyroptose und Seneszenz [Dell'Oste *et al.*; 2015]. Die Wirkung als Restriktionsfaktor konnte bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen bei Lentiviren und

Herpesviren nachgewiesen werden [Horan *et al.*; 2013; Dell'Oste *et al.*; 2015; Hotter *et al.*; 2019]. Die antivirale Wirkung des Proteins bei HERV-K113(HML-2) wurde durch [Zumblick; 2019; Savas; 2020] gezeigt. Allerdings haben viele Viren bereits eine einzigartige Strategie entwickelt, um IFI16 zu antagonisieren, sodass der Mechanismus der Restriktion im Fokus dieser Arbeit stehen soll.

Zu den Interferon-(IFN)-induzierbaren Proteinen der p200-Familie gehören beim Menschen IFI16, MND A, PYHIN1 und AIM2. Diese Proteine besitzen zum einen am N-Terminus eine PYRIN-Domäne, verantwortlich für Protein-Protein-Interaktionen, und zum anderen am C-Terminus eine konservierte Wiederholung von 200-Aminosäureresten (die HIN-200-Domäne), welche es den Proteinen ermöglicht ss- und ds-DNA zu binden [Veeranki & Choubey; 2012].



**Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der PYHIN Protein Familie**

Dargestellt sind die Vertreter der PYHIN Protein Familie: IFI16, PYHIN1, MND A und AIM2 und ihr Aufbau. Abbildung entnommen aus [Bosso *et al.*; 2020].

IFI16 enthält ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (NLS) neben der PYD und ist daher hauptsächlich innerhalb des Zellkerns lokalisiert. Ähnlich zeigen PYHIN1 und MND A eine überwiegende Kernlokalisierung, die durch mindestens ein NLS vermittelt wird. Im Gegensatz dazu fehlt AIM2 ein NLS und ist daher überwiegend im Zytoplasma zu finden [Bosso *et al.*; 2020].

Wie in Abbildung 1-6 dargestellt, besitzt IFI16 zwei HIN-Domänen. Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich eine Serin-Threonin-Prolin reiche Region. Durch

Splicen der IFI16 mRNA entstehen drei verschiedene Unterformen des Proteins mit unterschiedlichen Größen aufgrund unterschiedlicher Anzahl der S/T/P reichen Domäne. [Johnstone & Trapani; 1999].

Die Expression von IFI16 wird hauptsächlich von Typ I ( $\alpha$ - und  $\beta$ -) als auch Typ II ( $\gamma$ -) Interferonen aktiviert. Jedoch kann die Expression ebenfalls durch oxidativen Stress, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie proinflammatorische Moleküle angeregt werden [Mondini *et al.*; 2007].

IFI16 erweist sich als wichtiger antiviraler Restriktionsfaktor und gilt als Immunsensor für intrazelluläre DNA. IFI16 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Abwehr von mikrobiellen Erregern und interagiert nachweislich mit nuklearen herpesviralen DNAs, ist in der Lage die Transkription des humanen Cytomegalovirus (HCMV), des Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1) und Humanes Papillomavirus (HPV) zu hemmen. Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass IFI16 weitere Eigenschaften bekannter antiretroviraler Restriktionsfaktoren teilt und die Genexpression von HIV-1 und anderen Primaten-Lentiviren vollständig hemmt [Bosso *et al.*; 2020].

Die Expression von IFI16 steht ebenfalls in Zusammenhang mit verschiedenen pathogenen Vorgängen. Verschiedene Studien zeigten, dass die meisten menschlichen Krebs-Zelllinien und Tumore IFI16 mRNA und das Protein entweder nicht oder in reduzierten Mengen im Vergleich zu kultivierten normalen menschlichen Epithelzellen exprimieren. [Fujiuchi *et al.*; 2004; Xin *et al.*; 2004; Choubey *et al.*; 2008]. Die Überexpression von IFI16 hingegen fördert eine erhöhte Expression von Genen, die an der Immunmodulation, dem Zellwachstum und der Apoptose beteiligt sind. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen löste IFI16 die Expression von Adhäsionsmolekülen aus und könnte somit eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten spielen [Caposio *et al.*; 2007]. Aufgrund der vielfältigen Rolle von IFI16 auf unterschiedliche Vorgänge der Zelle und Signalwege und die bisher noch wenig vorhandenen Kenntnisse über die dahinterliegenden Mechanismen steht IFI16 in großem Interesse der Forschung.

## 2. Zielsetzung

Eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr von exogenen und endogenen Viren spielen virale Restriktionsfaktoren. Ein Immunsensor für intrazelluläre virale DNA und ein durch IFN- induzierter Restriktionsfaktor ist das 85-95 kDa große Phosphorprotein IFI16. Ziel dieser Arbeit ist zunächst der Nachweis der Hemmung der Partikelproduktion von HERV-K(HML-2) durch IFI16. Als Indikator für die Virusproduktion soll hierbei die Aktivität der Reversen Transkriptase dienen, die mithilfe des PERT-Assays bestimmt werden kann.

IFI16 ist in der Lage, in anderen Viren den LTR Promotor zu hemmen. Aufgrund dessen wird die Annahme überprüft, ob der Austausch der U3-Region der 5' LTR mit einem CMV-Promotor in Außerkraftsetzen der Restriktion resultiert. Auf dem Ergebnis aufbauend sollen anschließend im Laufe dieser Arbeit verschiedene Konstrukte generiert werden, die ermöglichen, die Rolle der LTR bei der Hemmung von HERV-K(HML-2) durch IFI16 näher zu analysieren. Es sollen dabei sowohl Luciferase-Konstrukte kloniert werden, die die Möglichkeit bieten, den Effekt von IFI16 auf die alleinstehende 5'LTR und 3'LTR als auch auf beide flankierenden LTRs in einem Konstrukt von HERV-K(HML-2) zu untersuchen. Mithilfe dieser und zusätzlicher Vektoren soll nach Möglichkeit der genaue Mechanismus und der funktionelle Bereich der viralen LTR identifiziert werden, an dem IFI16 seine hemmende Wirkung entfaltet. Zusätzlich sollen im Rahmen dieser Analysen mehrere humane Zelllinien verwendet werden und diese im Laufe der Arbeit bezüglich ihrer Transfektions- und Transduktionseffizienz mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden, um die bestgeeigneten Zelllinien für weitere Versuche zu identifizieren. Zudem soll erstmalig der Effekt der isolierten IFI16 Pyrimidomäne plus Linkerbereich auf die vorhandenen und selbstständig generierten HERV-K(HML-2)-Konstrukte analysiert werden. Falls dieser essenzielle IFI16-Bereich allein die Hemmung induziert, soll er daraufhin in einen bicistronischen lentiviralen Vektor kloniert werden. Hiermit sollen abschließend Reporterviren generiert und die Transduktionseffizienz von humanen Zelllinien überprüft werden. Ziel ist es hierbei, für weitergehende Experimente möglichst hohe Transduktionsraten zu generieren.

### 3. Materialien

#### 3.1.1. Humane Zelllinien

Tabelle 3-1: Humane Zelllinien und ihr Ursprung

Zelllinie	Ursprung
GH	Teratokarzinom
Hek293T	Embryonale Niere
HeLa	Gebärmutterhalstumor
SK-Mel28	Melanom
Tera-1	Teratokarzinom

#### 3.1.2. Medien und Puffer

Tabelle 3-2: Medien

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

#### Zell-Kultivierungsmedium

- DMEM
- 10% Fetales Kälberserum
- 1% Penicillin/ Streptomycin

#### Einfriermedium

- Kultivierungsmedium
- 10% DMSO

## Western Blot Reagenzien

### ***2x Protein Proben Lyse Buffer***

- 2 mM EDTA
- 100 mM Tris-acetat (pH=7,5)
- 4% SDS
- 20% Glycerin
- 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol
- 0,02% Bromphenolblau

### ***10x Lauf-Puffer***

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycerin
- 1% SDS SDS

### ***10x Blotting-Puffer***

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycerin
- 20% Methanol
- pH = 8,3

### **3.1.3. Chemisch kompetente Bakterienstämme**

Tabelle 3-3: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
One Shot™ Stble3™	Thermo Fisher Scientific
One Shot™ TOP10	Thermo Fisher Scientific

### 3.1.4. Enzyme

Tabelle 3-4: Enzyme

Enzym	Hersteller
AgeI	New England Biolabs
ApaI	New England Biolabs
BamHI	New England Biolabs
BshTI	New England Biolabs
DpnI	Thermo Fisher Scientific
EcoRI	New England Biolabs
HindIII	Thermo Fisher Scientific
KpnI	Thermo Fisher Scientific
MluI	New England Biolabs
NotI	Thermo Fisher Scientific
PmeI	New England Biolabs
PstI	Thermo Fisher Scientific
SacI	New England Biolabs
Sall	Thermo Fisher Scientific
XbaI	New England Biolabs
XbaI	Thermo Fisher Scientific

### 3.1.5. Primer

Tabelle 3-5: Primer und ihre Sequenzen

Primer	Sequenz
ApaI_Luc_fw	CGAGGGCCCATGGAAGACGCCAAAAAC
For9	AAGAGCAGAGTTGGTTGCAG
ForJF1	AGCGCATCTAGATGTGGGGAAAAGCAAGAGAGATC AG
HERV pFor	CCAACGTGGAGGCTTTTCTCTAG
HERV Probe (FAM)	6FAM-AGGTACGCTCGAGCGTGGTCATTGAGG-BBQ
HERV pVL-Rev1 (Fox)	ATCACCTAGCTTCTTCCGA
HERV_RcRE_AgeI_fw	GGCAAGACCGGTAACAGATGCTTGAAGGCAG

HERV_RcRE_NotI_rev	CCAAGCGGCCGCCATACACATAAACATCTCAGTGCT
HindIII_Luc_F	GTCAAAGCTTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTG
HIV-RRE_AgeI_fw	CGACCGGTACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGC
HIV-RRE_NotI_rev	GGTAGCGGCCGCTATTACTCCAAGTCCACTAGCATTCCAAG GCACAG
KpnI_5LTR-F	ACGTGGTACCGAGCTCTTACGCGTTGTGGGG
Luc_N-term_R	CCTTATGCAGTTGCTCTCC
Luci_C-term-for	GTACCGAAAGGTCTTACCG
Luci_SacI_rev	GCTGAGCTCTTACACGGCGATCTTTCC
M13 forward	ACGTTGTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
MS2-PERT-Probe (FAM)	6FAM-TCTTTAGCGAGACGCTACCATGGCTA-BHQ1
PERT-F	TCCTGCTCAACTTCCTGTCGAG
PERT-R	CACAGGTCAAACCTCCTAGGAATG
RevJF1	ATAGTTGTCGACTGTAGGGGTGGGTTGCCCTACA C
RT_AgeI_NotI_rev	GTAGCGGCCGCGCATTACACCGGTCAAAGCATGA AGTTCT
SacI_RT_fw	GGCGGAGCTCTTCAACCAGTTAGAGAAAAG
Sall_Luc_fw	GCAGTCGACATGGAAGACGCCAAAAC
XMRV_CTE_AgeI-fw	CGACCGGTCACCAGACTAAGAAGTCTAGAACCTCGCT GG
XMRV_CTE_NotI_rev	CGTAGCGGCCGCGAGCGGTGGGGGTTGTCAGC

Selbstdesignte Primer wurden durch die Laborleitung bei *Integrated DNA Technologies* bestellt.

### 3.1.6. Plasmide

Tabelle 3-6: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
CMV_oriST HERV-K113	oriST HERV-K Molekularklon mit einem CMV-Promotor	[Lausch; 2013] n.p
MB20	Expressionsplasmid IFI16 Pyrindomäne und Linkerbereich	[Hotter <i>et al.</i> ; 2019]
MB3	Kontrollplasmid (Leervektor)	[Hotter <i>et al.</i> ; 2019]
MB5	Expressionsplasmid IFI16	[Hotter <i>et al.</i> ; 2019]
ori HERV-K113	HERV-K Molekularklon	[Chudak <i>et al.</i> ; 2013]
ori HERV-K113 Luci	ori HERV-K Molekularklon mit Luciferase-Gen hinter der 5'LTR	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert; A. Dohme
ori HERV-K113 Luci $\Delta$ 5'LTR	ori HERV-K Molekularklon mit Luciferase-Gen statt der 5'LTR	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert; A. Dohme
ori HERV-K113 $\Delta$ 3'LTR	ori HERV-K Molekularklon mit deletierter 3'LTR	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert; A. Dohme
ori HERV-K113 $\Delta$ 3'LTR_HERV_RcRE	ori HERV-K Molekularklon mit deletierter 3'LTR und eingebrachten RcRE	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert; A. Dohme
ori HERV-K113 $\Delta$ 3'LTR_HIV_RRE	ori HERV-K Molekularklon mit deletierter 3'LTR und eingebrachten RRE	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert; A. Dohme
ori HERV-K113 $\Delta$ 3'LTR_XMRV_CTE	ori HERV-K Molekularklon mit deletierter 3'LTR und eingebrachten CTE	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert; A. Dohme

oriST HERV-K113	HERV-K Molekularklon mit Rückmutation der nicht synonymen und stillen Mutationen	[Lausch; 2013] n.p
pCR™4	Subklonierungsvektor aus TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing	Thermo Fisher Scientific
pGL3 3' LTR	HERV-K113 3'LTR im pGL3 basic Vektor	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert
pGL3 5' LTR	HERV-K113 5'LTR im pGL3 basic Vektor	[Zumblick; 2019] n.p.
pGL3 basic	Luciferase-Kontrollplasmid (Leervektor)	Promega
pGL3 full LTR	Vollständige HERV-K113 LTR im pGL3 basic Vektor	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert
pLVX-IRES-ZsGreen1	Bicistronisches lentivirales Kontrollplasmid mit grün fluoreszierendem Gen (Leervektor)	Clontech
pLVX-IRES-ZsGreen1-IFI16 P+L	Lentiviraler Expressionsvektor mit grün fluoreszierendem Gen und IFI 16 P + L	Im Rahmen dieser Arbeit konstruiert
pMAX-GFP	Expressionsvektor für GFP	Lonza
psPAX2	Lentiviraler Verpackungsvektor	Didier Trono (Addgene Plasmid #12260)
Rec	Rec Expressionsplasmid	Hanke et al.
Rev	Rev Expressionsplasmid	O. Cingöz; Robert Koch-Institut
Staufen-1	Plasmid zur Partikelerhöhung	[Hanke <i>et al.</i> ; 2013]
VSV-G	Glykoprotein des Vesicular stomatitis virus (VSV)	[Gee <i>et al.</i> ; 2020] (Addgene Plasmid #138479)

### 3.1.7. Antikörper

Tabelle 3-7: Antikörper und ihre Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung	Wirt	Hersteller
$\alpha$ -GAPDH	1:5000	Rabbit	Sigma Aldrich
$\alpha$ -IFI16	1:500	Mouse	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -mouse IRDye®680LT	1:3000	Goat	LI-COR Biosciences
$\alpha$ -rabbit IRDye®800LT	1:3000	Goat	LI-COR Biosciences

### 3.1.8. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3-8: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Artikel	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth
2x Protein Proben Lyse Buffer	Robert Koch-Institut
6x Purple Loading Dye	New England Biolabs
99% Ethanol	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
APS	Roth
Blocking Buffer for Fluorescent Western Blotting	Rockland
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter
Cut Smart Buffer	New England Biolabs
dH <sub>2</sub> O	Robert Koch-Institut
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fast Digest Buffer	Thermo Fisher Scientific
Fast Digest Green Buffer	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Roth

MS2-RNA-Template	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Phosphate Buffered Saline (PBS), 1x	Robert Koch-Institut
Resolving Gel Buffer (0,5M Tris)	Bio-Rad
Resolving Gel Buffer (1,5M Tris)	Bio-Rad
RNase freies Wasser	Qiagen
RNase Out™ (40U/μl)	Invitrogen
Rotiphorese® 50x TAE Puffer	Roth
Rotiphorese® Gel 30	Roth
SDS	Roth
SensiFAST™ Probe No-ROX Master Mix	Bioline
TEMED	Sigma Aldrich
Trypsin/ EDTA Lösung	Sigma Aldrich
Tween20	Roth

Weitere Standard-Chemikalien und Substanzen werden von Standard-Herstellern wie Roth, Merck, Sigma-Aldrich oder Thermo Fisher Scientific verwendet.

### 3.1.9. Kits

Tabelle 3-9: Kits und die entsprechenden Hersteller

Kit	Hersteller
DreamTaq™ Hot Start Green DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamin™ 3000 Reagent	Invitrogen
Luciferase 1000 Assay System	Promega
Plasmid Mini, Midi and Maxi Kit	Qiagen
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
Quick Ligation™ Kit	New England BioLabs®
SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step Master Mix	Bioline

SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen
TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing	Thermo Fisher Scientific
TURBO DNA- <i>free</i> ™ Kit	Thermo Fisher Scientific

### 3.1.10. Software

Tabelle 3-10: Software

Software	Hersteller
CFX Maestro	Bio-Rad
Geneious Prime	Biomatters
GraphPad Prism	GraphPad
ImageJ	NIH
Microsoft Office	Microsoft
NanoDrop® 1000	Thermo Fisher Scientific

## 4. Methoden

### 4.1.1. Zellkulturtechnische Arbeiten

Die verschiedenen Zelllinien wurden durch die Arbeitsgruppe FG18 des Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellt. Bis zur Verwendung werden diese im Stickstofftank gelagert. Jegliche experimentelle Arbeit mit den Zellkulturen findet unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank statt.

#### 4.1.1.1. Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zur Konservierung der Zellen lagern diese im Einfriermedium eingefroren. Zum Auftauen werden diese aus dem Stickstofftank entnommen. Um die Zellen während des Auftauens so wenig wie möglich zu schädigen, wird das Kryoröhrchen kurz im Wasserbad geschwenkt und angetaut. Anschließend erfolgt das Verdünnen des Einfriermediums mit 20 ml 37°C warmen, serumhaltigen Kulturmedium. Darauf folgt ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 g. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Pellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die

Suspension wird in eine T25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt, sukzessiv auf größere Kulturflaschen erweitert und das Medium alle 3-5 Tage gewechselt.

Nach Beendigung eines Experiments wurden die verbliebenden Zellen eingefroren. Hierfür werden die Zellen mit PBS gewaschen, vom Boden der Zellkulturflasche mithilfe von Trypsin-EDTA gelöst, in ein Falcon überführt, am automatischen Zellzähler gezählt und anschließend zentrifugiert für 10 min bei 300 g. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in Einfriermedium gelöst, wobei das Volumen so gewählt wurde, dass eine Zellmenge von einer Millionen-(SK-Mel28, GH, HeLa, Tera-1) beziehungsweise zehn Millionen-(Hek293T) Zellen pro Milliliter erhalten wurde. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C für mindestens 24 h eingefroren. Abschließend werden die Aliquots in den Stickstofftank überführt und dort bis zur Verwendung durch Dritte gelagert.

#### **4.1.1.2. Kultivierung, Aussaat und Einfrieren der Zellen**

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt in T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Ab einer Konfluenz von 80% werden die Zellen verdünnt zur weiteren Kultivierung oder je nach Art des Experiments genutzt. Hierfür wird zunächst das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Trypsinierung der Zellen durch Zugabe einer Trypsin-EDTA Lösung für circa 1-10 min bei 37°C je nach Zelllinie. Nach dem Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wird die Enzymlösung durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgesättigt, die Reaktion somit gestoppt und die Zellkulturflasche ausgespült. Die komplette Zellsuspension wird in ein Falcon überführt. Zum Verdünnen der Zellen werden einige Milliliter Zellsuspension mit neuem Kulturmedium verdünnt und in die Zellkulturflasche zurückgegeben. Zur weiteren Verwendung für Experimente erfolgt die Zellzahlbestimmung mit Hilfe des automatischen Zellzählers der Firma *Coulter*. Hierfür werden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml isotonischer Lösung (*Coulter Isoton Diluent*) verdünnt und vermessen. Die ausgezählten Zellen werden entsprechend dem geplanten Versuch mit der passenden Konzentration in Platten oder Flaschen ausgesät und am darauffolgenden Tag verwendet.

#### 4.1.1.3. Transfektion

Transfektion bezeichnet den Vorgang, bei welchem fremde Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen eingebracht werden, woraufhin es bei der transienten Transfektion zur vorübergehenden Expression des Fremdgens kommt.

Zum einen wird als Transfektionsreagenz Lipofectamin verwendet. Lipofectamin besteht aus einer Vielzahl Lipid-Untereinheiten, welche in wässriger Umgebung kationische Liposomen bilden. Diese sind in der Lage, negativ geladene DNA zu komplexieren. Anschließend wird mithilfe eines Helfer-Lipids der Komplex fertig gestellt, die elektrostatische Abstoßung der Zellmembran überwunden und die DNA in die Zielzelle aufgenommen.

Für eine erfolgreiche Transfektion wird mit dem Kit von Thermo Fisher Scientific gearbeitet und dieses nach Herstellerangaben verwendet. Am Tag zuvor werden Zellen in Zellkultur Platten mit entsprechender Zellzahl ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Tag der Transfektion erfolgt das Auftauen der Reagenzien und Plasmide und das Überprüfen der Konfluenz. Die Zellkonfluenz beträgt zur optimalen Transfektion 70-90%. Pro Well werden in einem Reaktionsgefäß die jeweilige Menge an DNA und P3000 Reagent in DMEM gelöst. Parallel erfolgt das Lösen von der entsprechenden Menge an Lipofectamin in DMEM pro Well in einem weiteren Reaktionsgefäß. Anschließend wird die verdünnte DNA in das Reaktionsgefäß, welches Lipofectamin enthält, überführt, gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Reaktionszeit erfolgt das Entfernen des Mediums der Zellen und die Zugabe von neuem Kulturmedium. Abschließend wird der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen getropft und diese werden für weitere 48 h bis zur Probennahme im Brutschrank inkubiert.

Zur Durchführung von Transduktions-Experimenten wird eine große Anzahl an Viren benötigt. Zur Herstellung dieser müssen verschiedene Plasmide kotransfiziert werden. Das pVLX-IRES-ZsGreen1-Konstrukt produziert das virale Genome, welches das Reporter gen ZsGreen1 enthält, zur späteren Überprüfung der erfolgreichen Transduktion. Die Strukturproteine werden mithilfe vom psPAX2 Vektor erhalten. VSV-G ist das Glykoprotein des *Vesicular stomatitis virus*, welches als Hüllprotein und zur

Bindung des Virus am Wirt dient. Die Herstellung der Viren und die Transfektion erfolgt in T300 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit Polyethylenimin, einem kationischen Polymer. Aufgrund der vielen enthaltenden Aminosäuren besitzt PEI eine starke positive Ladung und ist in der Lage, negative geladene DNA in großen Mengen zu binden. Der erhaltene Komplex hilft der Zelle, die enthaltene Plasmid-DNA aufzunehmen und diese anschließend vorübergehend zu exprimieren. Für eine erfolgreiche Transfektion werden am Tag zuvor in einer T300 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen Hek293T mit entsprechender Zellzahl ausgesät. Am Tag der Transfektion erfolgt das Überprüfen der Konfluenz, welche bei 70-80% liegen sollte. Die Reagenzien werden anschließend aufgetaut und der Transfektionsansatz mit folgender Zusammensetzung angesetzt:

**Tabelle 4-1: Reaktionsansatz zur Virusproduktion**

Reagenz	Konzentration [ $\mu$ g]/ Flasche
psPAX2	22
VSV-G	6
pVLX-IRES-ZsGreen1-Konstrukt	22
PEI	150
DMEMbasal	Auf 4 ml

Bei dem Plasmid psPAX2 handelt es sich um ein Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) lentivirales Verpackungsplasmid [Cribbs *et al.*; 2013]. VSV-G bezeichnet das Hüllprotein (G-Protein) des Vesicular stomatitis Virus, welches Tiere infiziert. VSV-G vermittelt die Adsorption des Viruspartikels an zelluläre Rezeptoren und die damit zusammenhängende Membranfusion [Ci *et al.*; 2018]. Um vollständige, zur Transduktion geeignete Partikel zu bilden, werden alle drei Plasmide benötigt. Nach Vermengen der Komponenten erfolgt eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur. In dieser Zeit wird das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen entfernt und frisches Kulturmedium hinzugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Flaschen aufrecht gestellt, der Transfektionsansatz zum Kulturmedium zugefügt, gemischt und durch waagerechte Lagerung der Flaschen bei 37°C die Zellen transfiziert. Nach 6 h erfolgt ein Medienwechsel und die Inkubation der Zellen für weitere 48 h.

#### 4.1.1.4. Präparation der Zellen und Zellüberstände

48 h nach Transfektion wird der Überstand der Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 300 g zur Entfernung von Zelltrümmern. Darauffolgend wird der erhaltene zellfreie Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Der Überstand wird erneut bei 4°C, 15000 g für 4 Stunden zentrifugiert und vorsichtig verworfen. Es folgt das Lösen des erhaltenen Pellets des aufkonzentrierten Überstands in sterilem PBS, so dass aufkonzentrierte Proben erhalten werden, welche bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert werden.

Bei der Herstellung von Viren wird der Zellüberstand von T300 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen erhalten. Diese werden zu Beginn in ein 50 ml-Falcon überführt und bei 4000 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgt das Sterilfiltrieren der zellfreien Überstände mithilfe eines 0,45µm Filters in ein neues Falcon. Währenddessen werden in ein Ultrazentrifugenröhrchen 5 ml einer 20% Succroslösung vorgelegt und der zellfreie und steril filtrierte Überstand vorsichtig seitlich überschichtet. Die Überstände werden anschließend in der Ultrazentrifuge bei 31000 g und 4°C für 3 h zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wird verworfen, das Pellet aus Viruspartikeln in der entsprechenden Menge Kulturmedium für 1 h auf Eis gelöst, vereinigt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei der Transduktion bei -80°C gelagert.

Zur Analyse der Proteinexpression der verbliebenen Zellen erfolgt ein Waschschrift mit PBS und die Zugabe von 2x Protein Proben Lyse Buffer, welcher mithilfe von SDS die Zellen vollständig lysiert. Das anschließende Abschaben der Zellen mithilfe einer Pipettenspitze und das Überführen in ein Mikroreaktionsgefäß erfolgt auf Eis. Die Proben werden im Anschluss an einen kurzen Zentrifugationsschritt bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Für die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer erfolgt ebenfalls zunächst ein Waschschrift mit PBS, im Anschluss werden die Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA vom Zellkulturboden gelöst und nach Stoppen der Reaktion mit Kulturmedium in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgen drei Zentrifugationsschritte bei 400 g für 10 min, wobei die Zellen zwischen den Zentrifugationsschritten in PBS als Waschschrift gelöst

werden. Die gereinigten Zellen werden abschließend in 2% PFA zur langfristigen Fixierung gelöst, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Vermessung im Durchflusszytometer im Kühlschrank gelagert.

#### **4.1.1.5. Transduktion**

Als Transduktion wird das Einbringen eines Zielgens durch virale Infektion und somit die genetische Veränderung der Zielzelle bezeichnet. Hierbei wird speziell die Eigenschaft von Retroviren genutzt, nach einer Infektion direkt stabil in das zelluläre Genom integrieren zu können.

Zur Vorbereitung der Transduktion erfolgt am Tag zuvor die Aussaat der Zielzellen mit entsprechender Zellzahl angepasst an das experimentellen Set-up. Es werden die zuvor selbstständig hergestellten Viren verwendet. Die Herstellung der Viren erfolgt nach 4.1.1.4. Für die Transduktion wird zunächst Kulturmedium mit je 8 µl/ml Polybren versetzt. Bei Polybren (Hexadimethrinbromid) handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches die Ladungsabstoßung zwischen den Virionen und der Zelloberfläche neutralisiert und somit die Transduktionseffizienz erhöht. Anschließend erfolgt die Zugabe der entsprechenden Menge Virus zum Reaktionsansatz, das Entfernen des Kulturmediums von den Zielzellen und die Zugabe des Reaktionsansatzes auf die Zellen. Die Zellen werden im Anschluss an die Zugabe 2 h mit dem Reaktionsansatz bei 37°C inkubiert und daraufhin das Medium gewechselt. Es folgt eine weitere Inkubation für 48 h und das Überprüfen der Transduktionseffizienz mithilfe des Fluoreszenzmikroskop, FACS Analyse der Zellen oder weitere Aufarbeitung der Zellüberstände und Zellen entsprechend 4.1.1.4.

### **4.1.2. Molekularbiologische Arbeiten**

#### **4.1.2.1. RNA Extraktion und DNA Verdau**

Die Isolierung der RNA aus Virus enthaltenden Überständen erfolgte mit dem *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben. Dafür werden je nach Experiment 10 µl der aufkonzentrierten Überstände (40x) mit 130 µl PBS

vermischt oder direkt 140 µl Virusüberstand vollständig zur Isolation verwendet. Zur Elution einer großen Menge an RNA wird diese mit 2x 40 µl von der Säule gelöst.

