

**INTRAZELLULÄRER TRANSPORT,
ASSEMBLY UND EGRESS DES ENDOGENEN
BETARETROVIRUS HERV-K113**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:

Anja Zimmermann

Berlin, Oktober 2014

Angefertigt am Robert Koch-Institut, Berlin, unter der Betreuung von PD Dr.
Norbert Bannert.

Zeitraum: Mai 2008 bis Oktober 2011

1. Gutachter: PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin, Berlin

Tag der Disputation: 15.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.1.1 Endogene Retroviren	3
1.1.2 Humane endogene Retroviren (HERV)	6
1.2 Aufbau und Replikation von Retroviren	7
1.2.1 Morphologie retroviraler Partikel	7
1.2.2 Virales Genom und Provirus	8
1.2.3 Replikationszyklus	11
1.2.3.1 Intrazellulärer Transport retroviraler Proteine	13
1.2.3.2 Assemblierung	16
1.2.3.3 Budding und Reifung	19
1.3 Die HERV-K(HML-2) Familie	21
1.3.1 HERV-K113	23
1.3.2 Rekonstruktion der ursprünglichen HERV-K113 Sequenz	25
1.4 Zielsetzung	28
2 Materialien und Methoden	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Laborgeräte	29
2.1.2 Software	31
2.1.3 Labormaterialien	32
2.1.4 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards	33
2.1.5 Antikörper und Vitalfarbstoffe	36
2.1.6 Puffer und Nährmedien	38
2.1.7 Kits	39
2.1.8 Zelllinien	39
2.1.9 Leervektoren	39
2.1.10 Konstrukte	40
2.1.11 Bakterienstämme	40
2.1.12 Primer (Oligonukleotide)	40
2.2 Methoden	41
2.2.1 DNA-Analytik	41
2.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion	41

2.2.1.2 Mutagenese-PCR.....	42
2.2.1.3 Ligation.....	43
2.2.1.4 Restriktion mittels Endonukleasen.....	44
2.2.1.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.2.1.6 Gelextraktion.....	45
2.2.1.7 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> „One Shot Top10“	45
2.2.1.8 Transformation.....	46
2.2.1.9 Plasmidklonierung und -isolierung.....	46
2.2.1.10 Glycerolstock.....	47
2.2.1.11 DNA-Quantifizierung.....	47
2.2.1.12 Sequenzierungs-PCR.....	47
2.2.2 Protein-Analytik.....	48
2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien.....	48
2.2.2.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien.....	49
2.2.2.1.2 Transfektion von Zelllinien.....	49
2.2.2.1.2.1 Transfektion mittels PolyFect.....	50
2.2.2.1.2.2 Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode.....	50
2.2.2.2 Ultrazentrifugation.....	51
2.2.2.2.1 Ultrazentrifugation für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	51
2.2.2.2.2 Ultrazentrifugation für Transmissionselektronen- mikroskopie.....	52
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	52
2.2.2.4 Western Blot (Immunoblot).....	54
2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung.....	55
2.2.2.5.1 Mowiol.....	57
2.2.2.6 Vitalfärbung für Lebenszellmikroskopie.....	57
2.2.2.6.1 Membranfärbung <i>in vivo</i>	57
2.2.2.6.2 Lysosomenfärbung <i>in vivo</i>	58
2.2.2.6.3 ER-Färbung <i>in vivo</i>	58
2.2.2.6.4 FlAsH-EDT ₂ Färbung <i>in vivo</i>	58
2.2.3 Lichtmikroskopie.....	59
2.2.3.1 Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie.....	59
2.2.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie.....	60