Im Anschluss an die vollständige RNA Isolation erfolgte der DNA Verdau der vollständigen 80 µl RNA unter Herstellerangaben mit dem TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup> Kit von Thermo Fisher Scientific.

#### **4.1.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR beschreibt ein Verfahren, bei welchem in vitro die Vervielfältigung eines vollständigen DNA-Stranges oder Abschnittes erfolgt. Dies geschieht in mehreren Phasen: Zunächst erfolgt die Denaturierung und somit das Auftrennen der doppelsträngigen DNA. Anschließend binden die Primer entsprechend ihrer spezifischen Sequenz am DNA-Strang (Annealing) und der komplementäre Strang wird mithilfe der thermostabilen Polymerase synthetisiert (Elongation). Die verwendeten Primer und ihre Sequenzen sind Tabelle 3-5 zu entnehmen. Es werden folgende PCR-Arten für diese Arbeit verwendet:

#### ***Amplifikations-PCR***

Mithilfe einer Amplifikations-PCR wird ein bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigt und es können benötigte Restriktionsschnittstellen eingefügt werden. Hierfür erfolgt zunächst das Designen von spezifischen Primern, welche die gewünschten Schnittstellen enthalten und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt einrahmen. Die Bereitstellung der Primer erfolgt durch einen externen Anbieter. Anschließend wird der Reaktionsansatz entsprechend Tabelle 4-2 pipettiert und mit dem in Tabelle 4-3 entsprechenden Temperaturprogramm durchgeführt:

Tabelle 4-2: Reaktionsansatz Amplifikations-PCR

Reagenz	[ $\mu$ l]/ Ansatz
<i>DreamTaq</i> Polymerase	0,5
<i>DreamTaq</i> 10x Buffer	5
DMSO (100%)	1
MgCl <sub>2</sub>	0,5
dNTP's	1
Forward Primer (10 $\mu$ M)	2,5
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	2,5
Template	50 ng
dH <sub>2</sub> O	Auf 50 $\mu$ l

Tabelle 4-3: Temperaturprogramm Amplifikations-PCR

Zyklen	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]	Schritt
1	95	5:00	Initial Denaturierung
30	95	0:30	Denaturierung
	X	0:30	Annealing
	72	1 min/kb	Elongation
1	72	30:00	Final Elongation
	4	$\infty$	Lagerung

Die Annealing Temperatur wird entsprechend der Eigenschaften des spezifischen Primers gewählt und die Elongationszeit an das zu amplifizierende DNA-Fragment angepasst. Das erhaltene PCR Produkt wird mithilfe eines Agarosegels überprüft und bis zur Verwendung für Klonierungen bei  $-20^{\circ}$ C gelagert.

### **Sequenzierungs-PCR**

Die Sequenzierungs-PCR dient zur Überprüfung von Ligationen oder DNA-Restriktionen mit Endonukleasen. Hierfür wird die Methode nach Sanger vom Sequenzierungslabor des Robert Koch-Instituts verwendet. Für die PCR werden folgende Komponenten in einem Ansatz (s. Tabelle 4-4) zusammen pipettiert:

Tabelle 4-4: Reaktionsansatz Sequenzierungs-PCR

Reagenz	[ $\mu$ l]/ Ansatz
Plasmid-DNA	300ng
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
Big Dye	0,5
5x Puffer	2
dH <sub>2</sub> O	Auf 10 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wird in einen Cycler überführt und durchläuft folgendes Temperaturprogramm:

Tabelle 4-5: Temperaturprogramm Sequenzierungs-PCR

Zyklen	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]	Schritt
1	96	2:00	Initial Denaturierung
24	96	0:10	Denaturierung
	54	0:10	Annealing
	60	4:00	Elongation
4		$\infty$	Lagerung

Die erhaltenen Proben werden dem Sequenzierungslabor übergeben. Die nach einigen Tagen per E-Mail erhaltenen Ergebnisse werden mithilfe des Programm Geneious ausgewertet.

### **RT-qPCR**

Um die relative Genexpression zu analysieren, wird zunächst RNA aus den viralen Überständen isoliert (siehe 4.1.2.1). Die relative Quantifizierung findet im Anschluss daran durch eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) statt. Der Reaktionsansatz einer RT-qPCR setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 4-6: Reaktionsansatz RT-qPCR

Reagenz	[ $\mu$ l]/ Probe
SensiFAST™ Probe No-Rox One-Step Master Mix	10
RNase Inhibitor	0,4
Reverse Transkriptase	0,2
HERV-pFor (10 $\mu$ M)	0,8
HERV pVL-Rev (10 $\mu$ M)	0,8
HERV Probe (FAM) (10 $\mu$ M)	0,4
RNase- free H <sub>2</sub> O	2,4
Template	5
<b>Gesamtvolumen / Probe</b>	<b>20</b>

Tabelle 4-7: Reaktionsansatz der Negativkontrolle RT-qPCR

Reagenz	[ $\mu$ l]/ Probe
SensiFAST™ Probe No-Rox Master Mix	10
HERV-pFor (10 $\mu$ M)	0,8
HERV pVL-Rev (10 $\mu$ M)	0,8
HERV Probe (FAM) (10 $\mu$ M)	0,4
RNase- free H <sub>2</sub> O	3
Template	5
<b>Gesamtvolumen / Probe</b>	<b>20</b>

Die verwendeten Mastermixe enthalten eine fluoreszenz-markierte Sonde, welche die Quantifizierung der amplifizierten Produkte direkt ermöglicht. Ebenfalls enthalten ist in einem der Mastermixe die Reverse Transkriptase, welche ermöglicht, direkt die RT-qPCR durchzuführen, ohne zuvor die isolierte RNA in einer separaten Reaktion in cDNA umzuschreiben. Als Kontrolle wird ein Mastermix ohne enthaltene Reverse Transkriptase verwendet. Nach erfolgreichem Ansetzen der Mastermixe und Zugabe der zu untersuchenden Proben, erfolgt das Überführen in einen Cycler und das Durchführen des folgenden Temperaturprogramms:

Tabelle 4-8: Temperaturprogramm RT-qPCR

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Schritt
1	45	15:00	Umschreiben in cDNA
1	95	2:00	Initial Denaturierung
44	95	0:30	Denaturierung
	54	1:00	Annealing
	72	0:20	Elongation

Die erhaltenen CT Werte stellen den Zeitpunkt dar, an dem eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz in Bezug auf den Hintergrund gemessen wird. Sie kennzeichnen somit den Beginn der exponentiellen Phase der RT-qPCR. Zur Auswertung werden diese Daten absolut quantifiziert. Dies geschieht mithilfe einer aufgetragenen Standardreihe, welche vom Robert Koch-Institut gestellt wird, welche ermöglicht, die Eingangskopienzahl zu berechnen. Die Analyse der CT- Werte und der Kopienzahl erfolgt mithilfe des CFX Maestro.

#### 4.1.2.3. Transformation

Als Transformation wird der Vorgang bezeichnet, bei dem ein Bakterium Plasmid-DNA aus seiner Umgebung aufnimmt und diese anschließend als extrachromosomale DNA weitervererbt. Erfolgt die Aufnahme von Fremd-DNA in einem anderen Organismus als Bakterien, wird von Transfektion gesprochen. Die Aufnahme der Fremd-DNA erfolgt in sogenannten kompetenten Bakterien und die Fremd-DNA, welche in Form eines Plasmids vorliegt, enthält entsprechende Selektionsmarker, wie beispielsweise eine Kanamycin- oder Ampicillinresistenz.

Für die Transformation wird die entsprechende Menge Plasmid-DNA des zu untersuchenden Templates mit 50 µl der kompetenten Bakterien vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation erfolgt die Anlagerung der Plasmid-DNA an die Zelloberfläche der Bakterien. Bei dem anschließenden Hitzeschock werden die Zellen kurzzeitig (30 s bzw. 45 s je nach Art der verwendeten Bakterien) auf 42°C erhitzt. Durch das Erhitzen entsteht ein Temperaturgradient, welches das Eindringen

der DNA in die Bakterien ermöglicht. Anschließend erfolgt das Herunterkühlen der Bakterien durch erneutes Inkubieren auf Eis für 2 min. Darauffolgend werden bei Raumtemperatur 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Kultur für 1 h bei 37°C horizontal geschüttelt. Abschließend erfolgt das Ausplattieren zum Überprüfen der Bakterien auf ihre Transformationseffizienz durch Selektion auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker. Verwendet wurden während dieser Arbeit Plasmide mit einem Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenzgen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht.

#### **4.1.2.4. Plasmidpräparation**

Am darauffolgenden Tag werden von der Platte, auf welcher die transformierten Bakterien gewachsen sind, einzelne Kolonien mithilfe einer Pipettenspitze in 4 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt. Diese Kultur wird erneut über Nacht bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird das Plasmid aus der vorhandenen Kultur mithilfe des Mini Plasmid Kits von *Qiagen* isoliert, aufgereinigt und anschließend analysiert. Wird eine größere Menge des Plasmids benötigt, erfolgt bereits am Nachmittag das Überführen der 4 ml Starterkultur in 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika und die Aufarbeitung der Suspension mithilfe des *Qiagen* Maxi Plasmid Kits am folgenden Tag. Die Verwendung der Kits erfolgte exakt nach Herstellerangaben. Zunächst wird das entsprechende Volumen der Übernachts-Flüssigkultur zentrifugiert und das Pellet in RNase-Puffer resuspendiert und die RNA degradiert. Durch die Zugabe des Lyse-Puffers werden die bakteriellen Zellwände aufgebrochen und die Plasmid-DNA freigesetzt. Anschließend werden mit SDS-haltigem Puffer die Proteine und die DNA denaturiert. Es erfolgt die Zugabe des Neutralisationspuffers, welcher für die schnelle Renaturierung der sehr kompakten Plasmid-DNA sorgt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt, um Zelltrümmer, genomische DNA und Proteine zu sedimentieren. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und wird anschließend auf eine Säule mit DNA-bindendem Polymer gebracht. Durch anschließendes Waschen werden noch vorhandene Reste aus den vorherigen Schritten entfernt und die Reinheit der Plasmid-DNA erhöht. Abschließend wird die DNA durch Zugabe von RNase freiem Wasser in Lösung gebracht und von der Säule eluiert.

Nach erfolgreicher Isolation eines Plasmids wird die DNA-Konzentration mithilfe des Nanodrops ermittelt. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer aromatischen Ringsysteme im UV Bereich bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm, aufgrund dessen können sie leicht photometrisch bestimmt werden. Zur Überprüfung des Reinheitsgrads wird simultan eine zweite Messung bei 280 nm durchgeführt. Hierfür wird 1 µl Plasmid-DNA am Nanodrop aufgetragen und vermessen. Mittels des Quotienten OD260/OD280 kann daraufhin die Qualität der DNA kalkuliert werden. Bei Vorliegen von DNA ohne Verunreinigungen sollte der Quotient bei circa 1,8 liegen.

Von Plasmiden, welche durch erfolgreiche Sequenzierung analysiert wurden, werden Glycerolstocks angesetzt. Hierfür werden 500 µl Glycerol in ein Kryoröhrchen gegeben und anschließend 500 µl Bakteriensuspension mit dieser vermischt. Die Stocks werden bei -80°C gelagert.

#### **4.1.2.5. Restriktion mit Endonukleasen**

Eine essenzielle Methode zur Überprüfung von neuen Plasmid Konstrukten oder Mutationen innerhalb einer DNA-Sequenz bietet die Restriktion mit Endonukleasen. Diese bakteriellen Enzyme sind in der Lage, ihre spezifische Basenpaarfolge zu erkennen und an eben dieser Stelle die DNA zu schneiden. Daraufhin entstehen entweder 5'-, 3'- Übergänge oder glatte Enden und unterschiedlich große DNA-Fragmente je nach verwendetem Enzym. Jegliche Enzyme, welche verwendet wurden, sind in Tabelle 3-4 aufgeführt und wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Hierfür wird zunächst der Reaktionsansatz pipettiert. Dieser enthält bei allen Ansätzen die gleiche Menge an DNA, Enzyme und den entsprechenden Puffer. Anschließend erfolgt das Auffüllen des Ansatzes mit destilliertem Wasser auf insgesamt 20 µl und der Reaktionsansatz wird je nach verwendetem Enzym für 15-60 min bei 37°C inkubiert.

Wird ein Vektor für eine spätere Ligation präpariert, erfolgt im Anschluss an das Schneiden mit Restriktionsenzymen die Inkubation mit einem weiteren Enzym, der SAP. Zu einem 20 µl Reaktionsansatz werden 1 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP)

und 2 µl SAP Puffer hinzugefügt. Anschließend wird dieser erneut für 1 h bei 37°C inkubiert und das Enzym abschließend bei 65°C für 15 min inaktiviert. SAP katalysiert die Hydrolyse von freien Phosphat-Gruppen an 3'- bzw. 5'-Enden, so dass freie DNA-Enden dephosphoryliert werden und eine Rekombination dieser verhindert wird.

#### **4.1.2.6. Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion**

Die DNA-Fragmente, welche im Anschluss an einen Restriktionsverdau erhalten wurden, werden entsprechend ihrer Größe in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dies ist möglich, da die negativ geladene DNA in einem Agarose-Gel bei Anlegen einer elektrischen Spannung zum Pluspol wandert. Dabei wandern kleinere Fragmente schneller als größere und eine Auftrennung zur Kontrolle der DNA entsprechend der Größe ist möglich. Hierfür werden zunächst bei größeren Fragmenten 0,8% und bei kleineren 1% Agarose in 1x TAE Puffer gelöst und erhitzt. Ist die Agarose vollständig gelöst, erfolgt das kurze Abkühlen des Gels und 2-4 µl Ethidiumbromid werden hinzugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNA und ermöglicht das Sichtbarmachen der DNA unter UV-Licht und somit das Erstellen eines digitalen Bildes. Das Gel wird in einen Gießstand, welcher ebenfalls einen Kamm mit entsprechender Taschenanzahl enthält, gegossen und ausgehärtet. Nachdem das Gel ausgehärtet ist, erfolgt das Auftragen eines Größenstandards und der im Restriktionsverdau verdauten Proben mit 6x DNA-Loading Dye. Das Auftrennen in die unterschiedlichen Fragmente erfolgt bei 80-100 V für 30-60 min. Im Anschluss an die Elektrophorese wird das Gel mit UV-Licht bestrahlt und ein digitales Bild zur späteren Auswertung angefertigt.

Aus dem Gel werden ebenfalls DNA-Fragmente, beispielsweise PCR Produkte, extrahiert und aufgereinigt. Hierfür werden diese mithilfe eines Skalpell auf einer UV-Schneideplatte ausgeschnitten und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgt die Extraktion der DNA aus dem Gelstück mithilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits, welches nach Herstellerangaben verwendet wird. Die Konzentration der eluierten DNA wird am NanoDrop vermessen und die DNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 4.1.2.7. Ligation

DNA Fragmente können mithilfe einer Ligation miteinander verbunden werden. Hierfür wird ein kleineres DNA Fragment, das sogenannte Insert, mittels einer Ligase in ein größeres Fragment (Vektor) eingefügt durch Verknüpfung der freien 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden. Dieser Vektor verfügt über eine Antibiotikaresistenz, so dass die erfolgreiche Ligation durch Transformation in kompetente *E.coli*. TOP10 oder Stble3 überprüft werden kann. Für Ligationen wird das Quick Ligation™ Kit von NEB nach Herstellerangaben verwendet und folgender Ansatz pipettiert:

Tabelle 4-9: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

Reagenz	[μl]/ Ansatz
Quick Ligase Reaction Buffer (2x)	10
Vektor DNA	50 ng
Insert DNA	Entsprechend des Verhältnisses
Nuclease freies Wasser	Auf 20 μl
Quick Ligase	1

Die Menge des Inserts wird mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} \times \text{molares Verhältnis Insert/Vektor}$$

Der Ligationsansatz wird vermischt und daraufhin für 10 min bei RT inkubiert. Abschließend erfolgt die Transformation in chemisch kompetente Bakterien, wie in 4.1.2.3 beschrieben.

#### 4.1.2.8. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

In Vorbereitung für den Western Blot musste ein SDS Gel hergestellt werden. Mithilfe der SDS-Gelelektrophorese werden die denaturierten Proteine aus den zuvor hergestellten Zellysaten entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Hierfür wird zunächst der Gelelektrophorese Gießstand aufgebaut und die mit Ethanol gereinigten Glasplatten in die dafür vorgesehene Halterung gespannt. Zunächst wird das untere 10% Trenngel angesetzt, in die Kammer pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Im Trenngel, welches feinporig ist, werden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt. Nachdem dieses auspolymerisiert ist, wird das Isopropanol entfernt, das obere 5% Sammelgel pipettiert und der präparative Kamm in das noch flüssige Gel eingesetzt. Dieser wird im Anschluss an die Polymerisation entfernt. Im Sammelgel erfolgt die Fokussierung aller Proteine unabhängig ihrer Ladung auf einer Ebene, bevor sie anschließend separiert werden. Entscheidend für die Funktion der verschiedenen Gele sind die Polyacrylamidkonzentration, welche jedoch je nach Fragestellung modifiziert werden können. Die Zusammensetzung für zwei Gele kann der folgenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 4-10: Ansatz für zwei Gele

Reagenz	10% Trenngel	5% Sammelgel
dH <sub>2</sub> O	8,2 ml	5,7 ml
30% Acrylamid	6,6 ml	1,7 ml
Tris 1,5 M	5,0 ml	
Tris 0,5 M		2,5 ml
10% SDS	200 µl	100 µl
10% APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Zur weiteren Vorbereitung erfolgt das Aufschließen der Proben durch Inkubation der Proben bei 95°C für 10 min und Auftragen im Gel. Der in 4.1.1.4 verwendete 2x Protein Proben Lyse Buffer dient hierbei als Ladepuffer und enthält DTT als Reduktionsmittel. Zur Durchführung der Elektrophorese wird die Gelelektrophorese Kammer, welche das eingesetzte Gel enthält, vollständig mit dem Lauf-Puffer gefüllt. Anschließend ist die Auftrennung der Proteine durch Anlegung einer kontinuierlichen Stromstärke möglich. Dies ist aufgrund der Vermischung der Proben mit dem Ladepuffer, welcher denaturierende und reduzierende Agenzien sowie Glycerol und einen Farbstoff enthält, möglich. Zur späteren Auswertung erfolgt ebenfalls das Auftragen von einem Marker

im vorbereiteten Gel. Es wird eine konstante Stromstärke von 80 V für 20 min angelegt und diese im Anschluss auf 180 v für 1 h erhöht, jedoch kontinuierlich die Lauffront verfolgt.

Nach Abschluss der Laufzeit der SDS-Gelelektrophorese folgte das Aktivieren der PVDF-Membran für einige Sekunden mit Methanol und das Blotten des Gels mithilfe der entsprechenden Blotting-Apperatur (Kathode, Schwamm, Cellulosepapier, Membran, Gel, Cellulosepapier, Schwamm, Anode (schwarz)). Dafür wird an die feuchte Kammer, welche den Blottingeinsatz enthält, eine konstante Stromstärke von 390 mA für 60 min bei 4°C angelegt.

Zur Auswertung des Western Blots wird die erhaltene Membran mit den darauf überführten Proteinen zurechtgeschnitten und anschließend für eine Stunde mit *Blocking Buffer for Fluorescent Western Blotting* der Firma Rockland inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membran wird daraufhin mit dem jeweiligen primären Antikörper gelöst in PBS + 0,5% Tween20 über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten mehrmaliges Waschen und die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT. Auf weitere Waschschritte erfolgt die Detektion der Fluoreszenz und die Auswertung des Western Blots digital. Die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen sind Tabelle 3-7 zu entnehmen.

#### **4.1.2.9. Durchflusszytometrie**

Zur Charakterisierung einzelner Zellen wurde die Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Analyse werden die Zellen zunächst wie in 4.1.1.4 präpariert, fixiert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Anschließend erfolgt die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer. In diesem Messverfahren passieren die Zellen einen Laserstrahl. Durch die Anregung des Laserstrahls wird ein Teil des auftreffenden Lichts gestreut und detektiert. Dies lässt auf bestimmte Eigenschaften der Zellen wie die Form, die Struktur (Granulität) und Fluoreszenzfärbung der Zellen schließen. Dabei werden die Zellen, in welche das Fluoreszenzsignal ins Genom integriert wurden, quantifiziert und der prozentuale Anteil der Zellpopulation bestimmt. Neben den zu analysierenden Proben werden unterschiedliche Kontrollen mitgeführt.

Essenziell ist die nicht transfizierte oder infizierte Kontrolle zum Bestimmen des Gating-Bereichs. Die Auswertung der Daten erfolgt mithilfe einer Vorlage, welche durch die Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts bereitgestellt wird.

#### **4.1.2.10. Luciferase-Assay**

Das Luciferase-Gen, welches zur Quantifizierung der Luciferase-Aktivität verwendet wird, entstammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Wird dieses Reporter-gen in den transfizierten Zellen exprimiert, ist es möglich, die Luciferase-Aktivität zu quantifizieren. Dies geschieht aufgrund der spezifischen Fähigkeit der Luciferase, welche in der Lage ist, die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin zu katalysieren, was in Lichtemission resultiert. Die Stärke der Lichtemission korreliert hierbei mit der Menge an exprimierter Luciferase und somit der Menge an transfizierten Zellen.

Zur Durchführung eines Luciferase-Assays werden zunächst die zu transfizierenden Zellen in einer 96-Well-Platte mit entsprechender Zellzahl ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgt die Transfektion der Zellen mit den Luciferase-Konstrukten entsprechend 4.1.1.3. Im Anschluss an die 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit erfolgt das Entfernen des verbrauchten Kulturmediums und die Zugabe von 25 µl/Well 1:5 in dH<sub>2</sub>O verdünntem Reporter Lysis Puffer. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT, folgt ein Zentrifugationsschritt für weitere 10 min bei RT und 3400 g. Die Zelllysate werden anschließend zum vollständigen Lysieren der Zellen bei -80°C für mindestens 1 h eingefroren. Zum Vermessen der Luciferase erfolgt daraufhin das Überführen von 22,5 µl/Well aufgetautem Zelllysate in eine weiße 96-Well-Platte und die Messung am Luminometer. Das Luminometer injiziert automatisch zu den 22,5 µl Probe je Well 50 µl Luciferase Assay-Substrat und misst die Lichtemission.

#### **4.1.2.11. PERT-Assay**

Mithilfe des *qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assay* kann die Aktivität der Reversen Transkriptase aus aufkonzentrierten viralen Überständen analysiert werden.

Zu Beginn erfolgt die Zugabe von RNaseOUT™ (40 U/μl) zu 2x Lysepuffer im Verhältnis 1:50. Anschließend werden 5 μl/ Well des Ansatzes in eine 96-Well Platte vorgelegt und jeweils 5μl/ Well Probe zugegeben. Diese Reaktion wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Proben somit vollständig lysiert und anschließend durch Zugabe von 90 μl/ Well dH<sub>2</sub>O die Reaktion gestoppt. Anschließend werden 9 μl der lysierten Probe mit 11 μl Mastermix in einer gekühlten Platte vermischt und im Cycler inkubiert. Die Zusammensetzung des Mastermix und das darauf durchgeführte Temperaturprogramm ist den folgenden Tabellen zu entnehmen:

Tabelle 4-11: Reaktionsansatz PERT-Assay

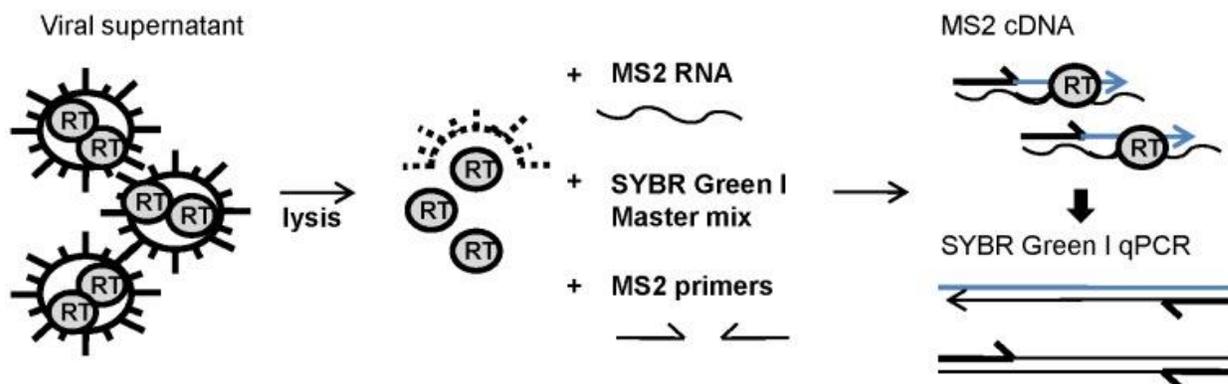
Reagenz	[μl]/ Well
SensiFAST™ Probe No-Rox Master Mix	8
RNase Out 1:10 frisch verdünnt	0,3
PERT-F	1
PERT-R	1
MS2-PERT-Probe (FAM)	0,5
MS2 RNA Template	0,1
RNase-free H <sub>2</sub> O	0,3
Lysierter Virusüberstand	9
<b>Gesamtvolumen/ Well</b>	<b>20</b>

Tabelle 4-12: Temperaturprogramm PERT-Assay

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Schritt
1	42	20:00	Umschreiben in cDNA
1	95	10:00	Initial Denaturierung
45	95	0:30	Denaturierung
	60	0:30	Annealing
	72	0:15	Elongation

Bei der im Cycler stattfindenden Reaktion wird das Template, die exogene RNA ( hier MS2 RNA von Bakteriophagen), mithilfe der in den Proben vorhandenen retroviralen

RT in cDNA umgeschrieben und diese anschließend in einer qPCR quantifiziert. Dies ist durch die im Mastermix vorhandene fluoreszenz-markierte Sonde möglich, welche proportional steigt. Die Aktivität der RT entspricht dementsprechend der Menge an umgewandelter RNA in cDNA [Vermeire *et al.*; 2012].



**Abbildung 4-1: Reaktionsprinzip PERT**

Abbildung entnommen aus [Vermeire *et al.*; 2012]. Prinzip des PERT-Assays. Im Labor wird statt Sybr Green I die Sonde MS2-PERT-Probe (FAM) verwendet.

Zur Quantifizierung dient ein vom Robert Koch-Institut gestellter Standard. Die Bestimmungen aller Proben erfolgen in doppelter Ausführung. Die Auswertung wird mithilfe des CFX Maestro durchgeführt.

## 4.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch Nutzung des Programms GraphPad Prism 8.0 für Windows. Genutzt wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Proben. Für die Signifikanz wurde als Maßstab  $p < 0.05$ :\* als signifikant,  $p < 0.001$ :\*\* als hochsignifikant und  $p < 0.0001$ :\*\*\* als höchstsignifikant angenommen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Restriktion von HERV-K113 durch IFI16

Die Wirkung von IFI16 als viraler Restriktionsfaktor konnte schon anhand unterschiedlicher Viren gezeigt werden, unter anderem zeigten [Hotter *et al.*; 2019], dass IFI16 in der Lage ist, das komplexe Retrovirus HIV-1 zu hemmen. Um zu untersuchen, ob IFI16 ebenfalls in der Lage ist, die Virusproduktion des Molekularklons oriST HERV K-113 des Betaretroviruses zu hemmen, wurde der Molekularklon gleichzeitig mit IFI16 und Staufen-1 in Hek293T Zellen transfiziert. Der verwendete Molekularklon oriST HERV-K113 wurde von der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts bereitgestellt und enthält alle genetischen Informationen für die LTR's sowie die codierenden Sequenzen für *gag*, *pol*, *env* und *Rec* [Lausch; 2013]. Ebenfalls erfolgte bei diesem Molekularklon das Revertieren von allen synonymen postinsertionalen Mutationen.



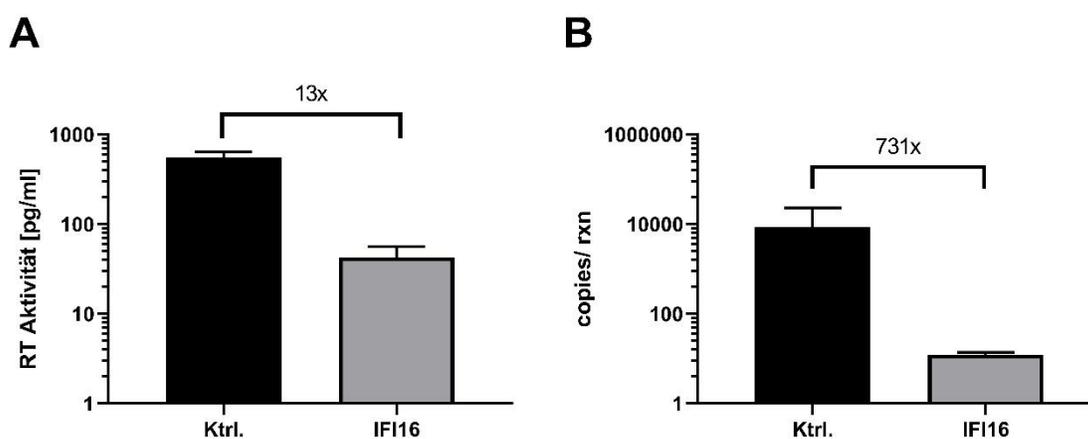
**Abbildung 5-1: Schematische Darstellung ori/ oriST HERV-K113**

Dargestellt sind die verwendeten Molekularklone und deren genetische Informationen. Abbildung selbstständig erstellt mit BioRender.com.

Staufen-1 bindet Gag und Rec und steigert aufgrund seiner Interaktion mit den beiden Proteinen die virale Partikelproduktion [Hanke *et al.*; 2013], beeinflusst jedoch nicht die Expression von IFI16. Die Bereitstellung des Expressionsplasmids für IFI16 und die entsprechende Kontrolle erfolgte durch das Institut für molekulare Virologie des Universitätsklinikum Ulm.

Für die Durchführung des Experiments erfolgte zunächst die Aussaat der Hek293T Zellen in einer 6-Well Platte und die Transfektion entsprechend 4.1.1.3 mit Lipofectamin. Im Anschluss an die Inkubation für 48 h mit dem Transfektionsansatz wurden die Zellüberstände entsprechend 4.1.1.4 abgenommen, 40-fach

aufkonzentriert und die RT-Aktivität im PERT vermessen. Parallel erfolgte die Extraktion der RNA aus 10 µl der aufkonzentrierten viralen Überstände, der DNA Verdau und die Durchführung einer RT-qPCR. Die RT-qPCR bietet die Möglichkeit, die relative Kopienanzahl von HERV Viren pro Reaktionsansatz zu bestimmen. Dies ist möglich, da während der RT-qPCR die sogenannte *Leader-Region* des HERV Genoms amplifiziert wird. Diese hochkonservierte Region bezeichnet den essenziellen Bereich zwischen Primerbindestelle und dem *gag*-Gen, welche ebenfalls die Spleißdonorstelle enthält [Modrow *et al.*; 2003].

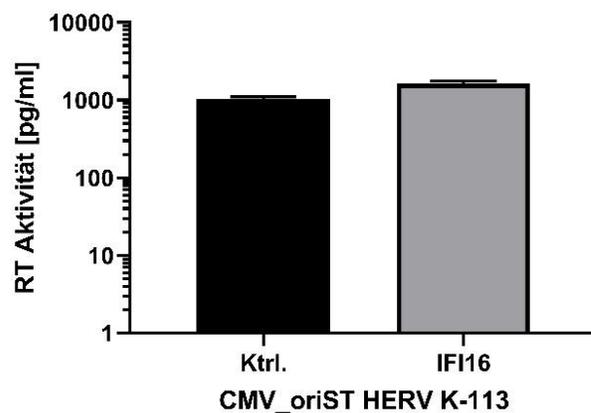


**Abbildung 5-2: Restriktion von oriST HERV-K113 durch IFI16**

Hek293T Zellen wurden mithilfe von Lipofectamin mit dem oriST HERV-K113 Moleklarklon, Staufen-1 und IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle transfiziert. Im Anschluss an 48h Inkubation erfolgt die 40-fach Aufkonzentration der Überstände und **(A)** Bestimmung der RT-Aktivität mittels PERT und **(B)** Bestimmung der HERV Kopienanzahl pro Reaktionsansatz mittels RT-qPCR. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils fünf **(A)** bzw. drei **(B)** unabhängigen Replikaten.

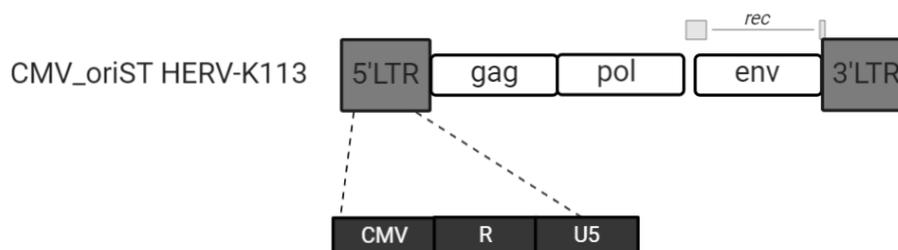
Wie in Abbildung 5-2 (A) ersichtlich, verringert sich die Aktivität der RT und dementsprechend die virale Partikelproduktion des HERV-K113 um das 13-fache bei Cotransfektion mit IFI16 und Staufen-1 im Vergleich zu den Proben, welche mit dem Leervektor und Staufen-1 als Kontrolle transfiziert wurden. Bei Betrachtung der relativen Genomkopienzahl ist eine Restriktion um das 713-fache messbar (Abbildung 5-2 (B)). Eine Hemmung von HERV-K113 durch IFI16 ist somit nachweisbar.

Die von [Hotter *et al.*; 2019] gezeigte Restriktion von HIV-1 durch IFI16 erfolgte nur bei vollständiger vorhandener viraler LTR, nicht jedoch bei Konstrukten, welche einen CMV-Promotor enthielten. Da in der Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts ebenfalls ein HERV Moleklarklon vorhanden ist, welcher einen CMV-Promotor enthält, wurde dieser Moleklarklon ebenfalls mit Staufen-1 und IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle in Hek293T Zellen cotransfiziert. Die Transfektion erfolgte im 6-Well Format und im Anschluss an 48h Inkubation mit dem Reaktionsansatz wurden die Zellüberstände abgenommen, 40-fach aufkonzentriert, die RT-Aktivität im PERT vermessen und folgendes Ergebnis erhalten:



**Abbildung 5-3: Restriktion von CMV\_oriST HERV-K113 durch IFI16**

Hek293T Zellen wurden mithilfe von Lipofectamin mit dem CMV\_oriST HERV-K113 Moleklarklon, Staufen-1 und IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle transfiziert. Im Anschluss an 48h Inkubation erfolgt die 40-fach Aufkonzentration der Überstände und Bestimmung der RT-Aktivität mittels PERT. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils fünf unabhängigen Replikaten.



**Abbildung 5-4: Schematische Darstellung CMV\_oriST HERV-K113**

Dargestellt ist der verwendete Moleklarklon und seine genetischen Informationen. Abbildung selbstständig erstellt mit BioRender.com.

Wie in Abbildung 5-3 sichtbar, führt der Austausch der U3-Region der viralen 5'LTR mit einem CMV-Promotor dazu (Abbildung 5-4), dass die virale Partikelproduktion nicht durch IFI16 gehemmt wird. Dieses Ergebnis suggeriert, dass die virale LTR eine entscheidende Rolle bei der Hemmung von HERV-K113 durch IFI16 spielt.

## **5.2. Analyse der Relevanz der viralen LTR in pGL3 Konstrukten**

### **5.2.1. Klonierung eines Luciferase-Konstruktes mit vollständiger LTR**

Bereits im früheren Verlauf des Projektes wurde durch die Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts ein Konstrukt kloniert, in welchem die 5'LTR als Promotor in ein Luciferase-Konstrukt eingebracht wurde. Dieses Konstrukt wird jedoch nicht durch IFI16 gehemmt [Zumblick; 2019]. Ziel dieser Masterarbeit war es, daraus resultierend zu untersuchen, ob das Einbringen der 3'LTR oder der vollständigen LTR Sequenz zur Hemmung eines Luciferase-Konstruktes durch IFI16 führt.

Als Luciferase-Reporter-Vektor wurde der *pGL3 basic* Vektor von Promega ausgewählt. Die Vektorkarte ist dargestellt in Abbildung 8-1 (s. Anhang). Diesem Vektor fehlen die eukaryotischen Promotor- und Enhancer- Sequenzen. N-terminal des Luciferase-Gens befinden sich die *Multiple Cloning Site* (MCS) mit verschiedensten Restriktionsschnittstellen. In die MCS erfolgte bereits zuvor das Einbringen der viralen 5'LTR mithilfe von KpnI und HindIII durch die Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts, welches im Laufe dieser Arbeit als *pGL3 5'LTR* bezeichnet wird. Um ein Luciferase-Konstrukt zu konstruieren, welches die vollständigen LTR Sequenzen beinhaltet, war zunächst ein Ziel der Masterarbeit das Klonieren der 3'LTR in den pGL3 Vektor. Hierfür erfolgte das Designen spezifischer Primer, welche sowohl die 3'LTR aus dem oriST HERV-K113 amplifizieren als auch die gewählten Schnittstellen XbaI und Sall einbringen soll, die entsprechenden Primersequenzen sind 3.1.5 zu entnehmen. Nach Erhalt der Primer wurde eine Amplifikations-PCR durchgeführt und mehrmals probiert, die amplifizierte 3'LTR in den pGL3 basic oder pGL3 5'LTR einzubringen. Da dies nicht möglich war, wurde sich für eine mehrstufige Klonierungsstrategie entschieden, bei dem die 3'LTR zunächst in einen weiteren Vektor zwischentkloniert wurde. Als

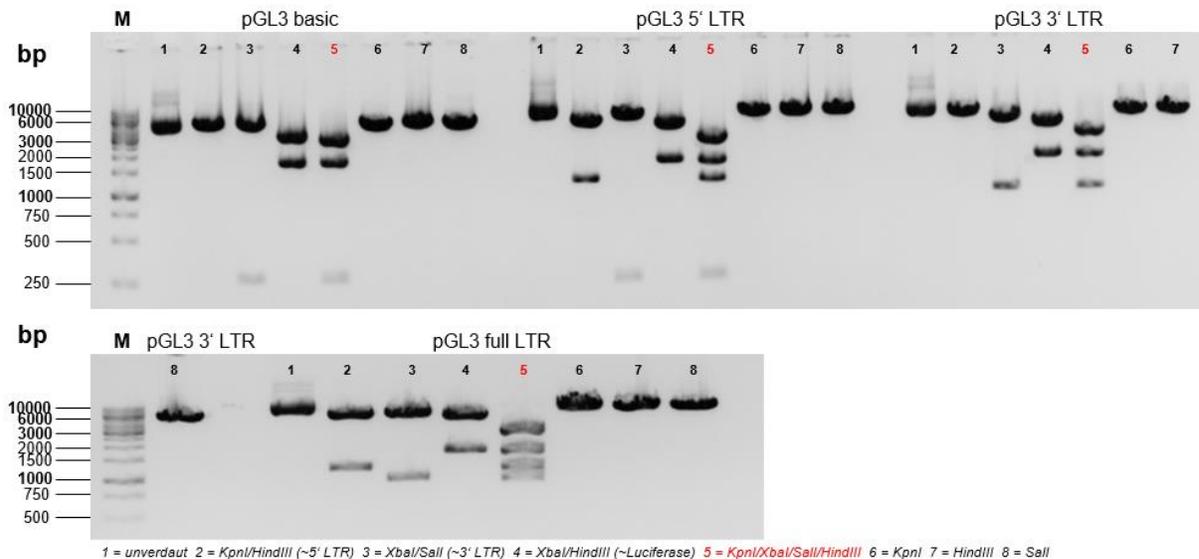
Zwischenvektor wurde der pCR<sup>TM</sup>4 des *TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing* von Thermo Fisher gewählt.

Entsprechend der Herstellerangaben erfolgte zunächst erneut die Amplifikation der 3'LTR und einer im Kit enthaltenen Kontrolle mithilfe der *DreamTaq<sup>TM</sup> Hot Start Green DNA Polymerase*, welche in der Lage ist, lange Sequenzen mit 3'-dA Überhängen zu generieren. Der Erfolg der Amplifikations-PCR wurde mithilfe eines Agarose-Gels überprüft (s. Anhang Abbildung 8-2 (A)). Daraufhin wurde sowohl die im Kit enthaltene Kontrolle als auch die 3'LTR nach Herstellerangaben in den pCR<sup>TM</sup>4 Vektor eingebracht und in kompetente Bakterien transformiert. Die am darauffolgenden Tag gepickten Kolonien wurden über Nacht in einer Schüttelkultur bei 37°C inkubiert und anschließend die Plasmid-DNA isoliert. Es folgte ein Restriktionsverdau mit den jeweiligen Enzymen und das Auftragen der Proben in einem Agarosegel, welche das erfolgreiche Einbringen der 3'LTR in den pCR<sup>TM</sup>4-Vektor bei fünf der sieben gepickten Klone bestätigte (s. Anhang Abbildung 8-2 (B)). Des Weiteren validiert die Kontrolle die erfolgreiche Amplifikations-PCR und Anwendung des Kits. Zwei der positiven Klone, welche die 3'LTR enthalten, wurden ausgewählt und retransformiert. Im Anschluss erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA im großen Maßstab, das Einstellen der Plasmid-DNA Konzentration auf 1 µg/µl, die Anfertigung eines Glycerol Stocks für spätere Versuche und die Sequenzierung der positiven Klone. Mithilfe der Sequenzierung konnte sichergestellt werden, dass die 3'LTR vollständig und mutationsfrei in den pCR<sup>TM</sup>4-Vektor eingebracht werden konnte und beide, für die folgenden Klonierungen benötigten, Restriktionsschnittstellen vorhanden sind.

Der pGL3 basic Vektor und einer der sequenzierten positiven Klone wurden im nächsten Klonierungsschritt mit XbaI und Sall verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und die benötigten Banden aus dem Gel extrahiert und mithilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kit* aufgereinigt. Es folgte die Ligation des geöffneten pGL3 basic Vektors und der 3'LTR, welche im ersten Schritt erfolgreich aus dem oriST HERV-K113 amplifiziert wurde, im Verhältnis eins zu fünf. Im Anschluss an die Ligation wurden der Ansatz in kompetente Bakterien transformiert, am darauffolgenden Tag eine Vielzahl von Kolonien gepickt, diese über Nacht in einer Schüttelkultur bei

37°C inkubiert, die Plasmid-DNA isoliert, diese mit XbaI und SalI verdaut und die Proben in einem Agarosegel aufgetragen (s. Anhang Abbildung 8-3 (A)). Zunächst erschienen in diesem Restriktionsverdau alle Klone positiv, da eine signifikante Bande bei ca. 1kb, entsprechend der Größe der 3'LTR, sichtbar ist. Jedoch kann mithilfe dieses Restriktionsverdaus nicht sichergestellt werden, ob die 3'LTR im pGL3 Vektor vorliegt oder nicht weiterhin im pCR<sup>TM</sup>4-Vektor. Zur Identifikation des Vektors folgte ein weiterer Restriktionsverdau mit KpnI und XbaI (s. Anhang Abbildung 8-3 (B)). Von einem der neun positiven Klone, die eine signifikante Bande bei 1,7 kb entsprechend des Luciferase Gens zeigen, erfolgt die Isolierung der Plasmid-DNA im großen Maßstab, das Einstellen der Plasmid-DNA Konzentration auf 1 µg/µl, die Anfertigung eines Glycerol Stocks für spätere Versuche und die Sequenzierung des positiven Klons. Dieses Konstrukt wird im Laufe dieser Arbeit als *pGL3 3'LTR* bezeichnet.

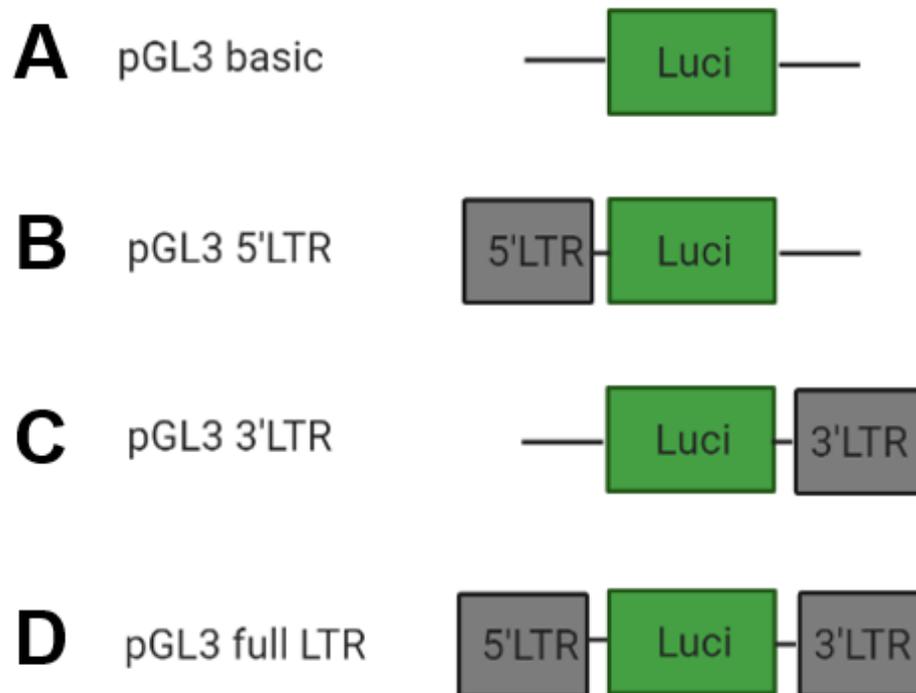
Das pGL3 5'LTR- und pGL3 3'LTR-Konstrukt werden im letzten Klonierungsschritt mit KpnI und HindIII verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt, die benötigten Banden aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und im Verhältnis eins zu fünf und eins zu sieben ligiert. Die 5'LTR dient in diesem Klonierungsschritt als Insert und wird in das pGL3 3'LTR-Konstrukt eingebracht. Der Ansatz wurde in kompetente Bakterien transformiert, am darauffolgenden Tag eine Vielzahl von Kolonien gepickt, diese über Nacht in einer Schüttelkultur bei 37°C inkubiert, die Plasmid-DNA isoliert, diese mit verschiedenen Enzymen verdaut und die Proben in einem Agarosegel aufgetragen:



**Abbildung 5-5: Restriktionsverdau der Luciferase-Konstrukte mit LTR**

Dargestellt ist ein 1% Agarosegel, in welchem die unverdaute, mit KpnI/HindIII, mit XbaI/SalI, mit XbaI/HindIII, mit KpnI/XbaI/SalI/HindIII, mit KpnI, mit HindIII und mit SalI verdaute Plasmid-DNA, welche aus den jeweiligen gepickten Klonen isoliert wurde, aufgetragen wurde. Klone, welche eine Bande mit einer Größe von 1024bp haben, zeigen bei Verdau der Plasmid-DNA mit KpnI/HindIII enthalten die 5'LTR des oriST HERV-K113. Klone, welche eine Bande mit einer Größe von 968bp haben, zeigen bei Verdau der Plasmid-DNA mit XbaI/SalI enthalten die 3'LTR des oriST HERV-K113. Alle verwendeten Klone zeigen eine Bande mit einer Größe von 1,7kb entsprechend des Luciferase Gens bei Verdau mit XbaI und HindIII. Die Identifikation der unterschiedlichen Konstrukte ist eindeutig durch Verdau der Plasmid-DNA mit KpnI/XbaI/SalI und HindIII möglich.

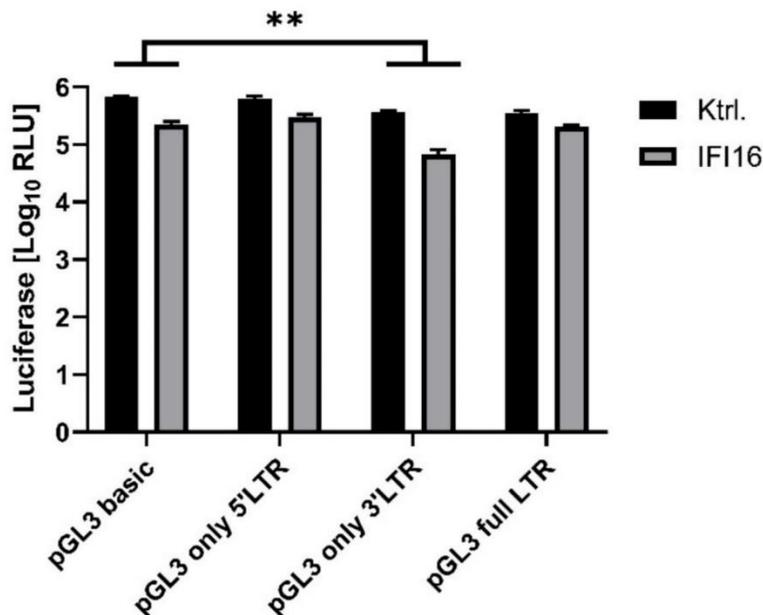
Alle in Abbildung 5-5 dargestellten und analysierten Konstrukte enthalten die Sequenz für die Luciferase mit einer Größe von 1,7kb. Das pGL3 5'LTR- und pGL3 3'LTR-Konstrukt zeigen eine signifikante Bande mit einer Größe von circa 1kb bei Verdau mit den entsprechenden Enzymen, wodurch sichergestellt ist, dass die jeweilige LTR entweder N-terminal oder C-terminal der Luciferase vorhanden ist. Der zuletzt untersuchte Klon zeigt sowohl die 1024bp große Bande bei Verdau mit KpnI/HindIII, entsprechend der 5'LTR, als auch die 968bp große Bande bei Verdau mit XbaI/SalI, entsprechend der 3'LTR. Das Konstrukt enthält somit sowohl die 5'LTR N-terminal als auch die 3'LTR C-terminal der Luciferase, sodass dieses Konstrukt im Laufe der Arbeit als *pGL3 full LTR* bezeichnet wird. Alle Konstrukte werden abschließend sequenziert und somit hinsichtlich vorhandener Mutationen überprüft. Die frei von Mutationen vorhandenen Klone werden retransformiert, anschließend die Plasmid-DNA im großen Maßstab isoliert, die DNA Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt und für den folgenden Versuch verwendet:



**Abbildung 5-6: Schematische Darstellung der pGL3 Konstrukte**

Dargestellt sind die für die folgenden Versuche verwendeten Moleklarklone: **(A)** der pGL3 basic, **(B)** der pGL3 5'LTR, **(C)** der pGL3 3'LTR und **(D)** pGL3 full LTR und deren genetische Informationen. Abbildung selbstständig erstellt mit BioRender.com.

In Abbildung 5-6 sind die verwendeten Konstrukte und deren genetische Informationen schematisch dargestellt. In Vorbereitung eines Luciferase Assays, indem die vorhandenen und selbst generierten Konstrukte analysiert werden sollen, erfolgte zunächst die Aussaat von Hek293T Zellen in eine 96-Well Platte. Am darauffolgenden Tag wurden multiple Wells mit jeweils einem Konstrukt und dem Leervektor oder dem IFI16 Expressionsplasmid transfiziert und im Anschluss an 48 h Inkubation mithilfe eines Luciferase-Assays folgende Ergebnisse generiert:



**Abbildung 5-7: Restriktion der pGL3 Konstrukte in Hek293T durch IFI16**

Logarithmisch dargestellt ist die Luciferase Aktivität der verschiedenen Konstrukte in Hek293T Zellen. Hierfür wurden Hek293T Zellen zunächst in einer 96-Well Platte ausgesät, mit dem entsprechenden Konstrukt und simultan mit der Kontrolle oder IFI16 contransfiziert und im Anschluss an 48 h Inkubation ein Luciferase-Assay durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils sieben unabhängigen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPrism 8.0. Im t-Test für unabhängige Proben wurden Unterschiede mit  $p < 0.05$ : \* als signifikant,  $p < 0.001$ : \*\* als hochsignifikant und  $p < 0.0001$ : \*\*\* als höchstsignifikant betrachtet und lediglich angegeben, wenn die Fold-change Differenz zwischen der Kontrolle und IFI16 höher war als in der Hintergrundkontrolle des pGL3 basic.

In Abbildung 5-7 ist deutlich zu erkennen, dass lediglich das pGL3 3'LTR Konstrukt hochsignifikant durch IFI16 gehemmt wird. Die weiteren Konstrukte zeigen lediglich eine geringe Hemmung, welche weniger stark ausgeprägt ist als die im pGL3 basic Konstrukt, welcher als Hintergrund-Kontrolle dient. Jedoch ist auch die erwartete Wirkung der LTR als Promotor nicht gegeben, woraus resultiert, dass zur Validierung der generierten und vorhandenen Luciferase-Konstrukte und der Einfluss von IFI16 auf diese, zunächst eine geeignete Zelllinie gefunden werden muss, in welcher die LTR deutlich als Promotor detektierbar ist. Es werden deutlich detektierbare Unterschiede zwischen der Kontrolle, dem pGL3 basic und den weiteren Konstrukten benötigt, um gegebenenfalls eine Hemmung durch IFI16 zu detektieren.

## 5.2.2. Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien

Um den Einfluss von IFI16 auf die Luciferase-Konstrukte zu analysieren, werden zunächst Zelllinien benötigt, welche erfolgreich transfizierbar sind. Um diese zu identifizieren wurden die im Labor vorhandenen und bereits im vorherigen Verlauf des Projektes verwendeten humanen Zelllinien aufgetaut und in Kultur genommen. Insgesamt standen daraufhin fünf verschiedene Zelllinien zur Verfügung: Hek293T, HeLa, GH, Tera-1 und SK-Mel28 Zellen. In Vorbereitung auf das Transfektions-Experiment erfolgte die Aussaat der Zellen in eine 24-Well Platte, die Zellzahl wurde individuell für jede Zellart gewählt, sodass am darauffolgenden Tag eine Konfluenz von 60-80% gegeben war. An diesem Tag erfolgte die Transfektion mit dem pMAX-GFP Vektor, welcher lediglich die Sequenz für GFP enthält. Im Anschluss an 48 h Inkubation mit dem Transfektionsansatz wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops digitale Aufnahmen angefertigt (s. Anhang Abbildung 8-4), die Zellen entsprechend 4.1.1.4 für das FACS vorbereitet und anschließend vermessen.

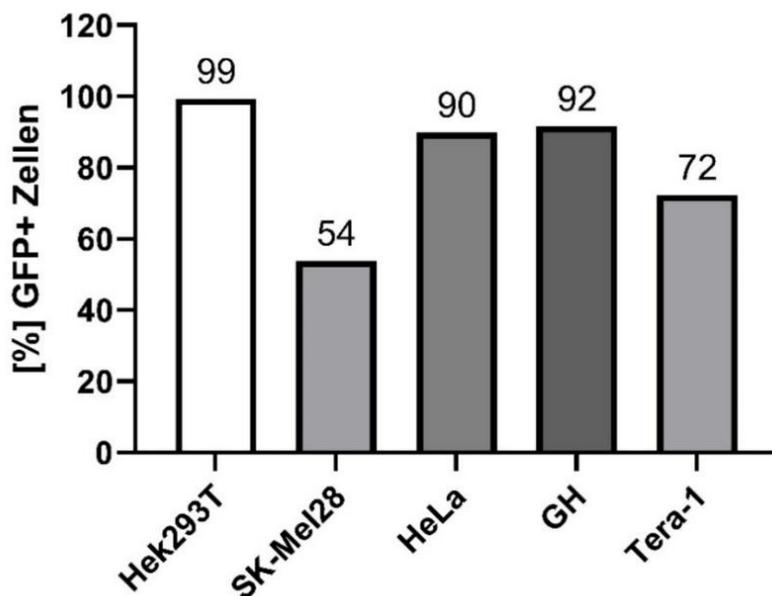


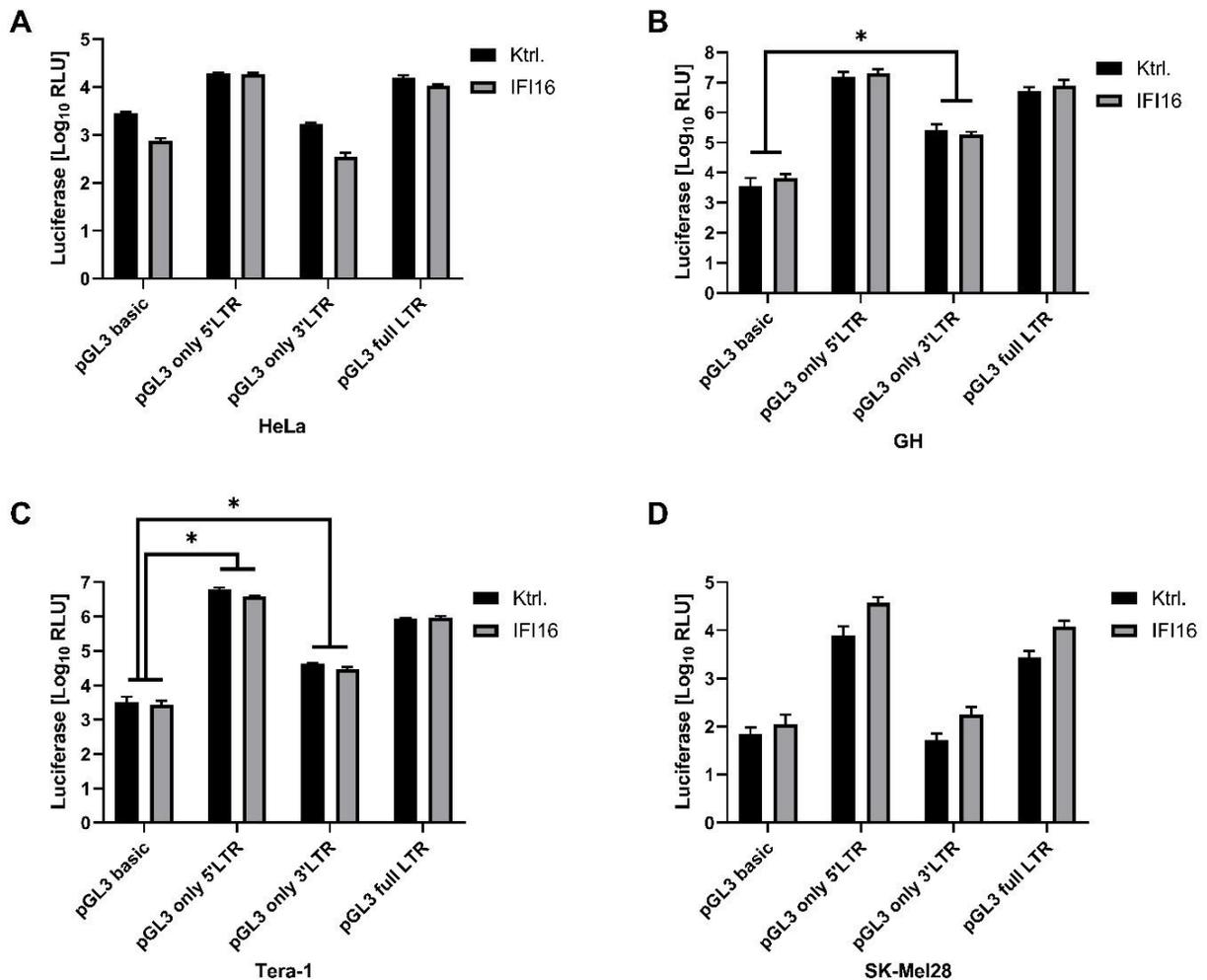
Abbildung 5-8: Transfektionseffizienz der verschiedenen humanen Zelllinien

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an GFP+ Zellen der verschiedenen humanen Zelllinien. Die Zellen wurden hierfür zunächst in einer 24-Well Platte ausgesät, am darauffolgenden Tag mit pMAX-GFP transfiziert und nach 48 h mithilfe des FACS vermessen. Abgebildet sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Replikaten.