2.2.3.3 Lebendzellmikroskopie	61
2.2.4 Elektronenmikroskopie	62
2.2.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	62
2.2.4.1.1 Agaroseeinbettung von Zellen.....	62
2.2.4.1.2 Eponereinbettung mittels Einbettungsautomat Leica EM TP....	63
2.2.4.1.3 Lowicryleinbettung.....	65
2.2.4.1.4 Gridbeschichtung.....	66
2.2.4.1.5 Trimmen und Ultramikrotomie.....	66
2.2.4.1.6 Immunogoldmarkierung.....	67
2.2.4.1.7 Kontrastierung und Kohlebedampfung.....	68
2.2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	68
2.2.4.2.1 Kritische Punkt-Trocknung.....	69
2.2.4.2.2 Metallbeschichtung (Sputtern).....	70
2.2.5 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM)	70
2.2.5.1 Korrelative Licht- und Transmissionselektronen mikroskopie	70
2.2.5.1.1 Probensubstrat: μ Slide.....	70
2.2.5.1.2 Ausplattieren und Transfizieren der Zellen.....	72
2.2.5.1.3 Lebendzellmikroskopie und Fixierung.....	72
2.2.5.1.4 Handeinbettung in Epon.....	72
2.2.5.1.5 Trimmen, Ultramikrotomie und Kontrastierung der CLEM-Proben.....	73
2.2.5.2 Korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie	74
2.2.5.2.1 Probensubstrat: μ Dish.....	74
2.2.5.2.2 Ausplattieren und Transfektion der Zellen.....	75
2.2.5.2.3 Lebendzellmikroskopie und Fixierung.....	75
2.2.5.2.4 Präparation und Rasterelektronenmikroskopie.....	75
3 Ergebnisse	77
3.1 Generierung Fluoreszenzprotein-markierter viraler HERV-K(HML-2) Partikel	77
3.1.1 Klonierung von oricoGagCherry und oricoGagEGFP	77
3.1.2 Untersuchung zur Expression, intrazellulären Verteilung und Assemblierung von Fluoreszenzprotein-markiertem Gag	79

3.1.2.1	Expressionskinetik und intrazelluläre Verteilung von Fluoreszenzprotein-markiertem Gag.....	79
3.1.2.2	Fluoreszenzprotein-markiertes Gag formiert sich zu tubulären Buddingstrukturen.....	82
3.1.2.3	Unmarkiertes als auch markiertes Gag assembliert an der Plasmamembran.....	84
3.1.3	Generierung funktioneller, Fluoreszenzprotein-markierter, viraler Partikel.....	86
3.1.3.1	Mischungsverhältnisse von markiertem und unmarkiertem Gag führen zur Assemblierung von VLPs...	87
3.1.3.2	Fluoreszierende Zellen weisen VLPs homogen verteilt auf der Zelloberfläche auf.....	88
3.1.3.3	Markiertes Gag wird in die VLPs eingebaut und prozessiert.....	93
3.1.3.4	Fluoreszenzprotein-markierte VLPs werden freigesetzt.....	95
3.1.3.5	In VLPs integriertes, markiertes Gag wird durch die virale Protease prozessiert.....	98
3.2	Funktionelle Untersuchungen zu den viralen Proteinen QP1 und QP2...	100
3.2.1	Klonierung der QP1- und QP2-Deletionsmutanten.....	101
3.2.2	Gag Δ QP wird exprimiert und akkumuliert an der Zellmembran..	102
3.2.3	Die QP-Peptide haben keinen Einfluss auf die Gag-Assemblierung.....	103
3.2.4	VLPs der QP-Deletionsmutanten werden freigesetzt und reifen extrazellulär.....	105
3.3	Untersuchung des intrazellulären Transports von Gag.....	109
3.3.1	Gag-Akkumulationen bewegen sich in hoher Geschwindigkeit.....	109
3.3.2	Gag und Mikrotubuli befinden sich nur selten in räumlicher Nähe zueinander.....	111
3.3.3	Gag ist an oder in vesikulären Zellkompartimente lokalisiert.....	112
3.3.3.1	Gag-Akkumulationen sind teils an Lysosomen lokalisiert..	114
3.3.3.2	Gag häuft sich im Lumen später Endosomen an.....	116
3.3.3.3	Gag nur sehr selten in räumlicher Nähe zu Recycling-Endosomen.....	117
3.4	Untersuchungen zur Assemblierung von Env und Gag.....	119
3.4.1	Klonierung von oricoEnvTC für die Lebendzellmikroskopie.....	119
3.4.1.1	EnvTC ist intrazellulär und an der Plasmamembran lokalisiert.....	120