Werden die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop in Abbildung 8-4 (s. Anhang) betrachtet, zeigen die Hek293T Zellen die höchste Transfektionseffizienz, darauf folgen unmittelbar die HeLa Zellen. Diese visuellen Rückschlüsse werden durch die Ergebnisse der FACS Analyse der Zellen in Abbildung 5-8 bestätigt, sowohl die Hek293T als auch die HeLa Zellen sind nahezu vollständig, über 90%, transfizierbar. Die GH und Tera-1 Zellen zeigen hingegen bei Betrachtung der FACS Ergebnisse eine deutlich höhere Transfektionseffizienz als zunächst anhand der Fluoreszenzbilder erwartet. Die schwächste Transfektionseffizienz sowohl visuell als auch bei der FACS Analyse zeigen die SK-Mel28 Zellen, welche jedoch mit 54% ausreichend ist, um auch diese Zellen in weiteren Versuchen zu verwenden. Zusammenfassend zeigen alle Zelllinien bei Transfektion mit dem pMAX-GFP Vektor eine Transfektionseffizienz von mindestens 50%, sodass alle Zelllinien für weitere Analysen genutzt werden können.

### **5.2.3. Restriktion der pGL3 Konstrukte durch IFI16**

Aufgrund der Ergebnisse in 5.2.2 wurden die pGL3 Konstrukte, welche sich aus dem pGL3 basic als Kontrolle, pGL3 5'LTR, pGL3 3'LTR und pGL3 full LTR, zusammensetzen daraufhin in den vier weiteren humanen Zelllinien getestet. Die HeLa, GH, Tera-1 und SK-Mel28 Zellen wurden hierfür in einer 96-Well Platte ausgesät, die Zellzahl wurde so gewählt, dass am darauffolgenden Tag eine Konfluenz von 70% gegeben war. An diesem Tag erfolgte die Transfektion von je sieben Wells je Zelllinie mit einem der vier verschiedenen Konstrukte und simultan mit Leer-Vektor oder IFI16. Im Anschluss an 48h Inkubation mit dem Transfektionsansatz erfolgte die Aufarbeitung der Zellen entsprechend 4.1.2.10 und die Vermessung der Proben am Luminometer.



**Abbildung 5-9: Restriktion der pGL3 Konstrukte in verschiedenen Zelllinien durch IFI16**

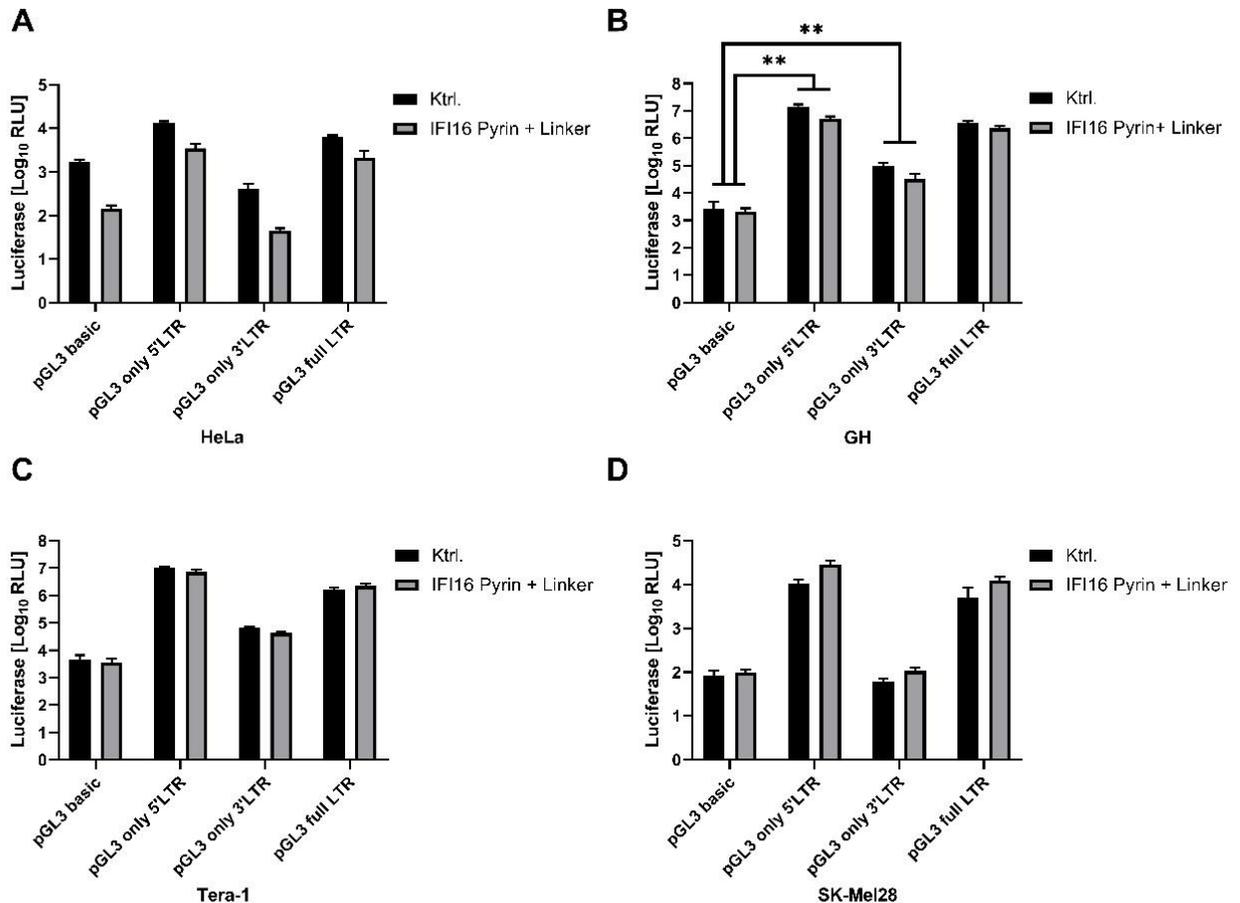
Logarithmisch dargestellt ist die Luciferase Aktivität der verschiedenen Konstrukte in **(A)** HeLa, **(B)** GH, **(C)** Tera-1 und **(D)** SK-Mel28 Zellen. Hierfür wurden die Zellen zunächst in einer 96-Well Platte ausgesät, mit dem entsprechenden Konstrukt und simultan mit der Kontrolle oder IFI16 cotransfiziert und im Anschluss an 48 h Inkubation ein Luciferase-Assay durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils sieben unabhängigen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPrism 8.0. Im t-Test für unabhängige Proben wurden Unterschiede mit  $p < 0.05$ : \* als signifikant,  $p < 0.001$ : \*\* als hochsignifikant und  $p < 0.0001$ : \*\*\* als höchstsignifikant betrachtet und lediglich angegeben, wenn die Fold-change Differenz zwischen der Kontrolle und IFI16 höher war als in der Hintergrundkontrolle des pGL3 basic.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-9 dargestellt. In allen vier Zelllinien ist eine charakteristische Steigerung der Luciferase-Aktivität sowohl in dem pGL3 5'LTR als auch pGL3 full LTR-Konstrukt detektierbar. In den GH (B) und Tera-1 (C) Zellen resultiert das Einbringen der 3'LTR in den pGL3 Vektor ebenfalls in einer gesteigerten Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle dem pGL3 basic. Die Cotransfektion mit

IFI16 führt jedoch lediglich in den GH und Tera-1 Zellen zu einer signifikanten Hemmung einiger Konstrukte. In den GH Zellen wird das pGL3 3'LTR Konstrukt signifikant durch IFI16 gehemmt. Werden die Daten der Tera-1 Zellen betrachtet, ist eine signifikante Restriktion des pGL3 5'LTR und pGL3 3'LTR Konstrukts, jedoch nicht des pGL3 full LTR Konstruktes detektierbar. In den SK-Mel28 Zellen (D) resultiert die Cotransfektion mit IFI16 in einer gesteigerten Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle und in den HeLa Zellen (A) ist kein Effekt nachweisbar.

#### **5.2.4. Restriktion der pGL3 Konstrukte durch die Pyrindomäne und den Linkerbereich von IFI16**

Bereits zuvor konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen demonstriert werden, dass die Pyrindomäne plus NLS-enthaltende Linkerregion ausreichend ist, um verschiedenste Viren zu inhibieren. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Restriktion der vorhandenen und generierten pGL3 Konstrukte durch die PYD plus Linkerbereich von IFI16 untersucht. Hierfür wurden erneut die vier humanen Zelllinien, in denen die Promotoraktivität der LTR Sequenzen bereits nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5-9), in einer 96-Well Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Cotransfektion mit einem der vier pGL3 Konstrukte und dem Leervektor oder der PYD plus Linkerbereich. Im Anschluss an 48h Inkubation erfolgte die Durchführung mehrerer Luciferase-Assays bei denen folgende Ergebnisse erhalten wurden:



**Abbildung 5-10: Restriktion der pGL3 Konstrukte in verschiedenen Zelllinien durch die PYD plus Linkerbereich**

Logarithmisch dargestellt ist die Luciferase Aktivität der verschiedenen Konstrukte in **(A)** HeLa, **(B)** GH, **(C)** Tera-1 und **(D)** SK-Mel28 Zellen. Hierfür wurden die Zellen zunächst in einer 96-Well Platte ausgesät, mit dem entsprechenden Konstrukt und simultan mit der Kontrolle oder der PYD plus Linkerbereich des IFI16 contrasfiziert und im Anschluss an 48 h Inkubation ein Luciferase-Assay durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils sieben unabhängigen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPrism 8.0. Im t-Test für unabhängige Proben wurden Unterschiede mit  $p < 0.05$ : \* als signifikant,  $p < 0.001$ : \*\* als hochsignifikant und  $p < 0.0001$ : \*\*\* als höchstsignifikant betrachtet und lediglich angegeben, wenn die Fold-change Differenz zwischen der Kontrolle und IFI16 höher war als in der Hintergrundkontrolle des pGL3 basic.

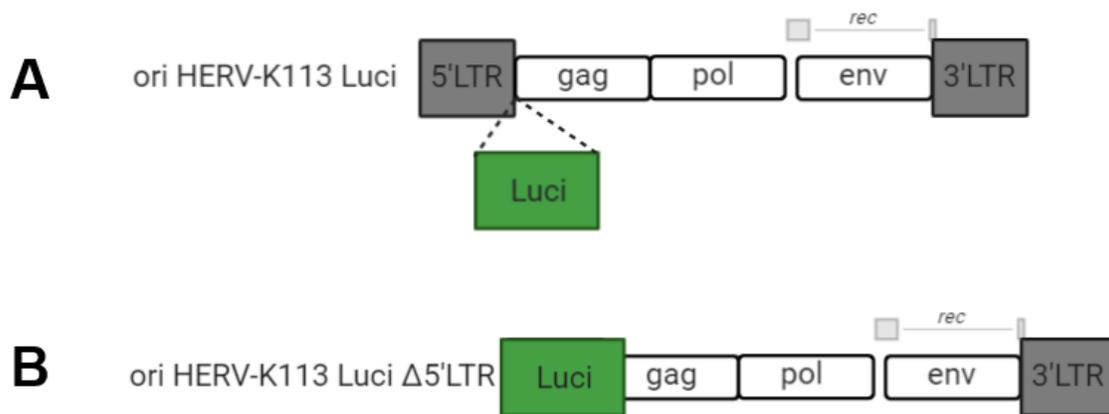
In Abbildung 5-10 ist erneut die Steigerung der Luciferase-Aktivität bei Transfektion des pGL3 5'LTR- und des pGL3 full LTR-Konstruktes im Vergleich zum pGL3 basic und somit die Wirkung der LTR als Promotor in allen Zelllinien detektierbar. Ebenfalls die erhöhte Expression der Luciferase bei Transfektion des pGL3 3'LTR Konstruktes in den GH (B) und Tera-1 (C) Zellen ist replizierbar. Jedoch ist die zuvor signifikante Hemmung des pGL3 5'LTR und pGL3 3'LTR Konstruktes (Abbildung 5-9 C) in den

Tera-1 Zellen nicht erneut nachweisbar. Die HeLa Zellen (A) zeigen weiterhin keinen Effekt bei Cotransfektion der Konstrukte mit IFI16. Ebenfalls repliziert werden konnten die Ergebnisse der SK-Mel28 Zellen (D), welche erneut eine höhere Luciferase Expression bei Cotransfektion mit IFI16 als in den jeweiligen Kontrollen zeigen. Lediglich in einer Zelllinie, den GH Zellen (B), ist die hochsignifikante Hemmung des pGL3 5'LTR und pGL3 3'LTR Konstruktes durch die PYD und den Linkerbereich nachweisbar. Diese wird jedoch bei Existenz der vollständigen LTR im pGL3 full LTR Konstrukt aufgehoben. Mithilfe der generierten Daten konnte nicht bestimmt werden, ob die volllängen LTR oder nur eine der beiden LTRs eine signifikante Rolle bei der Restriktion von HERV-K113 durch IFI16 spielt. Aufgrund dessen wurden in weiteren Experimenten weitere Ansätze verfolgt.

### **5.3. Analyse der Relevanz der viralen LTR im ori HERV-K113**

#### **5.3.1. Analyse der 5'LTR**

Ein Ziel der Masterarbeit ist es, den funktionellen Bereich des HERV Genoms zu identifizieren, welcher durch IFI16 gehemmt wird. Mithilfe des ersten Ansatzes sollte der Bereich der 5'LTR näher eingegrenzt, wenn möglich konkret identifiziert werden, welcher relevant für die Hemmung durch IFI16 ist. Die Ergebnisse in Abbildung 5-3 zeigten bereits, dass bei Austausch der U3-Region durch einen CMV-Promotor die Restriktion aufgehoben wird. Eine entscheidende Rolle der 5'LTR wird daher angenommen. Um diese Hypothese zu untersuchen, erfolgte durch eine betreute Praktikantin die Klonierung zwei weiterer Konstrukte, welche anschließend selbstständig getestet wurden. Sie stellte die Konstrukte *ori HERV-K113 Luci* und *ori HERV-K113 Luci Δ5'LTR* zur Verfügung:



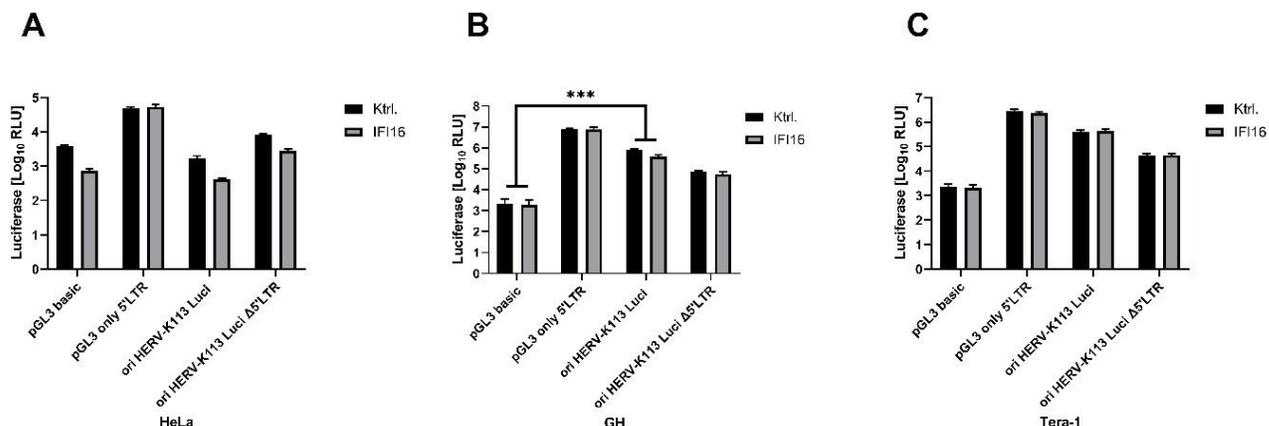
**Abbildung 5-11: Schematische Darstellung der erhaltenen Molekularklone zur Analyse der 5'LTR**

Dargestellt sind die verwendeten Molekularklone: **(A)** der ori HERV-K113 Luci und **(B)** der ori HERV-K113 Luci  $\Delta$ 5'LTR und deren genetische Informationen. Abbildung selbstständig erstellt mit BioRender.com.

In Abbildung 5-11 (A) ist schematisch der Molekularklon ori HERV-K113 Luci dargestellt, welche in dem folgenden Experiment als Kontrolle dient. Es wird erwartet, dass dieser Molekularklon durch IFI16 gehemmt wird, da er die vollständigen LTR Sequenzen und das vollständige virale Genom enthält. Der in Abbildung 5-11 (B) dargestellte Molekularklon zeigt hingegen den ori HERV-K113 Luci  $\Delta$ 5'LTR, welcher aufgrund des Austauschs der 5'LTR zur Luciferase nicht gehemmt werden sollte. Die Restriktionsschnittstellen zum Einbringen der Luciferase wurden so gewählt, dass anschließend das schrittweise Wiedereinbringen der 5'LTR erfolgen soll, so dass systematisch der essenzielle Bereich der 5'LTR identifiziert werden kann.

Zu Beginn erfolgte das Überprüfen der Funktionalität der erhaltenen Konstrukte. Hierfür wurden HeLa, GH und Tera-1 Zellen in einer 96-Well Platte ausgesät und am darauffolgenden Tag je sieben Wells je Zelllinien mit einem Luciferase-Konstrukt und dem Leervektor als Kontrolle beziehungsweise mit dem Volllängen-IFI16 cotransfiziert. Die SK-Mel28 Zellen wurden in diesem Experiment nicht verwendet, da die Transfektion mit IFI16 in einer gesteigerten Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle resultierte (Abbildung 5-9 (D) und Abbildung 5-10 (D)). Ebenfalls cotransfiziert und mitgeführt im Experiment wurden der pGL3 basic zur Hintergrund-Kontrolle der Luciferase-Aktivität in den verschiedenen Zelllinien und der pGL3 5'LTR. Im Anschluss

an 48h Inkubation erfolgte ein Luciferase-Assay und es wurden folgende Ergebnisse erhalten:



**Abbildung 5-12: Luciferase Aktivität der ori- Luciferase-Konstrukte in verschiedenen Zelllinien**

Logarithmisch dargestellt ist die Luciferase Aktivität der verschiedenen Konstrukte in **(A)** HeLa, **(B)** GH und **(C)** Tera-1 Zellen. Hierfür wurden die Zellen zunächst in einer 96-Well Platte ausgesät, mit dem entsprechenden Konstrukt und simultan mit der Kontrolle oder IFI16 contransfiziert und im Anschluss an 48 h Inkubation ein Luciferase-Assay durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils sieben unabhängigen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPrism 8.0. Im t-Test für unabhängige Proben wurden Unterschiede mit  $p < 0.05$ : \* als signifikant,  $p < 0.001$ :\*\* als hochsignifikant und  $p < 0.0001$ :\*\*\* als höchstsignifikant betrachtet und lediglich angegeben, wenn die Fold-change Differenz zwischen der Kontrolle und IFI16 höher war als in der Hintergrundkontrolle des pGL3 basic.

Werden die Luciferase-Aktivität des pGL3 basic und des pGL3 5'LTR Konstruktes in den HeLa (A) und GH (B) in Abbildung 5-12 betrachtet, verifizieren diese die Ergebnisse in Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10. Es wird jedoch keins der analysierten Konstrukte in den HeLa und Tera-1 durch IFI16 gehemmt. In den GH (B) und Tera-1 (C) Zellen ist eine leicht gesteigert Luciferase Aktivität des ori HERV-K113 Luci Konstrukts im Vergleich zur Hintergrund-Kontrolle erkennbar, jedoch ist die erwartete Hemmung in den Tera-1 Zellen nicht detektierbar. Lediglich in den GH Zellen (B) ist die erwartete höchstsignifikante Hemmung des ori HERV-K113 Luci nachweisbar.

Die Ergebnisse der multiplen Luciferase-Assays, welche in Abbildung 5-7, Abbildung 5-9, Abbildung 5-10 und Abbildung 5-12 dargestellt sind, wurden zur besseren Auswertung in Tabelle 5-1 zusammengefasst. Es folgt die vereinfachte Darstellung der

nicht analysierten (n.a.) Ergebnisse und der signifikanten Hemmung der unterschiedlichen Konstrukte durch das Vollängen-IFI16 Protein oder die PYD plus Linkerbereich in den fünf verwendeten humanen Zelllinien.

**Tabelle 5-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Luciferase-Assays**

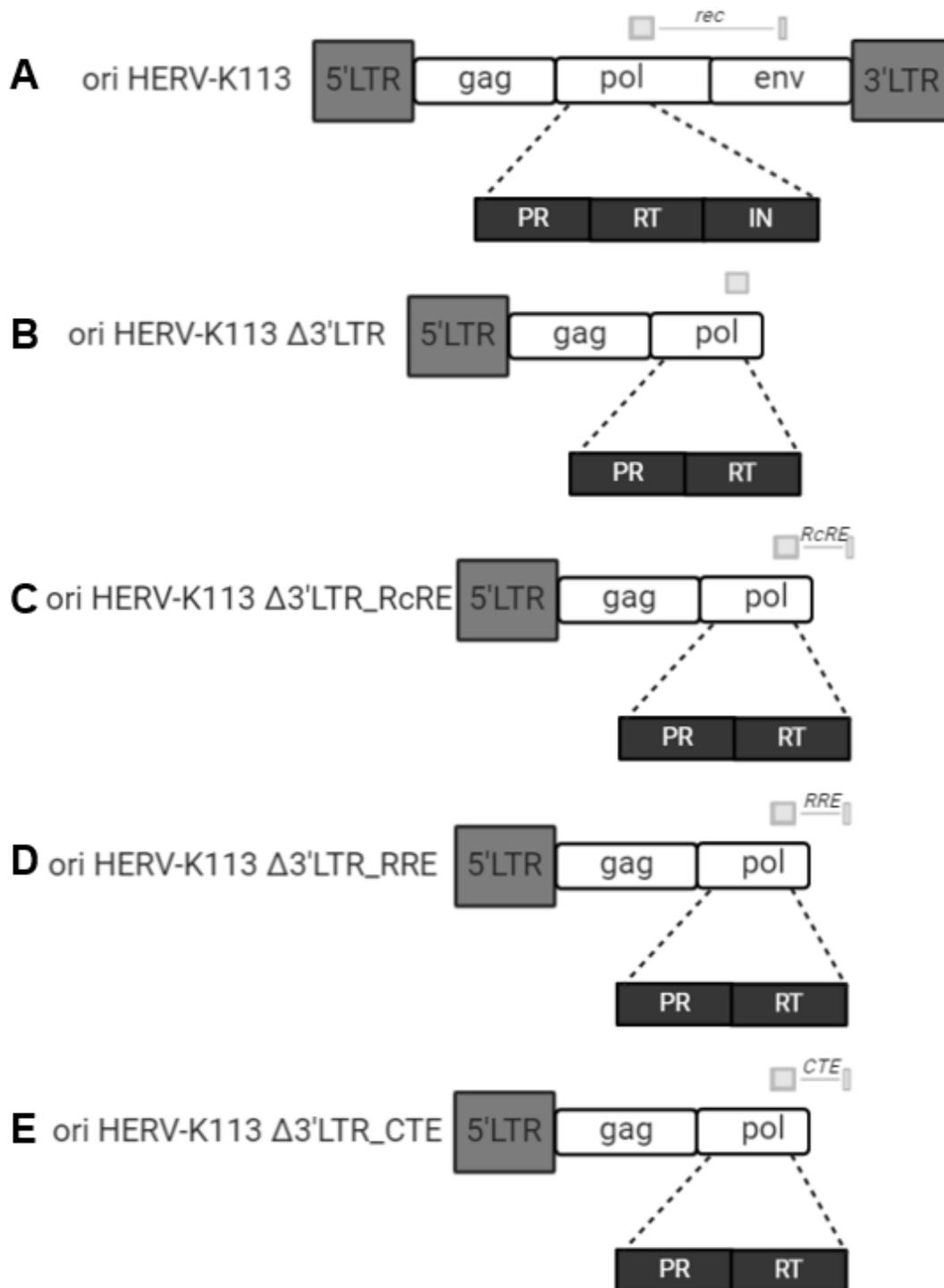
		Hek293T		HeLa		GH		Tera-1		SK-Mel28	
		IFI16	PYD+Linker	IFI16	PYD+Linker	IFI16	PYD+Linker	IFI16	PYD+Linker	IFI16	PYD+Linker
Analyse der pGL3 Konstrukte	pGL3 full LTR	-		-	-	-	-	-	-	-	-
	pGL3 3'LTR	**	<u>n.a.</u>	-	-	*	**	*	-	-	-
	pGL3 5'LTR	-		-	-	-	**	*	-	-	-
Analyse der 5'LTR	pGL3 5'LTR			-		-		-			
	ori HERV-K113 Luci	n.a.	<u>n.a.</u>	-	n.a.	***	<u>n.a.</u>	-	n.a.	n.a.	n.a.
	ori HERV-K113 Luci Δ5'LTR			-		-		-			

Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse der multiplen Luciferase-Assays. Für die Signifikanz wurde als Maßstab  $p < 0.05$ :\* als signifikant,  $p < 0.001$ :\*\* als hochsignifikant und  $p < 0.0001$ :\*\*\* als höchstsignifikant angenommen. Nicht analysierte Zusammenhänge werden durch n.a. gekennzeichnet.

Aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Luciferase-Konstrukte, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

### 5.3.2. Analyse der 3'LTR

In einem zweiten Ansatz sollte die Relevanz der 3'LTR näher untersucht werden. Hierfür erfolgte parallel zum ersten Ansatz die Klonierung multipler Konstrukte durch die betreute Praktikantin. Sie stellte folgende Konstrukte zur Verfügung:



**Abbildung 5-13: Schematische Darstellung der 3'LTR Konstrukte**

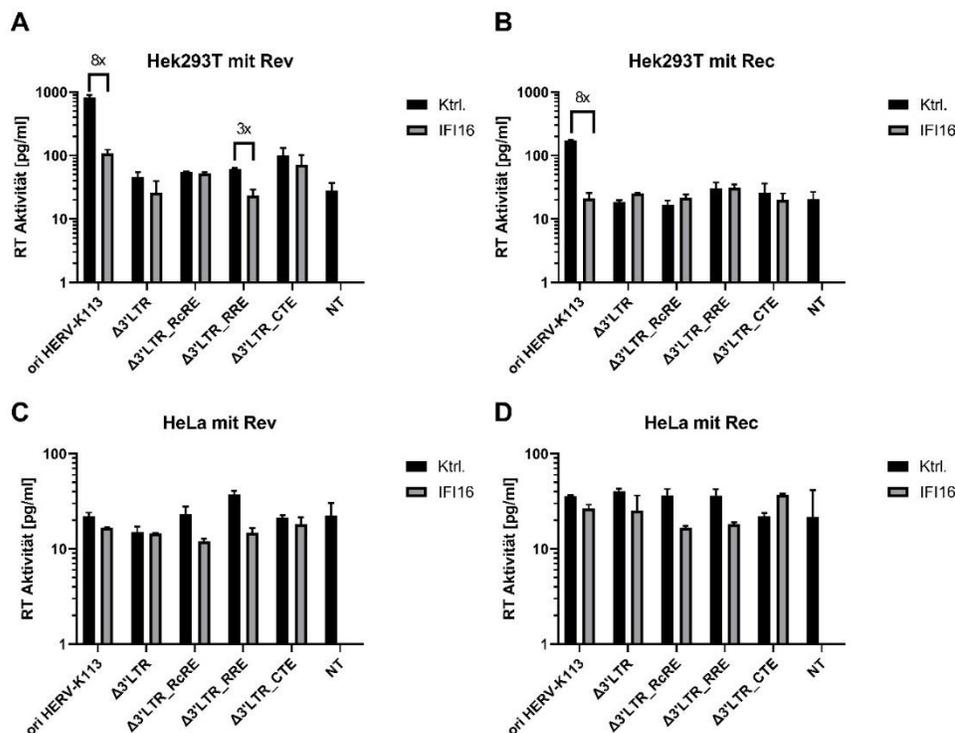
Dargestellt sind die erhaltenen Moleklarklone und deren genetische Informationen. Die Praktikantin klonierte in **(C)** das Rec-Responsive-Element (RcRE), in **(D)** das Rev-Response-Element (RRE) und in **(E)** das Konstitutive Transportelement (CTE) in den *ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR$* . Abbildung selbstständig erstellt mit BioRender.com.

In Abbildung 5-13 (A) ist der bereits zuvor verwendete Molekularklon ori HERV-K113 dargestellt. Dieser Molekularklon wurde stets als Kontrolle verwendet und sollte erwartungsgemäß die bereits in Abbildung 5-2 gezeigte Hemmung durch IFI16 in jedem Experiment nachweisen. Abbildung 5-13 (B) zeigt den ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR$ . Zur Herstellung dieses Molekularklons erfolgte zunächst der Restriktionsverdau des ori HERV-K113 mit SacI und NotI. SacI schneidet im hinteren Drittel der Reversen Transkriptase und NotI direkt hinter der 3'LTR. Es wurde somit zwischenzeitlich ein Konstrukt mit unvollständiger RT, fehlendem *env*-Gen und 3'LTR erhalten. Als Testsystem zur anschließenden Überprüfung der Konstrukte auf eine Hemmung durch IFI16 wird ein PERT-Assay durchgeführt. Mithilfe des PERT-Assays kann die Aktivität der Reversen Transkriptase bestimmt werden, welche jedoch hierfür vollständig benötigt wird. Das fehlende Stück der RT wurde mithilfe einer Amplifikations-PCR generiert und enthält am 5'-Ende die Schnittstellen SacI und am 3'-Ende die Restriktionsschnittstellen AgeI und NotI. Mithilfe der Restriktionsschnittstellen SacI und NotI erfolgte das Wiedereinbringen des RT Segments in den ori HERV-K113 Molekularklon. Erhalten wurde der *ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR$* . Dieser Molekularklon wurde vor Verwendung auf Mutationen, speziell im Bereich der nun vollständigen RT überprüft und im Anschluss an die erfolgreiche Sequenzierung für die folgenden Klonierungen und Versuche verwendet.

Viele HERV-K-Proviren exprimieren das regulatorische Protein Rec, eingezeichnet in Abbildung 5-13 (A). Da dieses Element durch Entfernen des *env*-Gens und der 3'LTR im ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR$ -Konstrukt nicht mehr vollständig vorhanden ist, ist zu erwarten, dass keine viralen Partikel den Nucleolus verlassen können, welche im PERT anschließend vermessen werden. Aufgrund dessen konstruierte die betreute Praktikantin ebenfalls die in Abbildung 5-13 dargestellten Konstrukte (C) ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR\_HERV\_RcRE$ , (D) ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR\_HIV\_RRE$  und (E) ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR\_XMRV\_CTE$  und fügte verschiedene mRNA Elemente direkt hinter die RT um den Export von viralen Partikeln wiederherzustellen. Für das ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR\_HERV\_RcRE$ -Konstrukt erfolgte die Amplifikation des RcRE von HERV-K113 aus dem ori HERV-K113 mithilfe einer PCR. Diese amplifizierte sowohl das RcRE als auch am 5'-Ende eine AgeI Restriktionsschnittstelle und am 3'-

Ende eine NotI Schnittstelle. Für das ori HERV-K113  $\Delta$ 3'LTR\_HIV\_RRE-Konstrukt erfolgte die Amplifikation des RRE aus einem HIV-1 Moleklarklon des Robert Koch-Instituts mithilfe einer PCR. Diese amplifizierte sowohl das RRE als auch am 5'-Ende eine AgeI Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine NotI Schnittstelle. Das Rev-Response-Element (RRE) von HIV-1 ist eins der am besten beschriebenen Beispiel für ein cis-wirkendes Kernexportelement [Behrens *et al.*; 2017]. Für das ori HERV-K113  $\Delta$ 3'LTR\_XMRV\_CTE-Konstrukt erfolgte die Amplifikation des CTE aus einem XMRV Moleklarklon des Robert Koch-Instituts mithilfe einer PCR. Diese amplifizierte sowohl das CTE als auch am 5'-Ende eine AgeI Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine NotI Schnittstelle. Konstitutive Transportelemente (CTEs) von Retroviren sind cis-wirkende Elemente, die den Kernexport von unvollständig gespleißten mRNAs fördern [Pasquinelli *et al.*; 1997]. Mithilfe der AgeI- und NotI-Schnittstellen erfolgte das Einbringen der verschiedenen Elemente hinter die RT und die anschließende Sequenzierung der Konstrukte. Die mutationsfreien Konstrukte wurden von der Praktikantin übergeben und selbstständig getestet.

Um die Konstrukte zu testen, wurden Hek293T und HeLa Zellen in 6-Well Platten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen, mit einer Konfluenz von 70%, mit der Kontrolle dem ori HERV-K113 oder einem der 3'LTR Konstrukte, Stufen-1 und dem Leervektor bzw. IFI16 cotransfiziert. Ebenfalls erfolgte die Cotransfektion mit dem Rev- oder Rec-Protein, um den Export der viralen mRNA durch eines der hineinklonierten Transportelementen zu fördern. Im Anschluss an 48h Inkubation mit dem Reaktionsansatz erfolgte die 40-fache Aufkonzentrierung der viralen Überstände und die Durchführung eines PERT.



**Abbildung 5-14: Restriktion der 3'LTR Konstrukte durch IFI16**

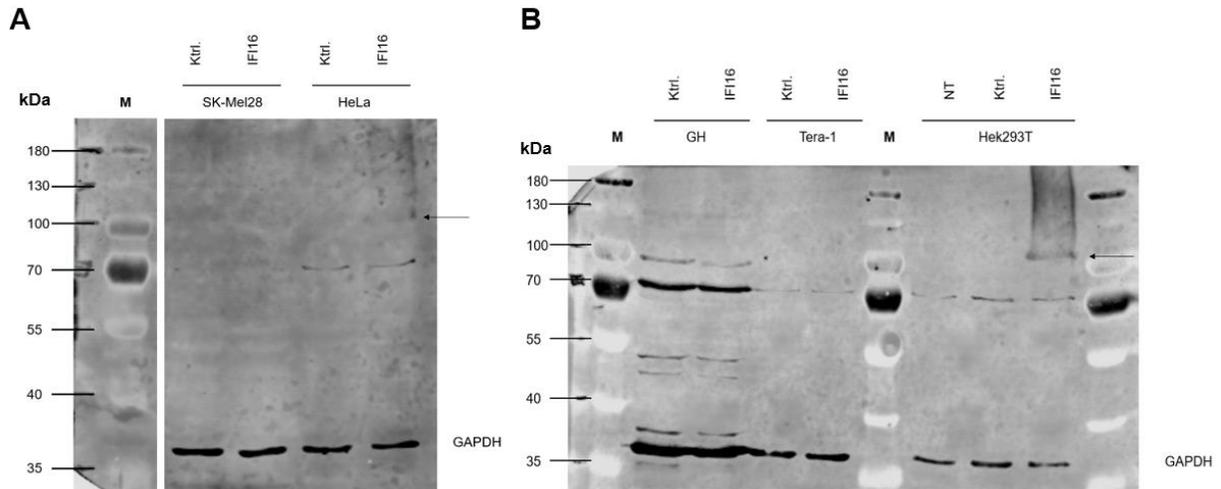
Hek293T und HeLa Zellen wurden mithilfe von Lipofectamin mit dem ori HERV-K113 Moleklarklon oder einem der 3'LTR Konstrukte, Staufen-1 und IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle transfiziert. NT bezeichnet die Ergebnisse der naiven Zellen. Im Anschluss an 48h Inkubation erfolgt die 40-fach Aufkonzentration der Überstände und Bestimmung der RT-Aktivität mittels PERT. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Replikaten.

In Abbildung 5-14 (A) und (B) sind die Ergebnisse der Hek293T Zellen dargestellt. Wird die RT-Aktivität und dementsprechend die Partikelproduktion des ori HERV-K113 betrachtet, ist sowohl in (A) als auch in (B) eine 8-fache Restriktion durch IFI16 nachweisbar. Die Cotransfektion mit Rev führt zu einer wesentlich höheren Partikelproduktion als die Cotransfektion mit Rec. Ebenfalls führt die Cotransfektion mit Rev zur signifikanten Reduktion der viralen Partikel durch IFI16 um das 3-fach des ori HERV-K113  $\Delta 3'LTR\_HIV\_RRE$ -Konstruktes. Insgesamt entspricht die gemessene RT-Aktivität der multiplen 3'LTR Konstrukte jedoch nur der ebenfalls vermessenen naiven Zellen (NT Kontrolle). Die weiteren 3'LTR Konstrukte werden nicht durch IFI16 gehemmt. Werden in Abbildung 5-14 (C) und (D) die Ergebnisse der HeLa Zellen betrachtet, wird in dieser Zelllinie die RT-Aktivität keines Konstruktes durch IFI16 reduziert. Die erwartete Restriktion des ori HERV-K113 ist nicht nachweisbar.

Insgesamt ist die RT-Aktivität aller Konstrukte auf dem Level der naiven Zellen. Da sowohl in den Hek293T als auch in den HeLa Zellen die RT-Aktivität der 3'LTR Konstrukte auf dem Level der naiven Zellen sind, wird davon ausgegangen, dass der nukleare Export der Partikel nicht möglich ist und dementsprechend eine Restriktion durch IFI16 nicht detektierbar. Der Ansatz zur Untersuchung der Relevanz der 3'LTR wird nicht weiter untersucht.

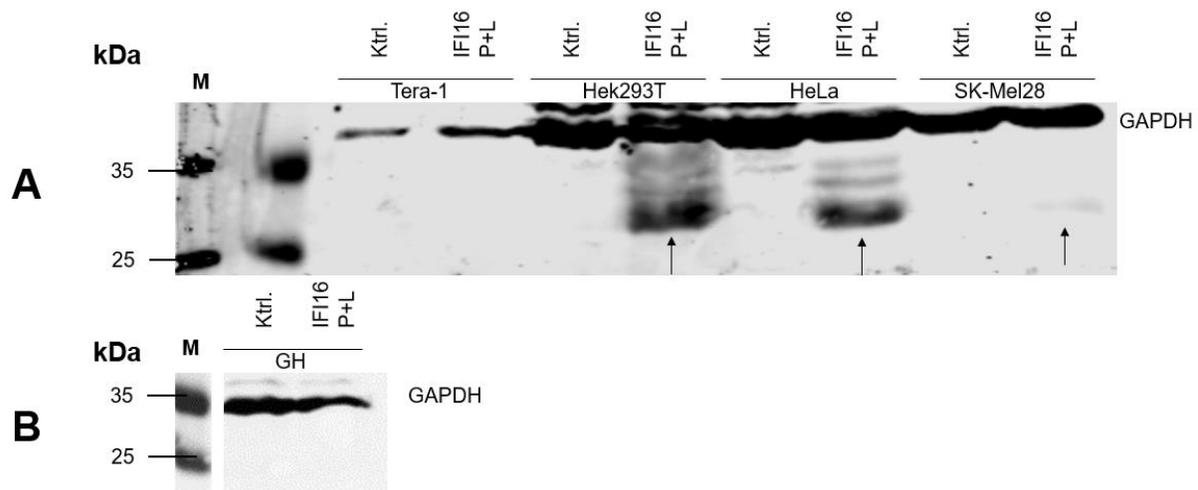
#### **5.4. Expression von IFI16 und seiner PYD plus Linkerregion**

Im Rahmen der Masterarbeit erfolgte die Überprüfung diverser Konstrukte und die Analyse des Einflusses des Volllängen-Proteins IFI16 oder der PYD plus Linkerregion auf diese. Da diese Experimente zu teils widersprüchlichen Ergebnissen führten, wie unter anderem in Tabelle 5-1 zusammengefasst, wurde in einem separaten Versuch die Expression von IFI16 und der PYD plus Linkerregion in den verschiedenen Zelllinien analysiert. Zur Überprüfung der Expression von IFI16 wurden die verschiedenen Zelllinien in einer 6-Well Platte ausgesät. Die Zellzahl wurde individuell für jede Zelllinie bestimmt und so gewählt, dass am Tag der Transfektion die Konfluenz der Zellen bei 50-70% lag. Es erfolgte die Transfektion von je einem Well mit oriST HERV-K113, Staufen-1 und dem Volllängen-IFI16 oder dem Leervektor. Zur Analyse der Expression der Pyrimidomäne plus Linkerregion erfolgte die Aussaat der verschiedenen humanen Zelllinien in einer 48- Well Platte und am darauffolgenden Tag ebenfalls die Transfektion mit dem Leervektor oder der PYD plus Linkerregion. Im Anschluss an 48h Inkubation mit dem Reaktionsansatz wurden die Zellen entsprechend 4.1.1.4 lysiert. Es erfolgte die Durchführung einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und eines Western Blots, bei dem folgende Ergebnisse erhalten wurde:



**Abbildung 5-15: Nachweis von IFI16 mittels Western-Blot-Analyse**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Es erfolgte die Aussaat der verschiedenen Zelllinien in 6-Well Platten und die Transfektion mit unter anderem der Kontrolle, dem Leervektor, und dem Volllängen-IFI16 Konstrukt. Als primäre Antikörper wurden  $\alpha$ -IFI16 und  $\alpha$ -GAPDH verwendet. Die jeweiligen Verdünnungen und entsprechenden sekundären Antikörper sind 3.1.7 zu entnehmen. In **(A)** dargestellt sind die Ergebnisse der SK-Mel28 und HeLa Zellen. **(B)** zeigt die Resultate der GH, Tera-1 und Hek293T Zellen. Banden entsprechend der untersuchten Proteingröße werden durch einen Pfeil markiert.



**Abbildung 5-16: Nachweis der IFI16 PYD plus Linkerregion mittels Western-Blot-Analyse**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Es erfolgte die Aussaat der verschiedenen Zelllinien in einer 48-Well Platte und die Transfektion mit unter anderem der Kontrolle, dem Leervektor, und der IFI16 PYD plus Linkerregion. Als primäre Antikörper wurden  $\alpha$ -IFI16 und  $\alpha$ -GAPDH verwendet. Die jeweiligen Verdünnungen und entsprechenden sekundären Antikörper sind 3.1.7 zu entnehmen. In **(A)** dargestellt sind die Ergebnisse der Tera-1, Hek293T, HeLa und SK-Mel28 Zellen. **(B)** zeigt die Resultate der GH Zellen. Banden entsprechend der untersuchten Proteingröße werden durch einen Pfeil markiert.

GAPDH dient mit einer Größe von 37 kDa als Ladekontrolle. Wie in Abbildung 5-15 und Abbildung 5-16 ersichtlich und erwartet, exprimieren alle verwendeten Zelllinien GAPDH und eine deutliche Bande in Höhe von 37 kDa ist detektierbar.

In Abbildung 5-15 erfolgte die Überprüfung der Expression von IFI16 in den fünf verschiedenen humanen Zelllinien. IFI16 ist ein 85-95 kDa großes Phosphorprotein, eine Bande entsprechend dieser Größe kann jedoch lediglich schwach in den HeLa (Abbildung 5-15 A) und deutlich in den Hek293T (Abbildung 5-15 B) Zellen nachgewiesen werden. In diesen Zelllinien kann von einer erfolgreichen Expression des Volllängen-Proteins ausgegangen werden.

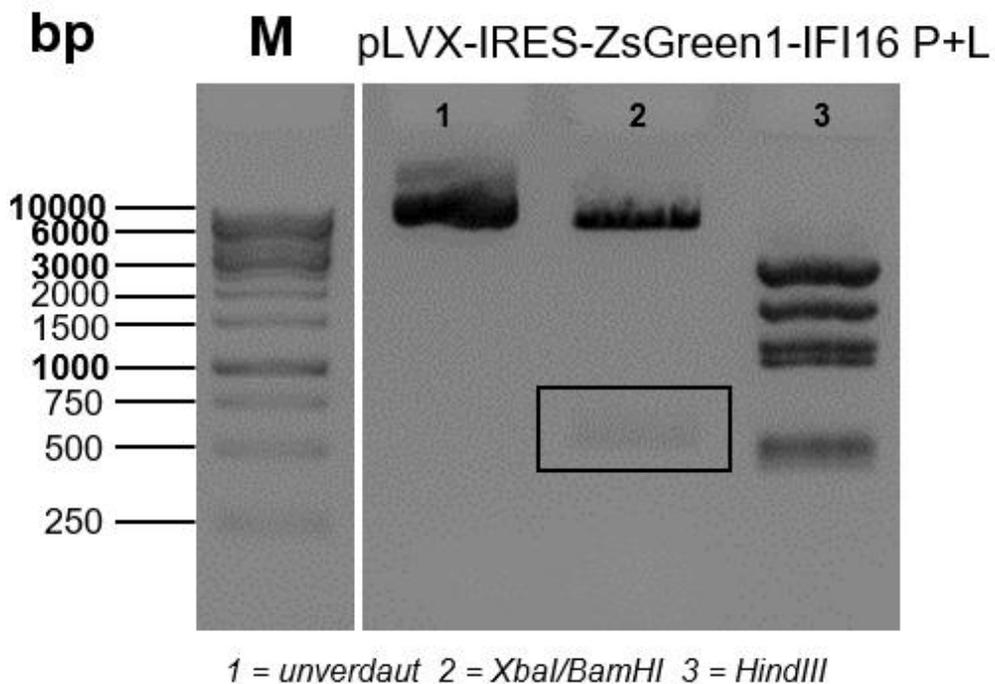
Dargestellt in Abbildung 5-16 ist die Expression der PYD plus Linkerregion in den verschiedenen Zelllinien. Bei Expression der PYD plus Linkerregion ist eine Bande entsprechend 25 kDa ist zu erwarten. Diese ist lediglich in den Hek293T und HeLa Zellen (Abbildung 5-16 A) signifikant nachweisbar. Eine schwache Bande ist ebenfalls in den SK-Mel 28 sichtbar. Da in den GH und Tera-1 Zellen keine Bande erkennbar ist, ist davon auszugehen, dass in diesen Zelllinien weder das Volllängen-IFI16 noch die PYD plus Linkerregion exprimiert wird.

## 5.5. Transduktion von IFI16

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die fünf verschiedenen humanen Zelllinien Hek293T, HeLa, GH, Tera-1 und SK-Mel28 erfolgreich transfiziert werden können (Abbildung 5-8). Die vorhandene Transfektionseffizienz war jedoch teilweise nicht ausreichend, um IFI16 oder seine PYD plus Linkerregion erfolgreich in den verschiedenen Zelllinien zu exprimieren (Abbildung 5-15 und Abbildung 5-16). Aufgrund dessen erfolgte die Klonierung eines bicistronischen lentiviralen Vektors, welcher IFI16 bzw. die PYD plus Linkerbereich enthält. Als lentiviraler Klonierungsvektor wurde der pLV-IRES-ZsGreen1 Vektor von *Clontech Laboratories* ausgewählt.

### 5.5.1. Klonierung der Transduktionsvektoren

Zunächst erfolgte die Klonierung der Transduktionsvektoren. Hierfür wurden der pLVX-IRES-ZsGreen1 Vektor und die Expressionsplasmide für IFI16 und die PYD plus Linkerbereich, welche vom Institut für molekulare Virologie des Universitätsklinikum Ulm zur Verfügung gestellt wurden, mit XbaI und BamHI verdaut. XbaI und BamHI schneiden in der MCS des pLVX-IRES-ZsGreen1 Vektors (s. Anhang Abbildung 8-5). Die mit den Restriktionsenzymen verdauten Proben wurden daraufhin in einem Agarosegel aufgetrennt, die benötigten Banden aus dem Gel extrahiert und mithilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kit* aufgereinigt. Es folgte die Ligation des geöffneten pLVX-IRES-ZsGreen1 Vektors mit IFI16 bzw. der PYD plus Linkerbereich, im Verhältnis eins zu fünf und eins zu sieben. Im Anschluss an die Ligation wurde der Ansatz in kompetente Bakterien transformiert, am darauffolgenden Tag eine Vielzahl von Kolonien gepickt, diese über Nacht in einer Schüttelkultur bei 37°C inkubiert, die Plasmid-DNA isoliert, diese mit XbaI und BamHI verdaut, die Proben in einem Agarosegel aufgetragen und das Einbringen des Inserts in den Vektor überprüft. Trotz mehrmaliger Wiederholung der multiplen Klonierungsschritte war das Einbringen des Vollängen-IFI16 Proteins in den lentiviralen Vektor nicht möglich. Es konnten jedoch zwei positive Klone des pLVX-IRES-ZsGreen1 Vektors mit eingebrachter PYD plus Linkerbereich generiert werden. Einer der vorhandenen Klone wurde retransformiert, anschließend die Plasmid-DNA im großen Maßstab isoliert, die DNA Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt und erneut auf Korrektheit überprüft.



**Abbildung 5-17: Restriktionsverdau des Transduktionsvektors**

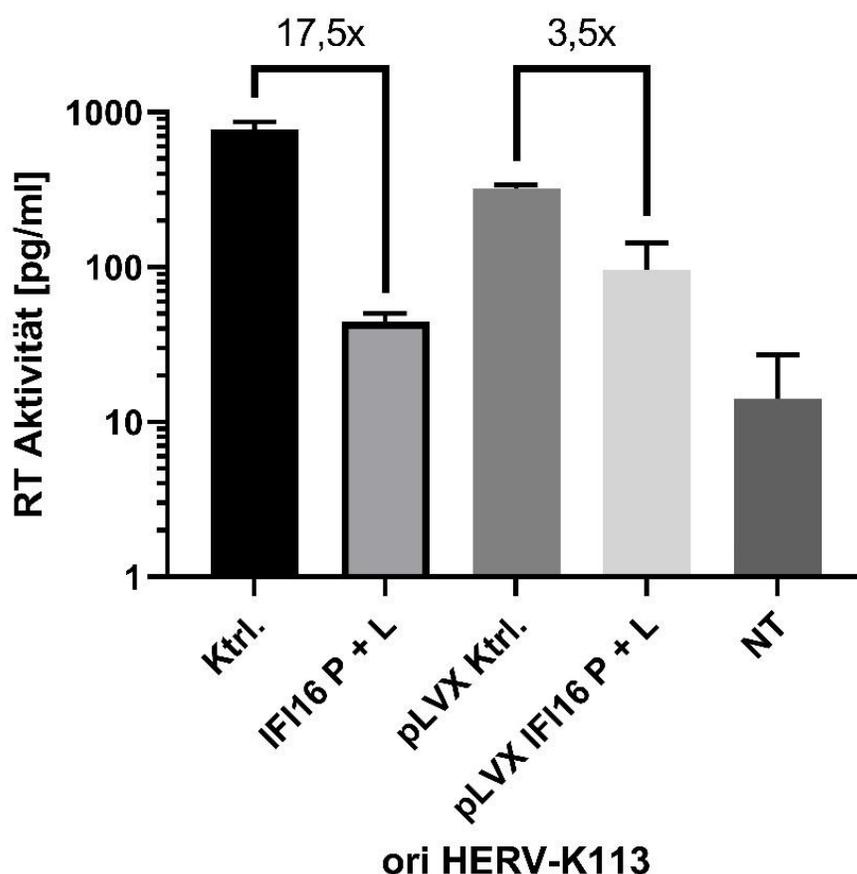
Dargestellt ist ein 1% Agarosegel, in welchem die unverdaute, mit XbaI/BamHI und mit HindIII verdaute Plasmid-DNA, welche aus dem positiven Klon isoliert wurde, aufgetragen wurde.

Die in Abbildung 5-17 abgebildete Bande, mit einer Größe von 600 bp, entspricht der Größe der PYD plus Linkerbereich und bestätigt somit das erfolgreiche Einbringen der PYD plus Linkerbereich in den pLVX-IRES-ZsGreen1 Vektor. Das erhaltene Konstrukt wird in den folgenden Versuchen als *pLVX-IRES-ZsGreen1-IFI16 P+L* oder kurz *pLVX IFI16 P+L* genannt.

### 5.5.2. Restriktion von HERV-K113 durch die IFI16 PYD plus Linkerbereich

In einem ersten Experiment sollte zunächst überprüft werden, ob die Transfektion des neuen Konstruktes zur Hemmung von HERV-K113 durch die PYD plus Linkerbereich führt. Hierfür wurde in Hek293T Zellen in 6-Well Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag transfiziert. Es erfolgte zum einen die Transfektion des ori HERV-K113 mit Stufen-1 und den Expressionsvektoren aus Ulm, dem Leervektor bzw. der PYD plus Linkerbereich. Dieser Ansatz sollte erwartungsgemäß die zuvor

gezeigte Restriktion von HERV-K113 durch IFI16 bzw. der PYD plus Linkerbereich bestätigen (Abbildung 5-2). Zum anderen wurde der ori HERV-K113 Moleklarklon mit Staufen-1 und dem Leervektor (pLVX-IRES-ZsGreen1) oder dem pLVX IFI16 P+L (pLVX-IRES-ZsGreen1-IFI16 P+L) cotransfiziert, um zu überprüfen, ob dieser Vektor in der Lage ist, HERV-K113 zu hemmen. Im Anschluss an 48h Inkubation mit den multiplen Tranfektionsansätzen erfolgte die 40-fache Aufkonzentrierung der Überstände und Vermessung der RT-Aktivität im PERT-Assay.



**Abbildung 5-18: Restriktion von ori HERV-K113 durch die IFI16 PYD plus Linkerbereich**

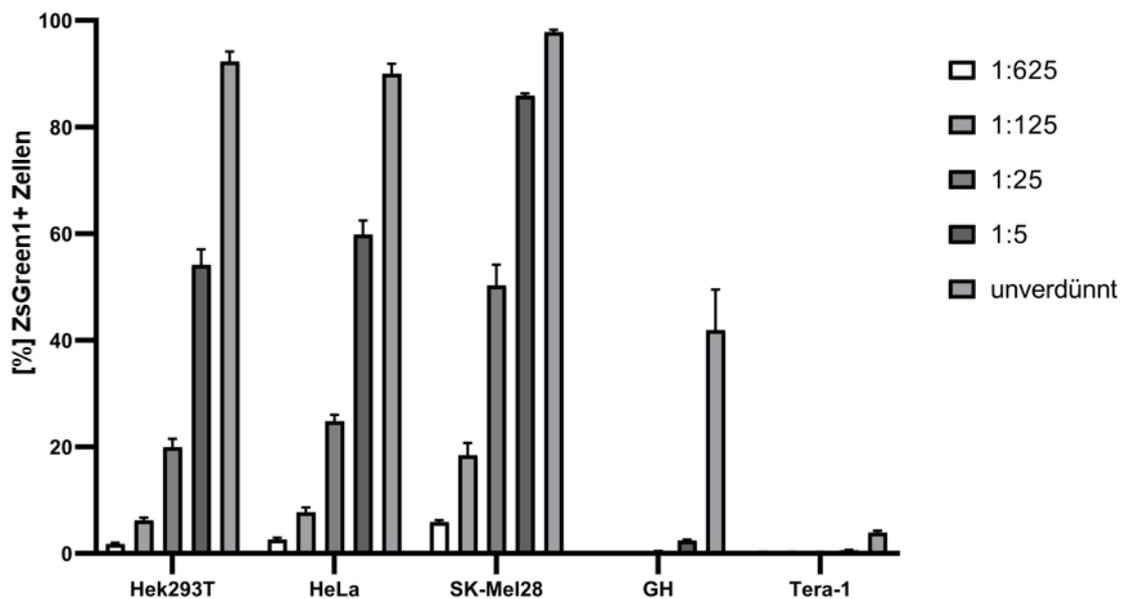
Hek293T Zellen wurden mithilfe von Lipofectamin mit dem ori HERV-K113 Moleklarklon, Staufen-1 und der PYD plus Linkerbereich bzw. der entsprechenden Kontrolle transfiziert oder dem Leervektor (pLVX-IRES-ZsGreen1) bzw. der PYD plus Linkerbereich (pLVX-IRES-ZsGreen1-IFI16 P+L). Im Anschluss an 48h Inkubation erfolgt die 40-fach Aufkonzentrierung der Überstände und Bestimmung der RT-Aktivität mittels PERT. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils fünf unabhängigen Replikaten.