3.4.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von EnvTC.....	122
3.4.2 Untersuchen zum Einbau von Env in virale Partikel.....	123
3.4.2.1 Gag assembliert mit Env an der Plasmamembran.....	123
3.4.2.2 EnvTC wird in VLPs eingebaut.....	125
4 Diskussion.....	129
4.1 Generierung Fluoreszenzprotein-markierter HERV-K(HML-2) Partikel.....	129
4.1.1 Fluoreszenzprotein-markiertes HERV-K(HML-2) Gag.....	129
4.1.2 Expression und Lokalisation von Fluoreszenzprotein-markierten HERV-K(HML-2) Gag.....	131
4.1.3 HERV-K(HML-2) Gag assembliert an der Plasmamembran zu VLPs.....	132
4.1.4 Assemblierung fluoreszenzmarkierter HERV-K(HML-2) Partikel	134
4.1.5 Fluoreszenzmarkierte HERV-K113 Partikel reifen extrazellulär...	137
4.2 Die Peptide QP1 und QP2 von HERV-K113.....	139
4.3 Intrazellulärer Transport von HERV-K(HML-2) Gag.....	141
4.3.1 Tracking intrazellulärer HERV-K(HML-2) Gag-Akkumulationen.....	141
4.3.2 Mikrotubuligestützter HERV-K(HML-2) Gag-Transport.....	144
4.3.3 Die Rolle des endosomalen Stoffwechselweges.....	146
4.3.3.1 HERV-K(HML-2) Gag akkumuliert in späten Endosomen.....	146
4.3.3.2 HERV-K(HML-2) Gag wird durch Lysosomen degradiert	148
4.3.3.3 HERV-K(HML-2) Gag interagiert nicht mit Recycling-Endosomen.....	148
4.4 Das Hüllprotein Env von HERV-K(HML-2).....	149
4.4.1 Intrazelluläre Verteilung des HERV-K(HML-2) Env.....	150
4.4.1.1 HERV-K(HML-2) Env wird am Endoplasmatischen Retikulum translatiert.....	151
4.4.1.2 HERV-K(HML-2) Env und der endosomale Stoffwechselweg.....	152
4.4.2 Gag und Env assemblieren an der Plasmamembran.....	153
4.4.3 Env wird verstärkt in HERV-K(HML-2) Partikel inkorporiert.....	153

5 Zusammenfassung	157
6 Literaturverzeichnis	159
7 Anhang	191
7.1 Oligonukleotide (Primer)	191
7.1.1 Sequenzierprimer	191
7.1.2 Mutageneseprimer	191
7.1.3 Klonierungsprimer	192
7.2 Abkürzungsverzeichnis	193
7.3 Abbildungsverzeichnis	199
7.4 Filmverzeichnis	201
7.5 Tabellenverzeichnis	203
7.6 Publikationsliste	204
7.7 Danksagung	205
7.8 Eidesstattliche Erklärung	206

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren umfassen behüllte Viren, welche im Viruskern zwei homologe RNA-Einzel-Plusstränge tragen. Diese werden nicht wie bei anderen RNA-Viren direkt translatiert, sondern mit Hilfe der viralen Reversen Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben und ins Wirtsgenom eingebaut. Sie infizieren hauptsächlich tierische und humane Zellen, von Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien bis hin zu Fischen. Retroviren sind bei allen Wirbeltieren zu finden und besitzen meist eine sehr hohe Wirtsspezifität.

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts waren durch Retroviren verursachte Krankheiten wie die Rinderleukämie oder Lungenadenomatose bei Schafen bekannt, aber nicht ihre Ursache (Weiss, 2006). 1908 untersuchten Ellermann und Bang das erste onkogene Retrovirus, das Aviäres Leukosevirus (ALV), und zeigten, dass durch zellfreies Filtrat die Hühnerleukämie auf andere Hühner übertragen werden kann (Ellermann und Bang, 1908). Drei Jahre später übertrug Rous das heute nach ihm benannten Rous Sarkoma Virus (RSV) durch Extrakte aus Hühnersarkomen auf gesunde Hühner. Diese entwickelten daraufhin ebenfalls Tumore (Rous, 1911). 54 Jahre später erhielt er dafür den Nobelpreis. 1936 wurde ein weiteres tumorauslösendes Retrovirus entdeckt, das Maus-Mammatumovirus (MMTV), welches mit Tumorerkrankungen in der Milchdrüse von Mäusen in Zusammenhang steht (Bittner, 1936). Dies bestätigte die Assoziation von Retroviren mit tumorösen Erkrankungen. Im Zusammenhang mit der Isolierung des Murinen Leukämievirus (MLV) 1951 wurde erstmals die vertikale Übertragung viraler Gene auf die nächste Generation beschrieben (Gross, 1980). Die Tumorlymphogenese, als Folge der Aktivierung endogener MLVs, wurde jedoch erst 1970 aufgedeckt (Rowe und Pincus, 1972). Ein entscheidender Schritt in der Geschichte der Retroviren war der Fund von RNA in RSV-Partikeln (Crawford und Crawford, 1961). 1964 stellte Howard M. Temin seine Provirus-Hypothese am Beispiel von RSV vor, die besagt, dass RNA-Tumoviren ins Wirtsgenom integrieren (Temin, 1963, 1964). Durch die Entdeckung der Reversen Transkriptase durch David Baltimore und Howard M. Temin wurden die RNA-Tumoviren letzten Endes 1974 in Retroviren umbenannt (Baltimore, 1975). Diese Entdeckung verwarf ein bis dahin geltendes Dogma der Molekularbiologie. Es besagte, dass der Informationsfluss in Zellen immer von der DNA über die RNA zum Protein verläuft (Coffin et al., 1997). Anfang der 70er Jahre wurden die ersten viralen Proteine beschrieben und 1978 die "Long Terminal Repeats" (LTRs) identifiziert (Ju und Skalka,