Abbildung 5-18 zeigt eine 17,5-fache Restriktion des ori HERV-K113 durch die PYD plus Linkerbereich im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Dies validiert die Erwartungen. Die Funktionalität des pLVX IFI16 P+L und seine hemmende Wirkung kann durch die Reduktion der RT-Aktivität um das 3,5-fache bestätigt werden. Somit kann zusätzlich das erfolgreiche Einbringen der PYD plus Linkerbereich in den pLVX Vektor bekräftigt werden.

### **5.5.3. Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien**

Ursprünglich wurden lentiviralen Vektoren als Alternative zur Transfektion von DNA entwickelt, sie bieten den Vorteil, dass die DNA direkt in das zelluläre Genom integriert und anschließend stabil exprimiert wird. Die Fähigkeit der Lentiviren, in verschiedene Säugertierzellen zu integrieren, variiert jedoch je nach Zelllinie. Aufgrund dessen erfolgt im letzten Experiment das Überprüfen der Transduktionseffizienz der multiplen verwendeten human Zelllinien.

Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung des pLVX-IRES-ZsGreen1-IFI16 P+L Virus in Hek293T Zellen entsprechend 4.1.1.3 und die Bestimmung der RT-Aktivität mittels PERT-Assay. In der darauffolgenden Woche wurden daraufhin die Hek293T, HeLa, GH, Tera-1 und SK-Mel28 Zellen in einer 48-Well Platte ausgesät. Die Zellzahl wurde individuell für jede Zellart bestimmt und so gewählt, dass die Konfluenz der Zellen am darauffolgenden Tag bei 60% lag. An diesem Tag erfolgte die Transduktion der verschiedenen Zellen mit dem pLVX-IRES-ZsGreen1-IFI16 P+L Virus, beschrieben in 4.1.1.5. Dabei wurde das konzentrierte Virus und verschiedene Verdünnungsstufen des Virus verwendet. Die Verdünnung des Virus erfolgte seriell eins zu fünf vor der Transduktion. Die Inkubationszeit der Zellen mit den verschiedenen Virusverdünnungen betrug zwei Stunden bei 37°C. Anschließend erfolgte ein Wechsel des Mediums und die Inkubation für weitere 48h. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte abschließend durch Aufnahme von Fluoreszenzbildern und FACS Analyse der Zellen, bei der folgendes Ergebnis erhalten wurde:



**Abbildung 5-19: Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an ZsGreen1+ Zellen der verschiedenen humanen Zelllinien. Die Zellen wurden hierfür zunächst in einer 48-Well Platte ausgesät, am darauffolgenden Tag mit den verschiedenen Virusverdünnungen transduziert und nach 48 h mithilfe des FACS vermessen. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Replikaten.

Anhand Abbildung 5-19 ist erwiesen, dass bei Transduktion mit dem unverdünnten Virus mehr als 95% der Hek293T, HeLa und SK-Mel28 Zellen erfolgreich transduziert werden. Bei den Hek293T, HeLa und SK-Mel28 ist zusätzlich eine signifikante Abhängigkeit von der Konzentration detektierbar und die sukzessive Abnahme der Transduktionseffizienz entsprechend dieser nachweisbar. Werden die GH Zellen betrachtet, ist lediglich bei der Transduktion mit dem unverdünnten Virus eine ZsGreen1+ Anteil von 40% sichtbar, welcher jedoch nicht ausreichend ist für die Verwendung der Zelllinie in weiteren Transduktionsversuchen. Ebenfalls nicht weiter für Transduktionsexperimente geeignet sind die Tera-1 Zellen. In dieser Zelllinie ist bei Transduktion mit dem unverdünnten Virus lediglich ein Anteil von 5% ZsGreen1+ Zellen zu vermessen. Die FACS Ergebnisse werden durch die visuellen Ergebnisse der Fluoreszenzaufnahmen bestätigt (s. Anhang Abbildung 8-6).

## 6. Diskussion

Retroviren können neben epigenetischen Kontrollmechanismen durch verschiedene virale Restriktionsfaktoren gehemmt werden. Ein Restriktionsfaktor, welcher bereits für eine Vielzahl von Viren identifiziert wurde, ist das Interferon-induzierte Protein 16 (IFI16). Durch eine Gruppe von Forschern konnte demonstriert werden, dass der Knock-Down der IFI16-Expression zu einer erhöhten humane Cytomegalovirus (HCMV) Replikation und eine erhöhte Expression des IFI16-Proteins wiederum zur Reduktion der viralen Partikelproduktion führt [Gariano *et al.*; 2012]. Gleichermaßen wirkt IFI16 als Restriktionsfaktor für das Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1). Eine weitere Gruppe von Wissenschaftlern untersuchte die Wirkung von IFI16 in Epithelzellen und konnten zeigen, dass IFI16 die Produktion von IFN- $\alpha$  aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Inhibition von HSV-1, welches IFN- $\alpha$  für die Expression von antiviralen Genen benötigt [Conrady *et al.*; 2012]. Ergänzend beeinflusst wird die virale Transkription und Replikation des humanen Papillomvirus durch IFI16. [Lo Cigno *et al.*; 2015] vermuteten verschiedene Faktoren, unter anderem die SP1 Bindestelle, die die Hemmung durch IFI16 beeinflussen. IFI16 scheint folglich eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation zu spielen und beeinträchtigt vermutlich die virale Synthese, was zur Inhibition verschiedenster Viren führt. Neben HCMV und HSV-1 wurde die Restriktion von Retroviren durch IFI16 untersucht. [Jakobsen *et al.*; 2013] zeigten bereits frühzeitig, dass IFI16 in der Lage ist, DNA, die während der Replikation von HIV-1 entsteht, zu detektieren und das angeborene Immunsystem zu aktivieren und darauffolgend die Replikation von HIV-1 zu inhibieren. Im Fokus dieser Arbeit steht daher die Analyse der Restriktion des Betaretrovirus HERV-K113(HML-2) durch IFI16 und der Mechanismus, der diese hervorruft.

Bereits im früheren Verlauf des Projektes konnte die Hemmung der viralen Partikelproduktion durch IFI16 bei Verwendung eines vollständigen Moleklarklons durch die Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts gezeigt werden [Zumblick; 2019; Savas; 2020]. Diese Restriktion sollte zu Beginn dieser Arbeit reproduziert werden. Hierfür erfolgte die Cotransfektion des oriST HERV-K113 Moleklarklons mit Staufen-1 und dem Expressionsplasmid für IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle. Bei dem oriST HERV-K113 Moleklarklon handelt es sich um ein, durch die Arbeitsgruppe des

Robert Koch-Instituts, rekonstruiertes Provirus, in dem die Funktionalität der Reversen Transkriptase und des *env*-Gens wiederhergestellt (wie im ori HERV-K113 Molekularklon) und zusätzlich alle postinsertionalen Mutationen revertiert wurden. Zwischen den beiden in der Arbeit verwendeten Molekularklonen bestehen jedoch keine Unterschiede in Bezug auf Morphologie, RT-Aktivität und Proteinexpression [Lausch; 2013]. Staufen-1 ist ein humanes Protein, welches als Bindungs- und Interaktionspartner von Rec und Gag zu einer erhöhten Partikelproduktion führt [Hanke *et al.*; 2013] und die Expression von IFI16 nicht beeinflusst. Die Bereitstellung des Expressionsplasmids für IFI16, weitere IFI16 Mutanten und die entsprechende Kontrolle erfolgte durch das Institut für molekulare Virologie des Universitätsklinikum Ulm und wurden bereits zur Analyse der Restriktion von HIV-1 durch IFI16 und weitere Vertreter der PYHIN Proteinfamilie verwendet [Hotter *et al.*; 2019; Bosso *et al.*; 2020]. Bei Cotransfektion der Plasmide gelangen diese in den Zellkern der Zielzelle und werden dort in mRNA transkribiert. Im Anschluss daran erfolgt die Translation des IFI16 Proteins im Cytoplasma und die Relokalisation des Proteins in den Zellkern aufgrund des zweiteiligen Kernlokalisierungssignals, welches sich in der Linkerregion befindet. Der oriST HERV-K113 Molekularklon ist in der Lage, virale Partikel zu bilden, welche nicht in der Lage sind, zu replizieren, jedoch aufgrund ihrer RT-Aktivität mittels PERT-Assays quantifiziert werden können. Zusätzlich bietet die RT-qPCR die Möglichkeit, die relative Kopienanzahl von HERV Viren pro Reaktionsansatz zu bestimmen. Die circa 713-fache Hemmung der HERV Kopienanzahl durch IFI16 in der RT-qPCR ist jedoch nur bedingt zu berücksichtigen, da die Werte der inhibierten Proben unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Eine exakte Detektion von HERV Viren ist grundsätzlich nur begrenzt möglich, da die Ergebnisse häufig durch die bereits im Genom vorhandenen endogenen Viren kontaminiert und verfälscht werden. Aufgrund dessen wurden im weiteren Verlauf der Masterarbeit lediglich PERT-Assays zum Nachweis der viralen Partikelproduktion verwendet. Mithilfe des PERT-Assays und der RT-qPCR konnte dennoch die erwartete Restriktion von HERV-K113 durch IFI16 bewiesen und mittels PERT-Assay reproduziert werden (Abbildung 5-2). Ergänzend ist dennoch anzumerken, dass sowohl [Savas; 2020] als auch [Zumblick; 2019] wesentlich stärkere Restriktionen im PERT-Assay in ihren Arbeiten zeigen konnten, welche sich jedoch nicht vergleichen lassen, da beide eine andere experimentelle Durchführung wählten,

welche sich im Wesentlichen in der Transfektionsmethode und einer erhöhten viralen Aufkonzentration unterscheiden. Es konnte allerdings eindeutig gezeigt werden, dass auch bei HERV-K113 IFI16 als viraler Restriktionsfaktor wirkt.

Die von [Jakobsen *et al.*; 2013] gezeigte Restriktion von HIV-1 durch IFI16 wurde durch weitere Arbeitsgruppen näher untersucht. Beispielsweise zeigten [Hotter *et al.*; 2019], dass die Transkription von HIV-1 durch die Bindung von IFI16 an den zellulären Transkriptionsfaktor SP1 inhibiert wird. Zuvor zeigten [Fuchs *et al.*; 2011], dass multiple GC-Boxen in der HERV-K LTR als Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1 dienen, welche daher als regulatorische Transkriptionsfaktoren der LTR in Frage kommen. [Zumblick; 2019] untersuchte aufgrund dieser Ergebnisse in ihrer Masterarbeit, ob die Partikelproduktion des ori HERV-K113 durch Cotransfektion mit SP1 gesteigert und durch IFI16 beeinflusst wird. Ihre Ergebnisse führten jedoch zu keinen neuen Erkenntnissen. Die zuvor erwähnte von [Hotter *et al.*; 2019] gezeigte Restriktion von HIV-1 durch IFI16 war zusätzlich abhängig von einer vollständig vorhandenen viralen LTR, konnte jedoch nicht bei Konstrukten, welche einen CMV-Promotor anstelle der 5'LTR enthielten, gezeigt werden. Da im Robert Koch-Institut ein HERV-K Molekularklon mit CMV-Promotor anstelle der U3-Region der 5'LTR vorhanden ist, wurde dieser im folgenden Experiment verwendet. Die selbst durchgeführte Cotransfektion des CMV\_oriST HERV-K113 Molekularklons mit Staufen-1 und IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle reproduzierte diese Ergebnisse. Wie zu erwarten, führte die Verwendung des starken CMV-Promotors grundsätzlich zu einer höheren Transkriptionsrate und dementsprechend höheren Partikelproduktion im Vergleich zum oriST HERV-K113 Molekularklon (Vgl. Abbildung 5-2 und Abbildung 5-3). Jedoch zeigt Abbildung 5-3, dass bei Austausch der U3-Region der viralen 5'LTR durch einen CMV-Promotor die virale Partikelproduktion nicht durch IFI16 gehemmt wird. Dieses Ergebnis suggeriert, dass die LTR, speziell die U3-Region, eine wichtige Rolle für die Restriktion der Partikelproduktion durch IFI16 spielt und bestätigen die Ergebnisse der vorherigen Arbeiten.

Normalerweise wird die Transkription von exogenen Viren, die verschiedene Wirtszellen infizieren, durch Kernpromotor Elemente und durch ein TATA-Box- Motiv

initiiert. Die LTRs von HERV-K agieren jedoch wie unabhängige Promotoren, da diese kein Initiator Motiv besitzen und nicht durch Kernpromotor-Elemente reguliert werden [Fuchs *et al.*; 2011]. Des Weiteren zeigten [Buzdin *et al.*; 2006], dass mindestens 50% der HERV-K(HML-2) LTRs Promotoraktivität besitzen und das Transkriptionsniveau der einzelnen LTRs stark variiert. Die Promotoraktivität wird durch die Position, in Bezug auf das zu regulierende Gen, beeinflusst und 5'-provirale LTRs zeigten durchschnittlich höhere Promotoraktivitäten [Buzdin *et al.*; 2006]. Zur weiteren Untersuchung des Wirkmechanismus von IFI16 auf HERV-K, spezifisch die LTRs und zur Analyse der unterschiedlichen Promotoraktivitäten der 5'-, 3'- und vollständigen LTR erfolgte die Klonierung und anschließende Testung verschiedener Luciferase-Reporter Konstrukte. Als Luciferase-Reporter Vektor wurde hierfür der *pGL3 basic* Vektor von Promega ausgewählt. N-terminal der Luciferase erfolgte bereits zuvor das Einbringen der 5'LTR durch [Zumblick; 2019]. Selbstständig erfolgte die Generierung eines Konstruktes mit lediglich der C-terminalen 3'LTR und einem Konstrukt mit vollständiger LTR. Die verschiedenen pGL3-Luciferase-Konstrukte sind in Abbildung 5-6 schematisch abgebildet und wurden im Anschluss an die Sequenzierung zunächst in Hek293T Zellen hinsichtlich ihrer Luciferase-Aktivität untersucht. Ein Initialexperiment der Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass das pGL3 5'LTR Konstrukt nicht durch IFI16 gehemmt wird. Wie zu erwarten, wurde dies reproduziert (Abbildung 5-7). Erwartet wurde jedoch, dass das Einbringen der vollständigen LTR Sequenz in den pGL3 Vektor in einer Restriktion durch IFI16 resultiert, da davon ausgegangen wurde, dass zur Restriktion, wie im ori/oriST HERV-K113 Moleklarklon, die vollständige LTR benötigt wird. Diese Erwartung konnte nicht bestätigt werden. Überraschenderweise konnte eine hochsignifikante Hemmung der Luciferase-Aktivität des pGL3 3'LTR Konstrukt durch IFI16 detektiert werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs können jedoch nur bedingt gewertet werden, da insgesamt keine der LTRs als Promotor in den Hek293T Zellen fungierte und somit auch nur geringfügige Unterschiede zwischen der Hintergrund Luciferase-Aktivität (dem pGL3 basic) und den verschiedenen Konstrukten nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit vorhandener Literatur, da bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass HERV-K LTR-Promotoren in Hek293T-Zellen extrem schwach sind [Lee & Bieniasz; 2007].

Aufgrund der nur sehr schwach vorhandenen Promotoraktivität der einzelnen 5'-, 3'- und der vollständigen LTR wurden weitere Zelllinien benötigt, um die multiplen pGL3 Konstrukte hinsichtlich der Promotoraktivität der LTRs und den Einfluss von IFI16 auf diese zu untersuchen. Hierfür wurden vier weitere Zelllinien ausgewählt und daraufhin die Hek293T, HeLa, GH, Tera-1 und SK-Mel28 Zellen hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz mithilfe des pMAX-GFP Plasmids analysiert. Bei dem pMAX-GFP Vektor handelt es sich um einen simplen Expressionsvektor für die codierende Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins GFP, welches durch einen CMV-Promotor reguliert wird. Die zusätzlich zu den Hek293T analysierten Zelllinien sind ebenfalls humanen Ursprungs. Es wurden die HERV-K-exprimierenden Teratokarzinom-Zelllinien GH und Tera-1 und nicht-exprimierenden HeLa-Zellen verwendet [Knössl *et al.*; 1999]. Bei den GH und Tera-1 Zellen handelt es sich um Zellen aus humanem Teratokarzinom, HeLa Zellen wurden ursprünglich aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms isoliert. Zusätzlich wurde die Melanomzelllinie SK-Mel28 verwendet, welche in der Lage ist, HERV endogen zu bilden. Werden die FACS Daten in Zusammenhang mit den Fluoreszenzbildern betrachtet, bestätigen diese die visuellen Ergebnisse. Die Hek293T und HeLa Zellen zeigen eine sehr hohe Transfektionseffizienz mit über 90%. Dies bestätigt die Erwartungen, da Hek293T und HeLa Zellen sowohl von vielen Herstellern für Transfektionsreagenzien, als auch von Bereitstellern für diverse Nachweismethoden als Standard verwendet werden. Die FACS Daten der GH und Tera-1 Zellen überbieten die visuellen Erwartungen deutlich, was sich dadurch erklären lässt, dass im FACS jede Zelle, welche auch nur ein leichtes fluoreszierendes Signal exprimiert, als positiv gilt. In den visuellen Aufnahmen sind jedoch signifikante Unterschiede in der Intensität des GFP+ Signals einzelner Zellen erkennbar. Ein Großteil der Zellen fluoresziert lediglich schwach, dies lässt auf eine lediglich schwache Expression des Proteins schließen. Eine weitere Erklärung bietet das verwendete Plasmid, der pMAX-GFP, bei welchem es sich erfahrungsgemäß um ein relativ kleines und einfach zu transfizierendes Plasmid handelt. Die SK-Mel28 Zellen bestätigen sowohl die visuellen Erwartungen als auch die Herstellerangaben. Werden verschiedene Literaturquellen und Angaben zu Transfektionsreagenzien verglichen, wird stets eine Transfektionseffizienz von 50-70% für diese Zelllinie angegeben. Grundsätzlich gelten jedoch alle analysierten Zelllinien als leicht zu

transfizieren (>50% Transfektionseffizienz) und wurden aufgrund dessen für die weiteren Versuche im Rahmen der Masterarbeit verwendet.

Im nächsten Schritt wurden die vier Zelllinien, HeLa, GH, Tera-1 und SK-Mel28 mit den pGL3 Konstrukten und IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle cotransfiziert. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich das Potential der 5'- und vollständigen LTR als Promotor. Ergänzend kann in den GH und Tera-1 Zellen die Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Hintergrund-Kontrolle (dem pGL3 basic) durch das Einbringen der 3'LTR in den pGL3 basic Vektor gesteigert werden. In diesem Konstrukt kann zusätzlich die Restriktion der Luciferase-Aktivität durch IFI16 in den GH und Tera-1 Zellen demonstriert werden. Des Weiteren wird die Luciferase-Aktivität des pGL3 5'LTR Konstruktes in den Tera-1 Zellen signifikant inhibiert. Insgesamt sind die Fold-change Differenzen zwischen der Kontrolle und den IFI16 transfizierten Proben trotz ihrer Signifikanz jedoch kaum sichtbar, sodass im nächsten Schritt probiert wurde, diese deutlich ausgeprägter und erneut nachzuweisen.

[Hotter *et al.*; 2019] konnten bereits im Jahr 2019 zeigen, dass zur Restriktion von HIV-1 nicht das Volllängen-Protein IFI16 nötig ist. Die N-terminalen 191 Aminosäuren von IFI16, die die Pyrin- und NLS-enthaltende Linker-Domänen umfassten, waren ausreichend für eine starke Anti-HIV-1-Aktivität. Im Jahre 2020 konnten sie für ein weiteres Protein der PYHIN-Familie, PYHIN1, zeigen, dass die Pyrimdomäne (PYD) plus Linker-Region nicht nur ausreichend, sondern sogar stärker hemmend wirkt als das Volllängen-Protein [Hotter *et al.*; 2019; Bosso *et al.*; 2020]. Aufgrund dessen wurde im folgenden Versuch probiert, explizit die durch IFI16 ausgelöste Restriktion des pGL3 3'LTR Konstruktes in den GH und Tera-1 Zellen und die signifikante Inhibition des pGL3 3'LTR Konstruktes in den Tera-1 Zellen durch Cotransfektion aller Zelllinien mit den pGL3 Konstrukten und der IFI16 Pyrimdomäne plus Linkerregion zu steigern, die multiplen Fold-change Differenzen und somit Signifikanzen zu steigern. Im Rahmen dieses Versuches konnten die Promotoraktivität der einzelnen 5', und 3' und vollständigen LTR in den verschiedenen Zelllinien reproduziert werden. Erwartet wurde, dass die zuvor gezeigte signifikante Restriktionen durch IFI16 nun erneut repliziert werden kann oder diese gegebenenfalls sogar gesteigert und eine deutlichere

Hemmung der Luciferase-Aktivität detektiert werden kann. Überraschenderweise ist dies lediglich in den GH Zellen der Fall. Es kann zusätzlich zur hochsignifikanten Hemmung des pGL3 3'LTR Konstruktes, das pGL3 5'LTR Konstrukt durch die PYD plus Linkerregion inhibiert werden. In den HeLa, Tera-1 und SK-Mel28 Zellen ist keine Reduktion der Luciferase-Aktivität eines Konstruktes detektierbar. Die Fold-change Differenzen sind in diesem Versuch erneut trotz ihrer Signifikanzen schwer zu detektieren und erscheinen nicht verlässlich. Ergänzend sollte erwähnt werden, dass sowohl bei Cotransfektion des Vollängen-Proteins als auch bei Cotransfektion der IFI16 PYD plus Linkerregion in den SK-Mel28 Zellen stets eine gesteigerte Luciferase-Aktivität im Vergleich zur mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle vermessen wurde. Diese gesteigerte Luciferase-Aktivität ist jedoch nicht signifikant zur Hintergrund-Kontrolle (dem pGL3 basic) und wird auf Grund dessen nicht weiter beachtet, führt jedoch zur Exklusion der Zelllinie für weitere Luciferase-Assays. Zusammenfassend konnte in den HeLa, GH, Tera-1 und SK-Mel28 die unterschiedliche Promotor-Aktivität der 5'-, 3'- und vollständigen LTR nachgewiesen werden. Dies bestätigt die durch [Buzdin *et al.*; 2006] gezeigten Daten, dass die Promotoraktivität abhängig von der Position, in Bezug auf das zu regulierende Gen, ist und die 5'LTR das stärkste Promotorpotential in allen Zelllinien zeigt. Ergänzend wurde in den Hek293T, GH und Tera-1 Zellen das pGL3 3'LTR Konstrukt und in den GH und Tera-1 Zellen das pGL3 5'LTR Konstrukt durch IFI16 oder seine PYD plus Linkerregion gehemmt, sodass erneut die Relevanz der LTR für die Restriktion von HERV-K113 durch IFI16 bestätigt, jedoch nicht näher eingegrenzt, werden konnte.

Ein wesentliches Ziel der Masterarbeit war die Identifikation des funktionellen Bereiches des viralen Genoms von HERV-K113 für die Restriktion durch IFI16. Da jedoch mithilfe der multiplen Luciferase-Assays diese Frage nicht eindeutig geklärt werden konnte, erfolgte der Versuch, den funktionellen viralen Bereich mithilfe weiterer Ansätze zu identifizieren. Hierfür klonierte die im Rahmen der Masterarbeit betreute Praktikantin weitere Konstrukte. Im ersten Ansatz erfolgte die Klonierung zweier weiterer Konstrukte, welche in Abbildung 5-11 schematisch abgebildet sind. Mithilfe der neuen Konstrukte sollte systematisch der essenzielle Bereich der 5'LTR identifiziert werden. Als Kontrolle sollte hierfür das erste Konstrukt der *ori HERV-K113 Luci*

Molekularklon verwendet werden. Bei diesem Molekularklon sind, wie im ori/oriST HERV-K113 Molekularklon, alle genetischen Informationen zur Bildung des vollständigen viralen Genoms vorhanden. Zusätzlich wurde jedoch hinter die 5'LTR in die Leader-Region des HERV Genoms das Luciferase-Gen kloniert. Es wurde davon ausgegangen, dass bei Cotransfektion dieses Molekularklons mit IFI16 die Luciferase-Aktivität gehemmt wird. Zur sukzessiven Identifikation des essenziellen Bereichs der 5'LTR diente das zweite generierte Konstrukt (*ori HERV-K113 Luci Δ5'LTR*), bei dem die vollständige 5'LTR entfernt und durch das Luciferase-Gen ersetzt wurde. In diesem Konstrukt wurden die Restriktionsstellen so gewählt, dass die 5'LTR schrittweise wieder eingebracht werden kann. Die Testung der neu generierten Konstrukte, der Hintergrund-Kontrolle (dem pGL3 basic) und die erneute Analyse des pGL3 5'LTR Konstruktes erfolgte in HeLa, GH und Tera-1 Zellen. Die erwartete Restriktion der Kontrolle des ori HERV-K113 Luci Konstruktes durch IFI16 konnte jedoch nur höchstsignifikant in den GH und in keiner weiteren Zelllinie demonstriert werden. Dies ist besonders bedauerlich, da mithilfe des neuen Luciferase-Konstruktes ein weiteres Read-Out System zusätzlich zum PERT-Assay etabliert hätte werden können. Ergänzend konnten in diesem Experiment die Ergebnisse des pGL3 basic und des pGL3 5'LTR Konstruktes in den HeLa und GH Zellen reproduziert, in den Tera-1 jedoch nicht erneut gezeigt werden.

Zur übersichtlicheren Darstellung erfolgte eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Luciferase-Assays in Tabelle 5-1. Wird diese Tabelle betrachtet, sind deutlich die widersprüchlichen Ergebnisse sichtbar, aufgrund dessen die Luciferase-Konstrukte nicht weiter im Rahmen der Masterarbeit verwendet wurden. Grundsätzlich wurde erwartet, dass bei vorhandenem vollständigem viralem Genom (*ori HERV-K113 Luci*) die Restriktion durch IFI16, wie im ori/oriST HERV-K113, nachgewiesen werden kann (Abbildung 5-2). Dies ist jedoch lediglich in einer Zelllinie, den GH Zellen, möglich (Abbildung 5-12 B). Bei Betrachtung der Resultate des pGL3 5'LTR Konstruktes wird dieses Konstrukt lediglich in den GH Zellen durch die IFI16 PYD plus Linkerregion gehemmt. Die Hemmung des Konstruktes in den Tera-1 Zellen wird nicht berücksichtigt, da diese lediglich in Abbildung 5-9, jedoch nicht in Abbildung 5-12 detektierbar war. Es ist möglich, dass bei der Durchführung eines der beiden

Luciferase-Assays gegebenenfalls Pipettierfehler oder Luftblasen zu einem verfälschten Ergebnis führten. Es kann jedoch nicht bestimmt werden, in welchem dies der Fall war. Werden insgesamt die Ergebnisse der Tabelle 5-1 betrachtet, erscheint die 3'LTR eine wesentlich signifikantere Rolle für die Hemmung von HERV-K113 durch IFI16 zu spielen, da das pGL3 3'LTR Konstrukt am häufigsten und am signifikantesten in drei (Hek293T, GH und Tera-1) von fünf Zelllinien inhibiert wird.

In einem weiteren Ansatz erfolgte daher die Untersuchung der Relevanz der 3'LTR für die Restriktion von HERV-K113 durch IFI16. Die verwendeten Konstrukte und ihre genetischen Informationen sind schematisch in Abbildung 5-13 dargestellt. Als erstes erhalten wurde das *ori HERV-K113 Δ3'LTR* Konstrukt, in welchem alle genetischen Informationen hinter der RT, dementsprechend die IN, das *env*-Gen und die vollständige 3'LTR deletiert wurden. Dieses Konstrukt wurde als Zwischenprodukt für die weiteren Klonierungen verwendet, jedoch auch in dem darauffolgenden Experiment eingesetzt. Die HERV-K (HML-2)-Viren, zu denen HERV-K113 gehört, sind die jüngsten der humanen endogenen Retroviren. Viele dieser HERV-K-Proviren exprimieren das regulatorische Protein Rec, ein in HERV-K mRNAs vorhandenes Element, das RcRE, bindet [Gray *et al.*; 2019]. Diese Interaktion ist notwendig für den nukleo-cytoplasmatischen Export der mRNA und daher die anschließende Bildung von viralen Partikeln. Erwartet wurde daher, dass in dem *ori HERV-K113 Δ3'LTR* Konstrukt keine Hemmung der RT-Aktivität im PERT-Assay durch IFI16 nachgewiesen werden kann, da in diesem Konstrukt, aufgrund der Deletion des gesamten Bereiches hinter der RT, das Protein Rec nicht erfolgreich exprimiert wird und es lediglich zur Bildung von unvollständig gespleißten Transkripten kommt. Um den mRNA Export wiederherzustellen und im folgenden Experiment zu gewährleisten, klonierte die Praktikantin Sequenzen verschiedener mRNA Transportelemente hinter die RT des *ori HERV-K113 Δ3'LTR* Konstruktes. Sie klonierte zum einen die Sequenz des Rec-Responsive-Element (RcRE) des *ori HERV-K113* Molekularklons hinter die RT, entnommen aus [Magin *et al.*; 1999]. Zum anderen die Sequenz des Rev-Response-Elements (RRE) von HIV-1, entnommen aus [Zapp & Green; 1989]. Und abschließend das cis-wirkende konstitutive Transportelement (CTE), entnommen aus einem XMRV Molekularklon des Robert Koch-Instituts [Wang *et al.*; 2015]. Alle drei akzessorischen

Proteine ähneln sich funktionell und wirken als posttranskriptionelle Transaktivatoren. Mithilfe der drei verschiedenen Elemente sollte der unvollständig gespleißte mRNA Export gefördert und die Möglichkeit der Vermessung der RT-Aktivität im PERT-Assay wiederhergestellt werden. 1989 beobachteten [Hadzopoulou-Cladaras *et al.*; 1989], erstmals, dass das Vorhandensein von Rev, einem der neu synthetisierten Hilfsproteine, für die effiziente Produktion von intronhaltigen mRNAs und die Akkumulation von strukturellen viralen Proteinen notwendig ist. Für seine Funktion benötigt Rev ein cis-wirkendes RNA-Element, das Rev responsive element (RRE), das innerhalb der Env-Kodierungsregion lokalisiert ist [Hadzopoulou-Cladaras *et al.*; 1989]. Heutzutage ist der Rev-abhängige Export HIV-1-RNAs relativ klar. Sobald das RRE transkribiert und korrekt gefaltet ist, werden weitere Cofaktoren rekrutiert und oligomerisiert. Aufgrund dessen wird ein Komplex gebildet, welcher indirekt über das Adapterprotein Rev die sekundäre mRNA Struktur rekrutiert [Gales *et al.*; 2020]. Humane endogene Retroviren K (HERV-K) kodieren das Rev-ähnliche Hilfsprotein Rec, welches die cis-aktive sekundäre RNA-Strukturen bindet, um intron-enthaltende RNA in Richtung des Exportweges zu lenken [Yang *et al.*; 1999]. Für weitere simple Retroviren wird ein anderer Mechanismus für den mRNA-Export unabhängig von einem viralen Protein vermutet. Es wird davon ausgegangen, dass konstitutive Transportelemente (CTE) in der Lage sind, zelluläre Exportkomplexe zu binden und so den Zugang zum Kernporenkomplex ermöglichen [Saavedra *et al.*; 1997; Gales *et al.*; 2020].

Zur Testung der Konstrukte in Hek293T und HeLa Zellen erfolgte die Cotransfektion mit Staufen-1 und IFI16 bzw. der entsprechenden Kontrolle. Zudem erfolgte zusätzlich die Cotransfektion mit Expressionsvektoren für Rev und für Rec. Werden die Ergebnisse des Experimentes in Abbildung 5-14 betrachtet, kann lediglich in der Hek293T Zellen eine signifikante Restriktion des ori HERV-K113 durch IFI16 gezeigt werden. Diese Restriktion ist gleich stark ausgeprägt bei Cotransfektion mit Rev und Rec, welche gleichermaßen mit dem HERV RcRE interagieren [Magin *et al.*; 1999]. Die 8-fold starke Hemmung in diesem Experiment reproduziert die im ersten Experiment gezeigte Reduktion der RT-Aktivität um das 13-fache (Abbildung 5-2) und die zuvor im Laufe des Projektes generierten Daten [Zumblick; 2019; Savas; 2020].

Unerwarteterweise überschreitet die RT-Aktivität keins der durch die Praktikantin generierten Konstrukte den Wert der RT-Aktivität der mitgeführten nicht transfizierten (NT) Kontrolle, sodass davon auszugehen ist, dass das Klonieren der verschiedenen Transportelemente hinter die RT nicht in der Wiederherstellung des mRNA Exports resultiert. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls bei Betrachtung der Daten der Cotransfektion der Konstrukte mit IFI16, Staufen-1 und Rev bzw. Rec in den HeLa Zellen. In keinem der untersuchten Konstrukte konnte die erwartete Inhibition durch IFI16 demonstriert werden. Überraschenderweise wird auch die Kontrolle, das ori HERV-K113 Konstrukt, nicht in den HeLa Zellen gehemmt. Dies lässt sich lediglich dadurch erklären, dass sowohl [Zumblick; 2019] als auch [Tyagi *et al.*; 2017] zeigten, dass die Transfektion von HERV-K nur zur einer geringfügigen Steigerung der RT-Aktivität in HeLa führt. Es erwies sich im selbstständig durchgeführten Experiment als nicht möglich, den Unterschied zwischen dem unwesentlichen Anstieg bei Transfektion mit dem ori HERV-K113 und der gehemnten Probe zu zeigen. Dennoch sollte in Zukunft die Hypothese überprüft werden, ob der mRNA Export nicht möglich ist oder nicht doch andere Faktoren zu dem unerwarteten Ergebnis führten. Dies könnte anhand Zellfraktionierung und anschließender immunhistologischer Färbung der nuklearen und cytosolischen Fraktion mit spezifischen HERV-Antikörpern oder verschiedener RT-qPCR erfolgen.

Für die Restriktion von HERV-K113 wird die erfolgreiche Expression von IFI16 in allen analysierten Zelllinien benötigt. Aufgrund der Untersuchungen der Transfektionseffizienz innerhalb der verschiedenen Zellen wurde von dieser zu Beginn der Masterarbeit ausgegangen. Diese Annahme wurde ergänzend durch die Ergebnisse der Expressionsanalyse von IFI16 durch [Zumblick; 2019 und Savas; 2020] gestützt. Zusätzlich erfolgte im ersten Experiment (Abbildung 5-2) die selbstständige Überprüfung der IFI16 Expression mithilfe eines Western Blots in Hek293T Zellen. Eindeutig detektiert wurde eine Bande mit der Größe von 95 kDa, entsprechend der Größe des Phosphorproteins IFI16 (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der multiplen Luciferase-Assays, zusammengefasst in Tabelle 5-1, wurde diese im späteren Verlauf der Masterarbeit Infrage gestellt und in einem separaten Experiment sowohl die Expression von IFI16 als auch der IFI16 PYD

plus Linkerregion mittels Western Blot in den fünf humanen Zelllinien überprüft. Als Ladekontrolle wird GAPDH verwendet. GAPDH ist ein Enzym, welches eine wesentliche Rolle bei der Glycolyse spielt. Das Protein wird daher in allen humanen Zellen exprimiert. Deutlich detektierbar in den Ergebnissen der Western-Blots in Abbildung 5-15 und Abbildung 5-16 ist eine Bande in Höhe von 37 kDa, entsprechend GAPDH, in allen Zelllinien. Die Intensität der Bande ist vergleichbar in beiden Experimenten und allen verwendeten Zelllinien, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine vergleichbare Menge an Zelllysate je Zellart aufgetragen wurde. Wird die Expression von IFI16 innerhalb der fünf Zelllinien verglichen, sind deutliche Diskrepanzen ersichtlich. Ausschließlich in den Hek293T und HeLa Zellen ist eine signifikante Bande in Höhe von 95 kDa, entsprechend dem Volllängen-Protein, nachweisbar. Wird ergänzend die Expression der ersten 191 N-terminalen Aminosäuren, welche die Pyrin- und NLS-enthaltene Linkerdomäne umfasst, betrachtet, wird eine Bande in Höhe von 25 kDa erwartet und diese gleichermaßen stark in den Hek293T und HeLa Zellen exprimiert. Zusätzlich sehr schwach nachweisbar ist eine Bande in den SK-Mel28. Zusammenfassend kann jedoch nur von einer erfolgreichen Expression des IFI16 Volllängen-Proteins und der PYD plus Linkerregion in den Hek293T und HeLa Zellen ausgegangen werden.

Diese Schlussfolgerung führt dazu, dass die Ergebnisse der zuvor gezeigten Luciferase-Assays, zusammengefasst in Tabelle 5-1, in den GH und Tera-1 Zellen nicht für die Forschung berücksichtigt werden können. Die gezeigten signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den IFI16 oder PYD plus Linkerregion transfizierten Proben einiger Konstrukte sind lediglich durch intrazelluläre und interexperimentelle Schwankungen zu erklären und nicht auf die erfolgreiche Inhibition durch IFI16 zurückzuführen, da in diesen Zelllinien IFI16 oder seine PYD plus Linkerregion nicht exprimiert wird. Eine weitere Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten Luftblasen beim Überführen der Zelllysate in die weiße Luciferase-Platte sein, welche die sensitive Messung des Luminometers beeinflussen. Dennoch ist weiterhin zu klären, warum trotz der guten bis sehr guten Transfektionseffizienz bei Transfektion mit dem pMAX-GFP Vektor der GH, Tera-1 und SK-Mel28 Zellen es zu keiner Expression des IFI16-Proteins kommt. Grundsätzlich ist die Expression eines

Proteins von vielen Variablen abhängig und kann durch multiple Mechanismen reguliert werden, daher wird keine eindeutige wissenschaftliche Erklärung auffindbar sein. Jedoch wurde in verschiedensten Literaturquellen bereits beschrieben, dass die Proteinexpression stark von der Zellart und der jeweiligen Differenzierung der Zellen abhängig ist [Gariglio *et al.*; 2002; Hunter *et al.*; 2019]. Bereits die Plasmidaufnahmetoleranz der Zellen variiert stark je nach Größe des Plasmids und Zellart. Eine mögliche Erklärung könnte daher die Größe des IFI16-Plasmids sein, welches wesentlich größer als der pMAX-GFP Vektor ist. Klären würde diese Annahme die erneute Überprüfung der Transfektionseffizienz mit einem wesentlich größeren GFP-haltigem Plasmid, welches dem IFI-Expressionsplasmid entspricht. Dennoch könnten Unterschiede zwischen den Zelllinien nicht zuverlässig ausgeschlossen werden. Das Transkriptions- und Translationspotential jeglicher Zelllinien variiert und die richtige Proteinfaltung und posttranslationale Modifikationen wird für die volle biologische Aktivität benötigt [Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.; 2002]. Die Möglichkeiten aufgrund dessen keine Expression in den GH, Tera-1 und SK-Mel28 ist daher breit gefächert. Durch die Arbeitsgruppe des Robert Koch-Instituts wurde jedoch bestätigt, dass bereits in den vorherigen Jahren bei Verwendung dieser Zellen es zu Problemen bei der Expression und Transfektion kam. Eine weitere Möglichkeit die Transfektionseffizienz des IFI16-Expressionsplamids zu überprüfen, bietet das Konstrukt aus Ulm selbst, welches bereits eine BFP Sequenz enthält, mithilfe der die IFI16-Expression in den verschiedenen Zellen an einem FACS mit entsprechendem Laser überprüft werden könnte.

Um die Expression von IFI16 beziehungsweise der PYD plus Linkerregion in allen Zellen zu gewährleisten, erfolgte im letzten Schritt der Masterarbeit die Klonierung und Testung eines bicistronischen lentiviralen Vektors. Die Fähigkeiten lentiviraler Vektoren, große Transgene zu tragen und diese Gene effizient zu infizieren und in das Genom sowohl von sich teilenden als auch von sich nicht teilenden Zellen zu integrieren, machen sie zu idealen Kandidaten für den Transport von genetischem Material in Zellen und Geweben [Semple-Rowland & Berry; 2014]. Zusätzlich ermöglichen IRES-haltige bicistronische Vektoren die gleichzeitige Expression von zwei Proteinen vom gleichen RNA-Transkript. Üblicherweise erfolgt in eukaryotischen

Zellen die Translationsinitiation der mRNAs fast ausschließlich an der 5'-Cap-Struktur, jedoch ermöglicht die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus die Bindung und Initiierung von Ribosomen an einer zweiten, internen Stelle [Jang *et al.*; 1988; Jackson *et al.*; 1990]. Wird das zu untersuchende Zielgen vor die IRES gesetzt und das Reporteragen dahinter, kann bei erfolgreicher Expression des Reportergens von der vollständigen mRNA-Synthese und der erfolgreichen Expression des Zielgens ausgegangen werden. Als bicistronischer, lentiviraler Klonierungsvektor wurde der pLV-IRES-ZsGreen1 Vektor von *Clontech Laboratories* ausgewählt. pLVX-IRES-ZsGreen1 ist ein HIV-1-basierter, lentiviraler Expressionsvektor, der die gleichzeitige Expression von IFI16 bzw. der PYD plus Linkerbereich und ZsGreen1 in jeder Säugetierzelle ermöglicht. ZsGreen1 ist eine humane codon-optimierte Variante der Riffkoralle *Zoanthus sp.* und ihrem grün fluoreszierenden Protein [Clontech Laboratories; ]. Der Vektor exprimiert beide Proteine aus einem bicistronischen mRNA-Transkript, sodass ZsGreen1 im späteren Verlauf der Masterarbeit als Indikator für die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie verwendet werden kann. Die Klonierung erfolgte selbstständig und es konnte erfolgreich die PYD plus Linkerregion in den Vektor eingebracht werden (Abbildung 5-17). Das Einbringen des Volllängen-Proteins war trotz multipler Klonierungsansätze nicht ergebnisbringend, was daran liegen könnte, dass das Insert (IFI16) mit einer Größe von über 2 kb sehr groß ist und daher schwierig in den linearisierten Vektor einzubringen. Der Vektor zur Transduktion der IFI16 PYD plus Linkerregion bietet dennoch zahlreiche Möglichkeiten zur Restriktionsanalyse von HERV-K113.

Im Folgenden erfolgte die Überprüfung, ob die alleinige PYD plus Linkerregion bereits ausreichend ist, um die virale Partikelproduktion von HERV-K113 zu hemmen. Für HIV-1 wurde dies durch [Hotter *et al.*; 2019; Bosso *et al.*; 2020] bewiesen. Zum einen sollte die hemmende Wirkung der PYD plus Linkerregion durch Cotransfektion des ori HERV-K113 mit Staufen-1, dem IFI16 PYD plus Linkerregion-Expressionsplasmid aus Ulm bzw. der entsprechenden Kontrolle und zum anderen durch Cotransfektion des neu generierten Transduktionsplasmid bzw. dem entsprechendem Leervektor als Kontrolle kontrolliert werden. Mithilfe der Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 5-18,

kann deutlich bewiesen werden, dass zur Restriktion von HERV-K113 die PYD plus Linkerregion ausreichend ist. Bei Cotransfektion mit dem PYD plus Linkerregion Expressionsplasmid aus Ulm kann eine Hemmung der RT-Aktivität um das 17,5-fache im Vergleich zur dazugehörigen Kontrolle vermessen werden. Diese Inhibition von HERV-K113 ist die im Rahmen dieser Masterarbeit stärkste gezeigte Reduktion der RT-Aktivität und lässt darauf schließen, dass wie bereits von [Bosso *et al.*; 2020] für PYHIN1 gezeigt, die PYD plus Linkerregion nicht nur ausreichend, sondern sogar stärker hemmend wirkt als das Vollängen-Protein. Werden die Ergebnisse der Restriktion von ori HERV-K113 durch den neu generierten Transduktionsvektor pLVX-IRES-ZsGreen1-IFI16 P+L im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle betrachtet, kann auch hier eine Reduktion der RT-Aktivität um das 3,5-fache detektiert werden. Diese ist geringer als die durch die Ulmer Expressionsplasmide ausgelöste Restriktion, jedoch dennoch deutlich detektierbar. Diese signifikante Inhibition der viralen Partikelproduktion von HERV-K113 durch den Transduktionsvektor bestätigt die Annahme, dass die PYD plus Linkerregion erfolgreich in den lentiviralen Vektor kloniert wurde. Dennoch sollte dies in Zukunft mithilfe eines Western Blots erneut überprüft werden.

Da das Einbringen der PYD plus Linkerregion in den lentiviralen Vektor, sowohl mithilfe des Restriktionsverdau (Abbildung 5-17) als auch anhand der Hemmung des ori HERV-K113 (Abbildung 5-18) bewiesen werden konnte, erfolgte im letzten Versuch der Masterarbeit die Herstellung von Lentiviren, welche in der Lage sind, die PYD plus Linkerregion zu transduzieren und die anschließende Überprüfung der Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien. Die Bestimmung der Transduktionseffizienz erfolgte durch Aufnahme von Fluoreszenzbildern und FACS Analyse der Zellen. Insgesamt kann eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit der Hek293T, HeLa und SK-Mel28 Zellen sowohl visuell als auch anhand der FACS Daten detektiert werden. Die Verwendung des unverdünnten Virus resultiert dabei in einer Transduktionseffizienz höher als 95%, welche für später folgende Experimente sehr gut und mehr als ausreichend zur erfolgreichen Transduktion der IFI16 PYD plus Linkerregion ist. Lediglich die GH und Tera-1 Zellen sind aufgrund ihrer geringen Transduktionseffizienz (<40%) nicht für weitere Versuche geeignet. Die geringe

Transduktionseffizienz der beiden Teratokarzinom-Zelllinien ist nicht eindeutig zu erklären, jedoch zeigten bereits [Wang *et al.*; 2013], dass die Transduktionseffizienz verschiedener Zellen unterschiedlicher Spezies variiert und diese zusätzlich abhängig vom Grad der Differenzierung ist. Eine Erklärung hierfür könnten verschiedene Rezeptoren auf der Plasmamembran, der Ort der Integration und die Aktivität der Promotoren sein. Des Weiteren können weitere regulatorische Faktoren, die an der Zelltransduktion und der Expression von Zielgenen beteiligt sind, zu unterschiedlichen Transduktionseffizienzen führen.

## **7. Ausblick**

Im Rahmen dieser Masterarbeit konnte eine Vielzahl an Konstrukten generiert und getestet werden. Leider konnte ein Großteil der Ergebnisse aufgrund der nicht vorhandenen Expression des Proteins IFI16 in drei der fünf verwendeten Zelllinien nicht gewertet werden. Die abschließende erfolgreiche Klonierung des Transduktionsvektors eröffnet jedoch neue Möglichkeiten. In Zukunft sollte daher eine große Menge an Lentiviren produziert, anschließend verschiedene Zelllinien mit diesem Virus transduziert und hinsichtlich ihrer PYD plus Linkerregion-Expression untersucht werden. Anschließend wäre besonders interessant zu untersuchen, ob die Transduktion der IFI16 PYD plus Linkerregion ebenso zur Restriktion von HERV-K113 führt. Sollte dies der Fall sein, könnten erneut die verschiedenen Konstrukte in multiplen Zelllinien analysiert werden. Dabei sollte speziell der Fokus auf den Konstrukten liegen, welche schrittweise den Bereich der LTR eingrenzen, sodass systematisch der funktionelle Bereich der 5'- oder 3'LTR bestimmt werden kann. Alternativ könnte eine Zelllinie generiert werden, welche bereits IFI16 stabil exprimiert. Die Zellen müssten folglich daraufhin lediglich mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert werden, um einen Effekt zu identifizieren. Als Kontrolle könnte hierbei die ursprüngliche Zelllinie dienen.

## 8. Anhang

## 8.1. Klonierung eines Luciferase-Konstruktes mit vollständiger LTR

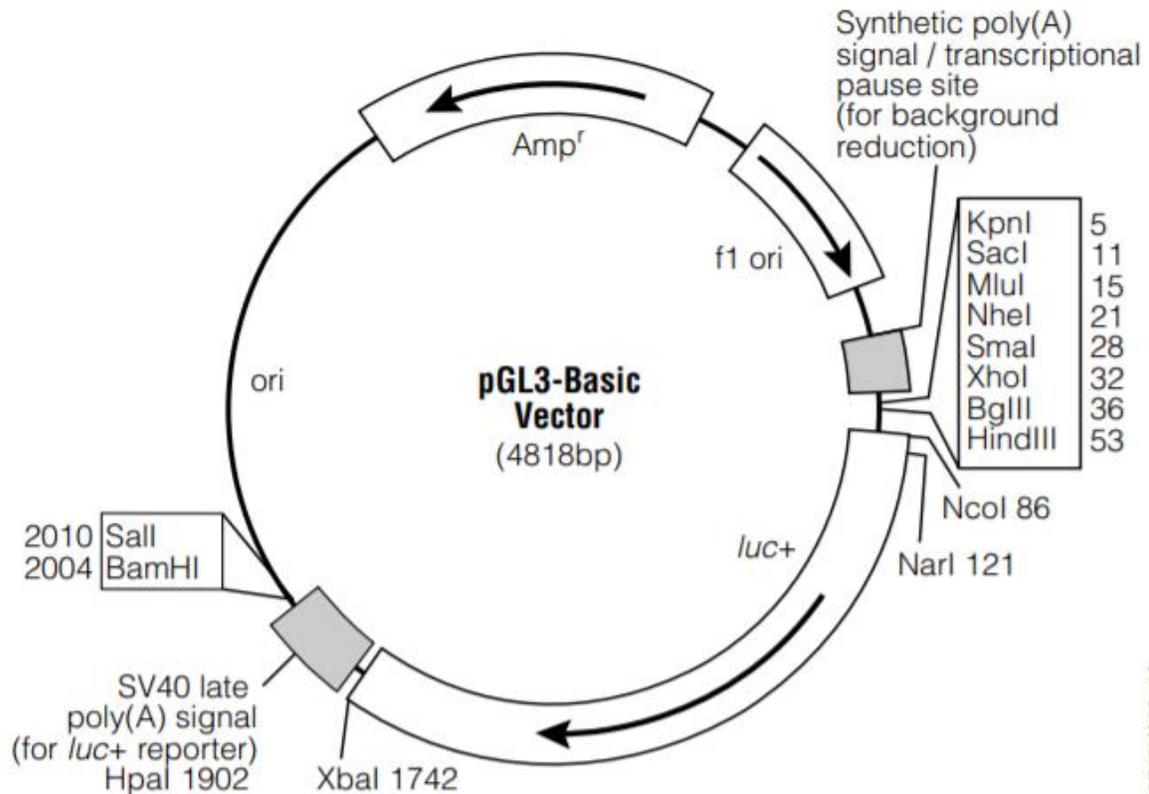
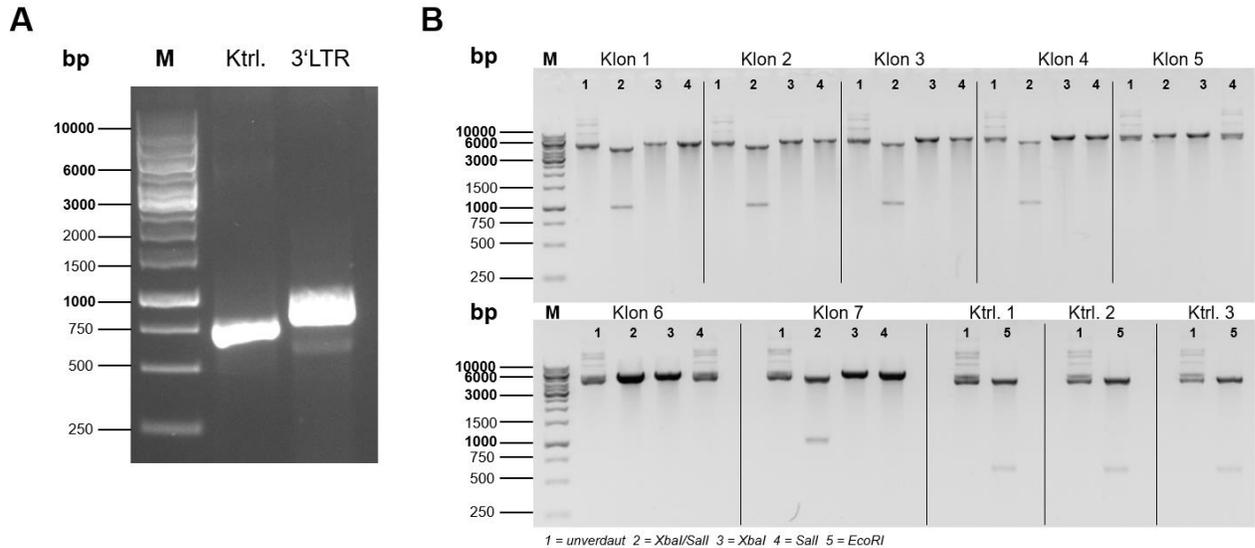


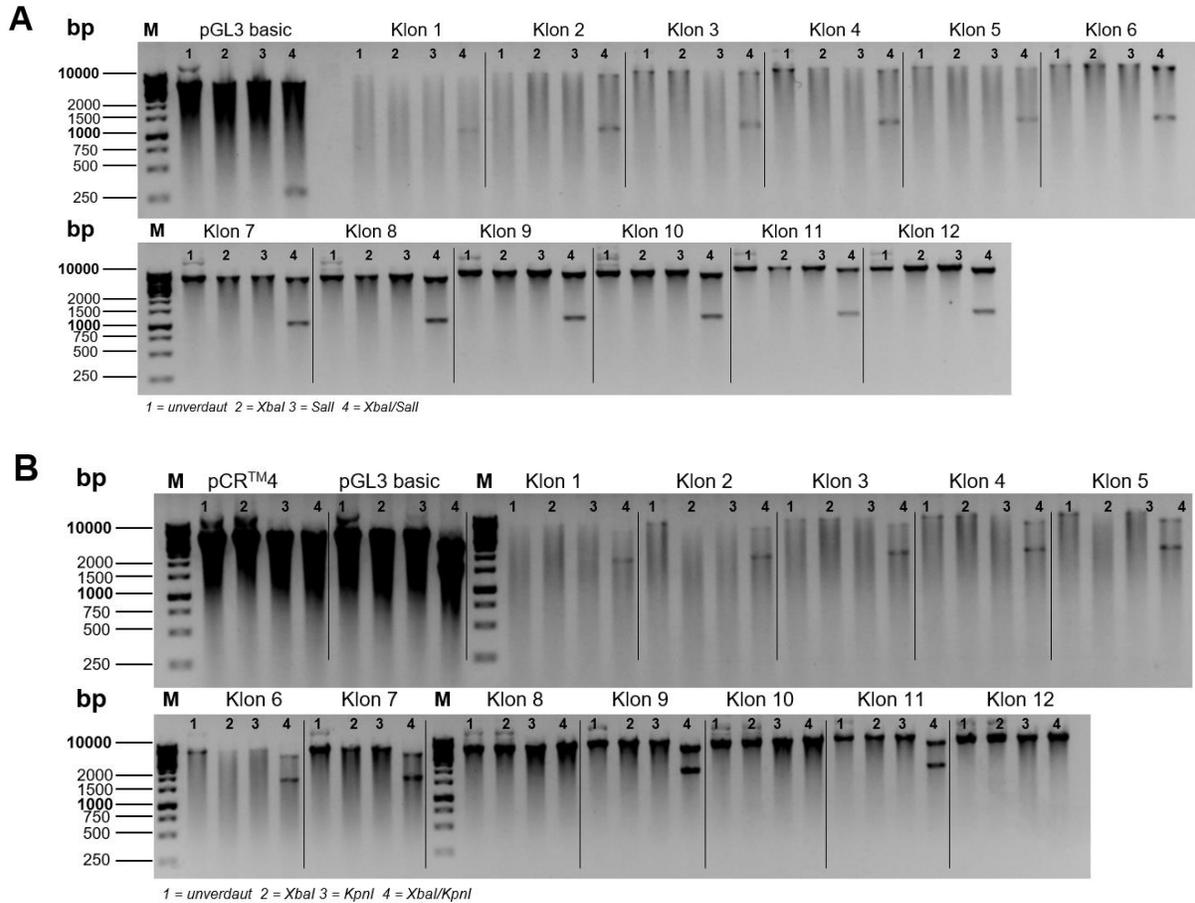
Abbildung 8-1: Vektorkarte des pGL3 basic

Dargestellt ist die Vektorkarte des pGL3 basic von [Promega; 2015]. Eingebracht werden mit KpnI und HindIII N-terminal die HERV 5'LTR und mit XbaI und Sall C-terminal die HERV 3'LTR.