1980). Die Beschreibung des ersten humanpathogenen Retrovirus, das Humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ-1 (HTLV-1), erfolgte zwei Jahre später durch Robert C. Gallo (Poiesz et al., 1980; Gallo, 2005). 1983 entdeckten Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi den wohl bekanntesten Vertreter der humanpathogenen Retroviren, das Humane Immundefizienz-Virus Typ-1 (HIV-1), gefolgt von HIV-2 1986 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Clavel et al., 1986). HIV-1 induziert die Immunschwächeerkrankung AIDS ("Acquired Immune Deficiency Syndrome") und hat dazu geführt, dass die Forschung im Bereich Retrovirologie in den letzten Jahrzehnten stark vorangetrieben wurde. Im Jahr 2008 waren weltweit schätzungsweise 33,4 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Jährlich sterben etwa zwei Millionen Menschen an den Folgen der Infektion und etwa genauso viele Neuinfektionen mit HIV sind im gleichen Zeitraum zu beklagen (http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/report/2009/jc1700_epi_update_2009_en.pdf, Zugriff am: 04.11.2011). Der pathogene Vertreter HTLV-1 gilt als Verursacher der adulten T-Zell-Leukämie (ATL), aber auch der HTLV-1-assoziierten Myelopathie/Tropischen Spastischen Paraparese (HAM/TSP) (Alves und Dourado, 2010). HTLV-2 hingegen führt zu T-Zell-Lymphomen, Haarzelleukämie und neurologischen Erkrankungen. Es gilt jedoch zu unterscheiden, dass HTLV-1 CD4⁺-Lymphozyten und HTLV-2 CD8⁺-Lymphozyten infiziert (Poiesz et al., 1980; Cereseto et al., 1996). Weltweit tragen bereits schätzungsweise 20 Millionen Menschen HTLV in sich. Dabei tritt HTLV-1 meist in SüdJapan, Nordiran, West- und Zentralafrika sowie Zentral- und Südamerika auf, HTLV-2 in Mittel- und Südamerika sowie Äquatorialafrika (Yamashita et al., 1995; Gessain und de Thé, 1996; Kanzaki et al., 1996; Kazanji und Gessain, 2003; Bagossi et al., 2009; Mylonas et al., 2010).

Retroviren werden in einfache und komplexe Retroviren unterteilt. Dabei heben sich komplexe Retroviren durch regulatorische Gene im viralen Genom ab, welche zur Expression von akzessorischen Proteinen führen. Die derzeit gültige phylogenetische Taxonomie der *Retroviridae* wurde durch das aus 500 internationalen Virologen bestehende Gremium "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV) festgelegt. Dabei unterscheidet man die Unterfamilien Orthoretroviren (*Orthoretrovirinae*) und Spumaretroviren (*Spumaretrovirinae*). Orthoretroviren werden in sechs Gattungen gegliedert. Dazu gehören zum einen die Alpha-, Gamma- und Epsilon-Retroviren mit einem einfachen Genom und zum anderen die Beta- und Delta-Retroviren, sowie die Lentiviren mit einem komplexen Genom. Die Spumaretroviren besitzen nur eine Gattung,

die Spumaviren mit einem komplexen Genom (Weiss, 2006; <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>, Zugriff am: 02.11.2011). Vertreter der einzelnen Gattung sind im phylogenetischen Stammbaum in Abbildung 1 dargestellt.