**Abbildung 8-2: Amplifikations-PCR und Restriktionsverdau mit XbaI/SalI**

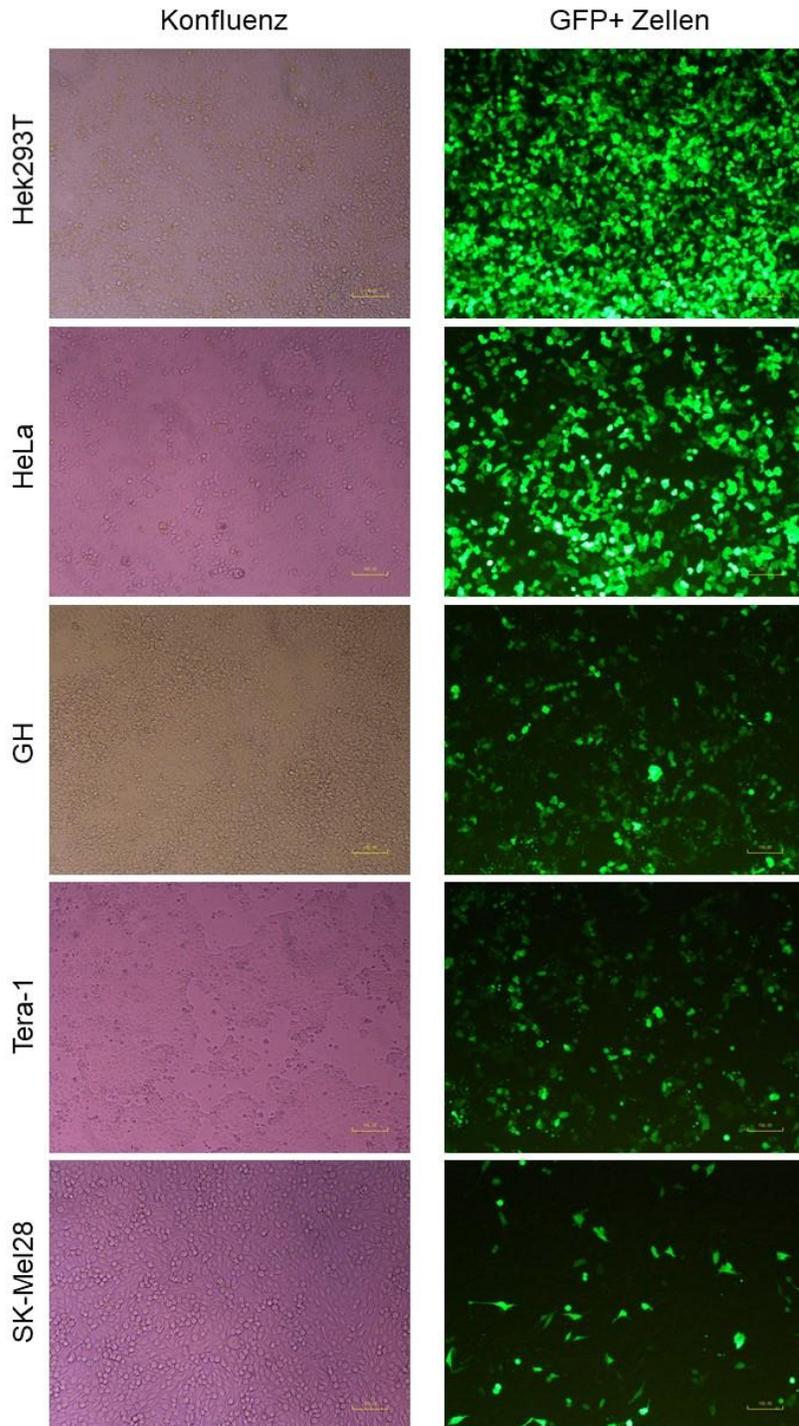
Dargestellt in **(A)** ist ein 1% Agarosegel, in diesem wurde der Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) und die Ergebnisse der Amplifikations-PCR mit der *DreamTaq™ Hot Start Green DNA Polymerase* aufgetragen. In der Amplifikations-PCR erfolgte die Vervielfältigung der im *TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing* enthaltene Kontrolle, sowie die Amplifikation der 3'LTR des oriST HERV-K113 mit dem ForJF1- und RevJF1-Primern. **(B)** zeigt die unverdaute, mit XbaI/SalI, mit XbaI und mit SalI verdaute Plasmid-DNA, welche aus den jeweiligen gepickten Klonen isoliert wurde. Die Klone 1-7 enthalten den pCR™4-Vektor, in den die 3'LTR kloniert wurde. Bei positiven Klonen zeigt sich eine Bande mit einer Größe von 968bp bei Verdau der Plasmid-DNA mit XbaI/SalI. Ktrl. 1-3 beschreibt den pCR™4-Vektor, in den das Kontrollfragment des verwendeten Kits kloniert wurde. Positive Klone zeigen eine Bande bei circa 750 bp, wenn die isolierte Plasmid-DNA mit EcoRI verdaute wurde.



**Abbildung 8-3: Restriktionsverdau mit (A) XbaI/Sall und (B) KpnI/XbaI**

Dargestellt in **(A)** ist ein 1% Agarosegel, in welchem die unverdaute, mit XbaI/Sall, mit XbaI und mit Sall verdaute Plasmid-DNA, welche aus den jeweiligen gepickten Klonen isoliert wurde, aufgetragen wurde. Bei positiven Klonen zeigt sich eine Bande mit einer Größe von 968bp, entsprechend der 3'LTR, bei Verdau der Plasmid-DNA mit XbaI/Sall. **(B)** zeigt die unverdaute, mit XbaI/KpnI, mit XbaI und mit KpnI verdaute Plasmid-DNA, welche aus den jeweiligen gepickten Klonen isoliert wurde. Bei positiven Klonen zeigt sich eine Bande mit einer Größe von circa 1,7 kb bei Verdau der Plasmid-DNA mit XbaI/KpnI, entsprechend des Luciferase Gens.

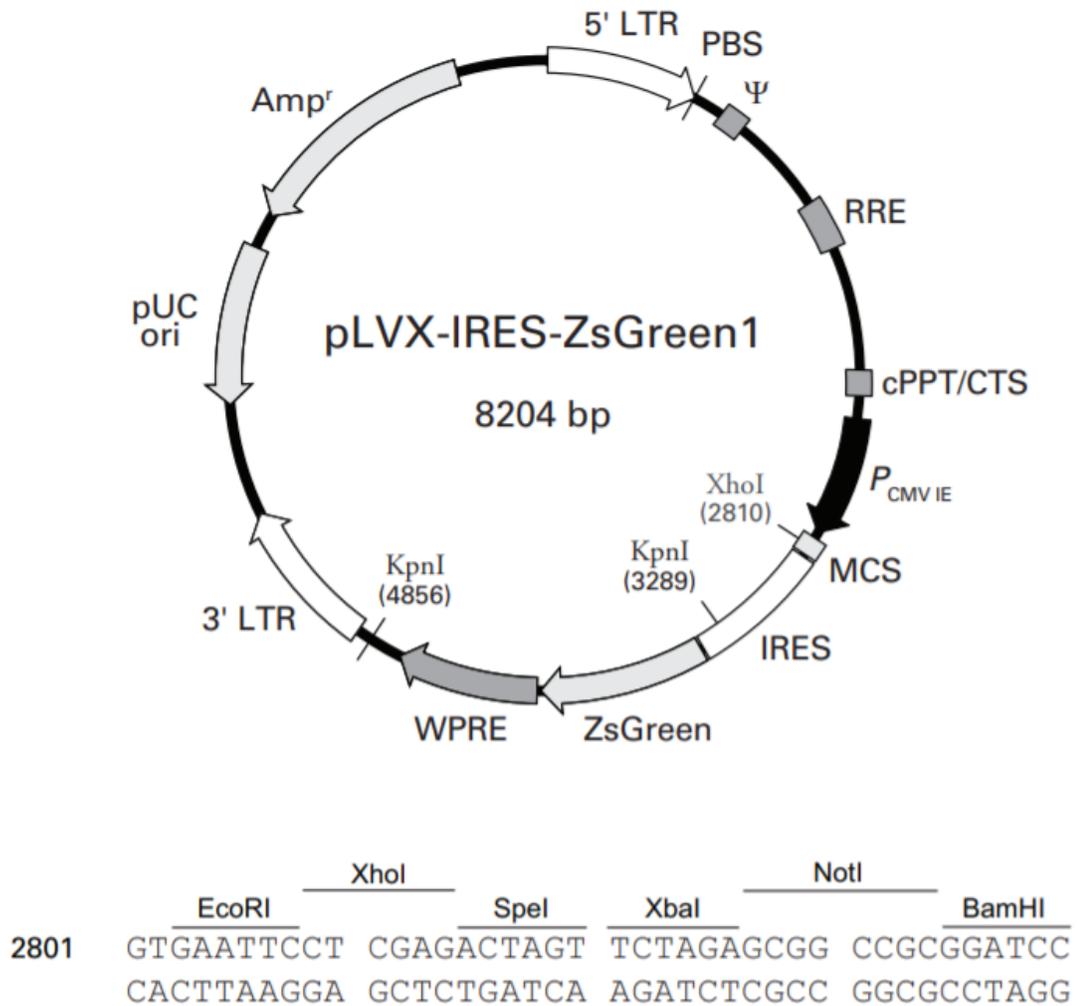
## 8.2. Transfektionseffizienz



**Abbildung 8-4: Transfektionseffizienz der verschiedenen humanen Zelllinien**

Aufnahmen der Konfluenz und Fluoreszenzintensität der verschiedenen humanen Zelllinien. Die Zellen wurden zunächst in einer 24-Well Platte ausgesät, am darauffolgenden Tag mit pMAX-GFP transfiziert und nach 48 h erfolgte die digitale Aufnahme der Ergebnisse mithilfe des Fluoreszenzmikroskop.

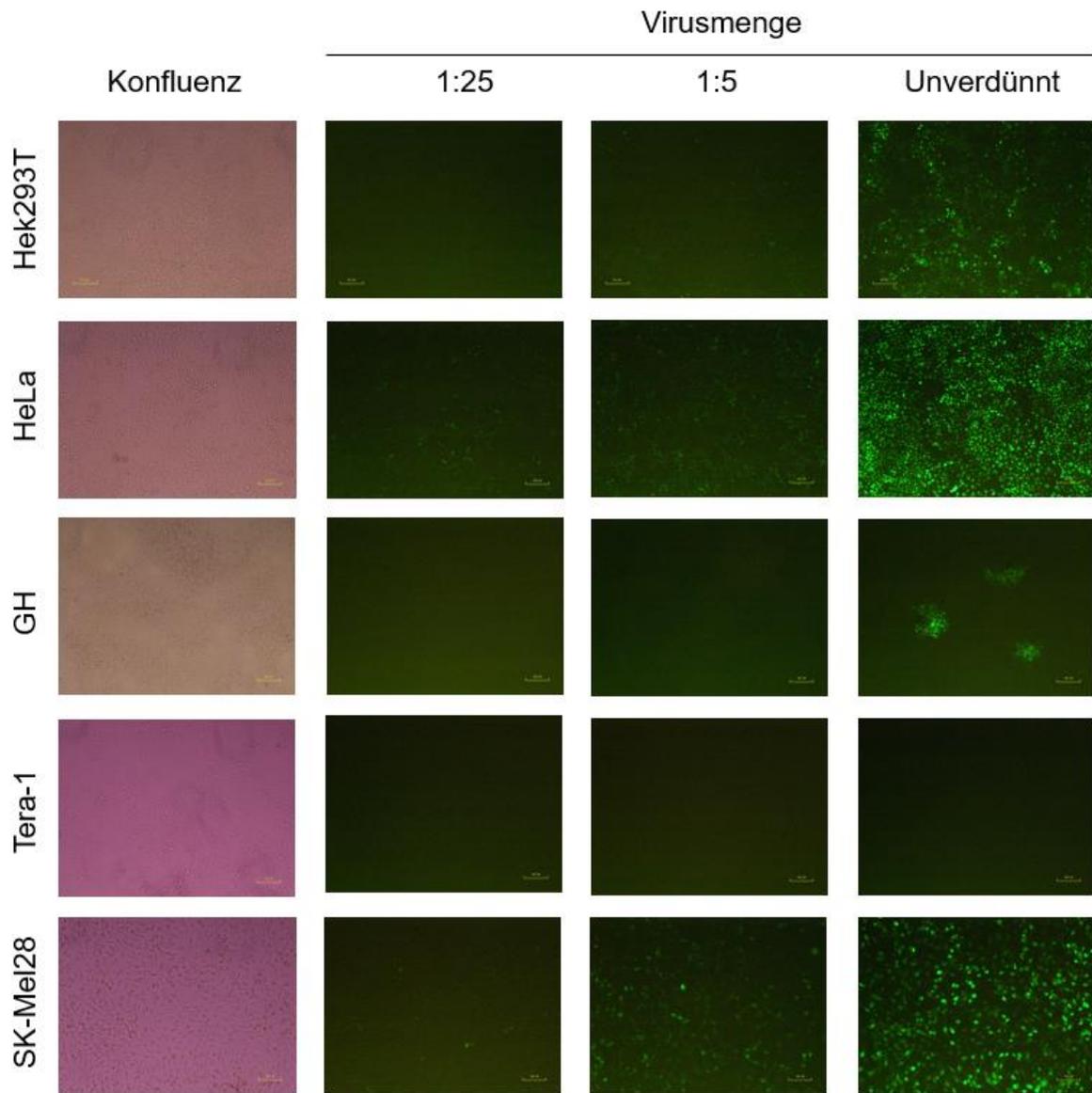
### 8.3. Transduktion von IFI16



**Abbildung 8-5: Vektorkarte des pLVX-IRES-ZsGreen1**

Dargestellt ist die Vektorkarte und MCS des pLVX-IRES-ZsGreen1 von [Clontech Laboratories; ]. Eingebracht wird die PYD plus Linkerbereich über die Restriktionsschnittstellen XbaI und BamHI in der MCS.

## 8.4. Transduktionseffizienz



**Abbildung 8-6: Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien**

Aufnahmen der Konfluenz und Fluoreszenzintensität der verschiedenen humanen Zelllinien. Die Zellen wurden zunächst in einer 48-Well Platte ausgesät, am darauffolgenden Tag mit den verschiedenen Virusverdünnungen transduziert und nach 48 h erfolgte die digitale Aufnahme der Ergebnisse mithilfe des Fluoreszenzmikroskop.

## 9. References

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. **(2002)**. *Molecular Biology of the Cell: An Overview of Gene Control*. Garland Science, New York.
- Armbruster V, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K & Mueller-Lantzsch N **(2002)**: A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*; 8; 1800–1807.
- Bannert N & Kurth R **(2004)**: Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 101 Suppl 2; 14572–14579.
- Bannert N & Kurth R **(2006)**: The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annual review of genomics and human genetics*; 7; 149–173.
- Behrens RT, Aligeti M, Pocock GM, Higgins CA & Sherer NM **(2017)**: Nuclear Export Signal Masking Regulates HIV-1 Rev Trafficking and Viral RNA Nuclear Export. *Journal of virology*; 91.
- Beimforde N, Hanke K, Ammar I, Kurth R & Bannert N **(2008)**: Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology*; 371; 216–225.
- Boris-Lawrie K & Temin HM **(1994)**: The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 716; 59-70; discussion 71.
- Bosso M, Prelli Bozzo C, Hotter D, Volcic M, Stürzel CM, Rammelt A, Ni Y, Urban S, Becker M, Schelhaas M, Wittmann S, Christensen MH, Schmidt FI, Gramberg T, Sparrer KMJ, Sauter D & Kirchhoff F **(2020)**: Nuclear PYHIN proteins target the host transcription factor Sp1 thereby restricting HIV-1 in human macrophages and CD4+ T cells. *PLoS pathogens*; 16; e1008752.
- Buzdin A, Kovalskaya-Alexandrova E, Gogvadze E & Sverdlov E **(2006)**: At Least 50% of Human-Specific HERV-K (HML-2) Long Terminal Repeats Serve In Vivo as Active Promoters for Host Nonrepetitive DNA Transcription†. *Journal of virology*; 80; 10752–10762.

- Caposio P, Gugliesi F, Zannetti C, Sponza S, Mondini M, Medico E, Hiscott J, Young HA, Gribaudo G, Gariglio M & 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*; 282; 33515–33529.
- Choubey D, Deka R & Ho S-m **(2008)**: Interferon-inducible IFI16 protein in human cancers and autoimmune diseases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*; 13; 598–608.
- Chudak C, Beimforde N, George M, Zimmermann A, Lausch V, Hanke K & Bannert N **(2013)**: Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2). *Retrovirology*; 10; 140.
- Ci Y, Yang Y, Xu C & Shi L **(2018)**: Vesicular stomatitis virus G protein transmembrane region is crucial for the hemi-fusion to full fusion transition. *Scientific reports*; 8; 10669.
- Clontech Laboratories. pLVX-IRES-ZsGreen1 Vector Information. URL <https://www.takarabio.com/documents/Vector%20Documents/pLVX-IRES-ZsGreen1%20Vector%20Information.pdf> [accessed on 4 February 2021].
- Coffin J M, Hughes S H & Varmus H E, editors **(1997)**. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor (NY). ISBN: 0879695714.
- Conrady CD, Zheng M, Fitzgerald KA, Liu C & Carr DJJ **(2012)**: Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. *Mucosal immunology*; 5; 173–183.
- Cribbs AP, Kennedy A, Gregory B & Brennan FM **(2013)**: Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. *BMC biotechnology*; 13; 98.
- Dell'Oste V, Gatti D, Giorgio AG, Gariglio M, Landolfo S & Andrea M de **(2015)**: The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *The new microbiologica*; 38; 5–20.
- Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G & Heidmann T **(2006)**: Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome research*; 16; 1548–1556.

- Ellermann V & Bang O (1909): Experimentelle Leukämie bei Hühnern. II. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*; 63; 231–272.
- Fuchs NV, Kraft M, Tondera C, Hanschmann K-M, Löwer J & Löwer R (2011): Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promoter Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3 ▽. *Journal of virology*; 85; 3436–3448.
- Fujiuchi N, Aglipay JA, Ohtsuka T, Maehara N, Sahin F, Su GH, Lee SW & Ouchi T (2004): Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry*; 279; 20339–20344.
- Gales JP, Kubina J, Geldreich A & Dimitrova M (2020): Strength in Diversity: Nuclear Export of Viral RNAs. *Viruses*; 12.
- Garcia-Montojo M, Doucet-O'Hare T, Henderson L & Nath A (2018): Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. *Critical reviews in microbiology*; 44; 715–738.
- Gariano GR, Dell'Oste V, Bronzini M, Gatti D, Luganini A, Andrea M de, Gribaudo G, Gariglio M & Landolfo S (2012): The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human cytomegalovirus replication. *PLoS pathogens*; 8; e1002498.
- Gariglio M, Azzimonti B, Pagano M, Palestro G, Andrea M de, Valente G, Voglino G, Navino L & Landolfo S (2002): Immunohistochemical expression analysis of the human interferon-inducible gene IFI16, a member of the HIN200 family, not restricted to hematopoietic cells. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*; 22; 815–821.
- Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y, Sasakawa N, Iguchi T, Makita Y, Hozumi H, Miura Y, Yang LF, Iwasaki M, Wang XH, Waller MA, Shirai N, Abe YO, Fujita Y, Watanabe K, Kagita A, Iwabuchi KA, Yasuda M, Xu H, Noda T, Komano J, Sakurai H, Inukai N & Hotta A (2020): Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nature communications*; 11; 1334.

- George M, Schwecke T, Beimforde N, Hohn O, Chudak C, Zimmermann A, Kurth R, Naumann D & Bannert N **(2011)**: Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element. *Retrovirology*; 8; 30.
- Gray LR, Jackson RE, Jackson PEH, Bekiranov S, Rekosh D & Hammar skjöld M-L **(2019)**: HIV-1 Rev interacts with HERV-K RcREs present in the human genome and promotes export of unspliced HERV-K proviral RNA. *Retrovirology*; 16; 40.
- Hadzopoulou-Cladaras M, Felber BK, Cladaras C, Athanassopoulos A, Tse A & Pavlakis GN **(1989)**: The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *Journal of virology*; 63; 1265–1274.
- 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; 11019–11030.
- Hohn O, Hanke K & Bannert N **(2013)**: HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease. *Frontiers in oncology*; 3; 246.
- Horan KA, Hansen K, Jakobsen MR, Holm CK, Søb y S, Unterholzner L, Thompson M, West JA, Iversen MB, Rasmussen SB, Ellermann-Eriksen S, Kurt-Jones E, Landolfo S, Damania B, Melchjorsen J, Bowie AG, Fitzgerald KA & Paludan SR **(2013)**: Proteasomal degradation of herpes simplex virus capsids in macrophages releases DNA to the cytosol for recognition by DNA sensors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*; 190; 2311–2319.
- Hotter D, Bosso M, Jønsson KL, Krapp C, Stürzel CM, Das A, Littwitz-Salomon E, Berkhout B, Russ A, Wittmann S, Gramberg T, Zheng Y, Martins LJ, Planelles V, Jakobsen MR, Hahn BH, Dittmer U, Sauter D & Kirchhoff F **(2019)**: IFI16 Targets the Transcription Factor Sp1 to Suppress HIV-1 Transcription and Latency Reactivation. *Cell host & microbe*; 25; 858-872.e13.
- Hunter M, Yuan P, Vavilala D & Fox M **(2019)**: Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Current protocols in protein science*; 95; e77.

- Jackson RJ, Howell MT & Kaminski A **(1990)**: The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends in Biochemical Sciences*; 15; 477–483.
- Jakobsen MR, Bak RO, Andersen A, Berg RK, Jensen SB, Tengchuan J, Jin T, Laustsen A, Hansen K, Ostergaard L, Fitzgerald KA, Xiao TS, Mikkelsen JG, Mogensen TH & Paludan SR **(2013)**: IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 110; E4571-80.
- Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC & Wimmer E **(1988)**: A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology*; 62; 2636–2643.
- Johnstone RW & Trapani JA **(1999)**: Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. *Molecular and cellular biology*; 19; 5833–5838.
- Knösxl M, Löwer R & Löwer J **(1999)**: Expression of the Human Endogenous Retrovirus HTDV/HERV-K Is Enhanced by Cellular Transcription Factor YY1. *Journal of virology*; 73; 1254–1261.
- Lausch V **(2013)**. Etablierung eines Verfahrens zur Kombination der Elektronenmikroskopie (EM) mit der Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) sowie Untersuchungen zum Infektionsprozess und der Ultrastruktur dem Humanen Endogenen Retrovirus K (HERV-K). Dissertation, Freie Universität, Berlin.
- Lee YN & Bieniasz PD **(2007)**: Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS pathogens*; 3; e10.
- Lo Cigno I, Andrea M de, Borgogna C, Albertini S, Landini MM, Peretti A, Johnson KE, 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*; 89; 7506–7520.
- Löwer R **(1999)**: The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends in Microbiology*; 7; 350–356.

- Macfarlane C & Simmonds P **(2004)**: Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations. *Journal of molecular evolution*; 59; 642–656.
- Magin C, Löwer R & Löwer J **(1999)**: cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *Journal of virology*; 73; 9496–9507.
- Modrow S, Falke D & Truyen U **(2003)**. Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg. ISBN: 9783827410863.
- Mondini M, Vidali M, Airò P, Andrea M de, Riboldi P, Meroni PL, Gariglio M & Landolfo S **(2007)**: Role of the interferon-inducible gene IFI16 in the etiopathogenesis of systemic autoimmune disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1110; 47–56.
- Pasquinelli AE, Ernst RK, Lund E, Grimm C, Zapp ML, Rekosh D, Hammarskjöld ML & Dahlberg JE **(1997)**: The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway. *The EMBO Journal*; 16; 7500–7510.
- Promega **(2015)**. pGL3 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual. URL <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgl3-luciferase-reporter-vectors-protocol.pdf?la=en>.
- Saavedra C, Felber B & Izaurralde E **(1997)**: The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV-1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export. *Current Biology*; 7; 619–628.
- Savas A **(2020)**. Inhibition von Betaretroviren durch das interferoninduzierte Protein IFI16 (Masterarbeit). Masterarbeit, Berlin, Freie Universität.
- Semple-Rowland SL & Berry J **(2014)**: Use of lentiviral vectors to deliver and express bicistronic transgenes in developing chicken embryos. *Methods (San Diego, Calif.)*; 66; 466–473.
- Singh M, Cai H, Bunse M, Feschotte C & Izsvák Z **(2020)**: Human Endogenous Retrovirus K Rec forms a Regulatory Loop with MITF that Opposes the Progression of Melanoma to an Invasive Stage. *Viruses*; 12.

- Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C & Coffin JM **(2011)**: Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology*; 8; 90.
- Telesnitsky A **(2010)**: Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis. *Future virology*; 5; 539–543.
- Tönjes RR, Löwer R, Boller K, Denner J, Hasenmaier B, Kirsch H, König H, Korbmacher C, Limbach C, Lugert R, Phelps RC, Scherer J, Thelen K, Löwer J & Kurth R **(1996)**: HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*; 13 Suppl 1; S261-7.
- Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK & Lenz J **(2001)**: Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Current Biology*; 11; 1531–1535.
- Tyagi R, Li W, Parades D, Bianchet MA & Nath A **(2017)**: Inhibition of human endogenous retrovirus-K by antiretroviral drugs. *Retrovirology*; 14; 21.
- Veeranki S & Choubey D **(2012)**: Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: regulation of subcellular localization. *Molecular immunology*; 49; 567–571.
- Vermeire J, Naessens E, Vanderstraeten H, Landi A, Iannucci V, van Nuffel A, Taghon T, Pizzato M & 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*; 7; e50859.
- Wang B, Rekosh D & Hammarskjöld M-L **(2015)**: Evolutionary conservation of a molecular machinery for export and expression of mRNAs with retained introns. *RNA (New York, N. Y.)*; 21; 426–437.
- Wang N, Rajasekaran N, Hou T, Lisowski L & Mellins ED **(2013)**: Comparison of transduction efficiency among various lentiviruses containing GFP reporter in bone marrow hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental hematology*; 41; 934–943.

Weiss RA **(2006)**: The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*; 3; 67.

Xin H, Pereira-Smith OM & Choubey D **(2004)**: Role of IFI 16 in cellular senescence of human fibroblasts. *Oncogene*; 23; 6209–6217.

Yang J, Bogerd HP, Peng S, Wiegand H, Truant R & Cullen BR **(1999)**: An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 96; 13404–13408.

Zapp ML & Green MR **(1989)**: Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature*; 342; 714–716.

Zumblick A **(2019)**. Restriktion von HERV-K(HML-2) durch IFI-16. Masterarbeit, Universität Potsdam, Potsdam.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Norbert Bannert für die Bereitstellung des spannenden Themas und die umfassende Unterstützung, Betreuung und Förderung während des gesamten Projektes. Ganz besonders bedanke ich mich für die vielen hilfreichen Gespräche, die vielfältige Anregung, motivierenden Worte und das konstruktive Korrekturlesen während der gesamten Zeit!

Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. Oliver Hohn, Dr. Oya Cingöz, und Martina Keller für die tägliche Laborunterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen lieben Ratschläge und Anregungen bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei der betreuten Praktikantin Annika Dohme für die Bereitstellung der verschiedenen verwendeten Konstrukte und die Unterstützung bei den täglichen Laborarbeiten. Außerdem gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe FG18. Es hat mir immer sehr viel Spaß gemacht, mit euch zusammen zu arbeiten und es war mir eine Freude, in einem so angenehmen und freundlichen Arbeitsklima meine Masterarbeit anzufertigen, speziell während dieser Pandemie.

Schließlich danke ich Prof. Dr. Stephan Ludwig für die Betreuung meiner Masterarbeit von Seiten der WWU Münster und die vielen Kenntnisse, die ich während des Studiums und der Arbeit in seinem Institut erlangen durfte.

An dieser Stelle danke ich all jenen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Masterarbeit und zum Abschluss des Masterstudiums beigetragen haben. Insbesondere danke ich meinem Freund Dennis für seine durchgängige Unterstützung, die motivierenden Worte und das stetige Korrekturlesen all meiner schriftlichen Arbeiten.

## Plagiatserklärung der Studierenden

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Analyse der Restriktion des Humanen Endogenen Retrovirus-K(HML-2) durch das Protein IFI-16*“ selbstständig verfasst worden ist, dass keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt worden sind und dass die Stellen der Arbeit, die anderen Werken – auch elektronischen Medien – dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen wurden, auf jeden Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.

---

Montag, 15. März 2021, Josephine Friedrich

Ich erkläre mich mit einem Abgleich der Arbeit mit anderen Texten zwecks Auffindung von Übereinstimmungen sowie mit einer zu diesem Zweck vorzunehmenden Speicherung der Arbeit in eine Datenbank einverstanden.

---

Montag, 15. März 2021, Josephine Friedrich