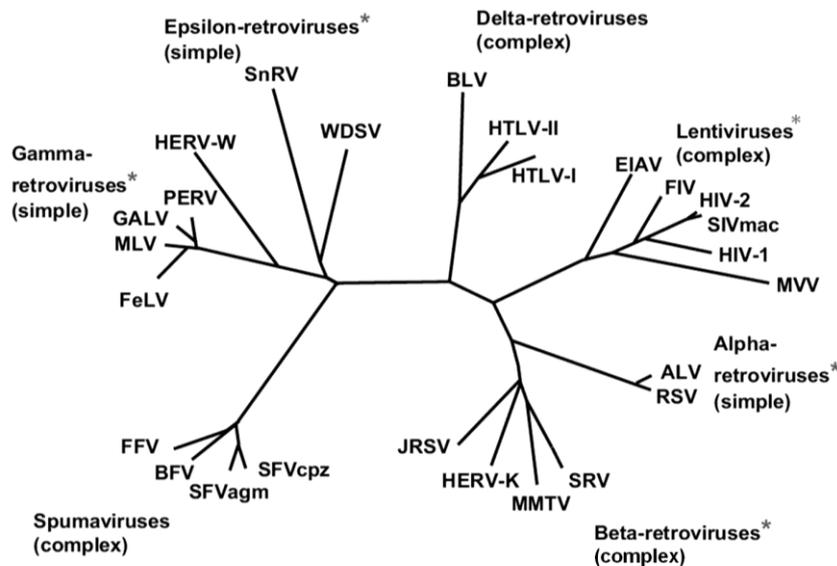


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Retroviren

Die sieben Gattungen der *Retroviridae* und ihre Vertreter. Mit einem grauen Stern sind jene gekennzeichnet, welche neben exogenen auch endogene Vertreter besitzen (Abbildung modifiziert, aus: Weiss, 2006).

Bevor Vergleiche phylogenetischer Verwandtschaftsmerkmale stattfanden, wurden Retroviren durch ihre morphologischen Merkmale in der Elektronenmikroskopie unterschieden und taxonomisch eingeteilt. Hier unterscheidet man zwischen A-, B-, C- und D-Typ Retroviren in Abhängigkeit von ihrer Assemblierungsform und den extrazellulären, morphologischen Merkmalen ihrer viralen Partikel (Abbildung 10; Nermut und Hockley, 1996; Coffin et al., 1997). Eine nähere Erläuterung zu den einzelnen Typen erfolgt in Abschnitt 1.2.3.2. Des Weiteren können endogene und exogene Retroviren unterschieden werden.

1.1.1 Endogene Retroviren

Bei endogenen Retroviren (ERVs) handelt es sich um einst exogene Retroviren, welche die Keimzellen von Vertebraten infizierten, als Provirus in das Wirtsgenom integrierten und über die Keimbahn nach den Mendelschen Gesetzen an die Nachkommen weitervererbt wurden (Abschnitt 1.2.2). Dieser Weg der Vererbung wird als vertikale Vererbung bezeichnet. Demnach tragen alle somatischen Zellen, welche aus infizierten

Keimzellen hervorgehen, das Provirus in sich (Weiss, 2006). Im Genom von Vertebraten sind dutzende bis tausende ERVs zu finden (Herniou et al., 1998). Diese unterlagen in Millionen von Jahren Mutationen, Deletionen und Transpositionen, die mit der Zeit zu inaktiven Proviren führten. Dennoch sind replikationskompetente Proviren in der Lage funktionelle virale Partikel freizusetzen, wie das Maus-Mammatumovirus (MMTV) oder das Koala Retrovirus (KoRV) (Fiebig et al., 2006; Weiss, 2006). Einige tierische Retroviren bilden somit sowohl exogene als auch endogene Formen aus. Dazu gehören neben MMTV und MLV bei Mäusen auch ALV bei Hühnern, das Jaagsiekte Schaf-Retrovirus (JSRV) in Schafen, das Porcine Endogene Retrovirus (PERV) in Schweinen und das Feline Leukämievirus (FeLV) in Katzen (Coffin et al., 1997). Die aus der endogenen Form hervorgehenden viralen Partikel infizieren über den exogenen Weg erneut somatische Zellen (horizontale Vererbung) beziehungsweise reinfizieren bereits infizierte Zellen (Van Nie et al., 1977; Weiss, 2006). Diese Form der Vererbung wird als horizontale Vererbung bezeichnet (Abbildung 2a).

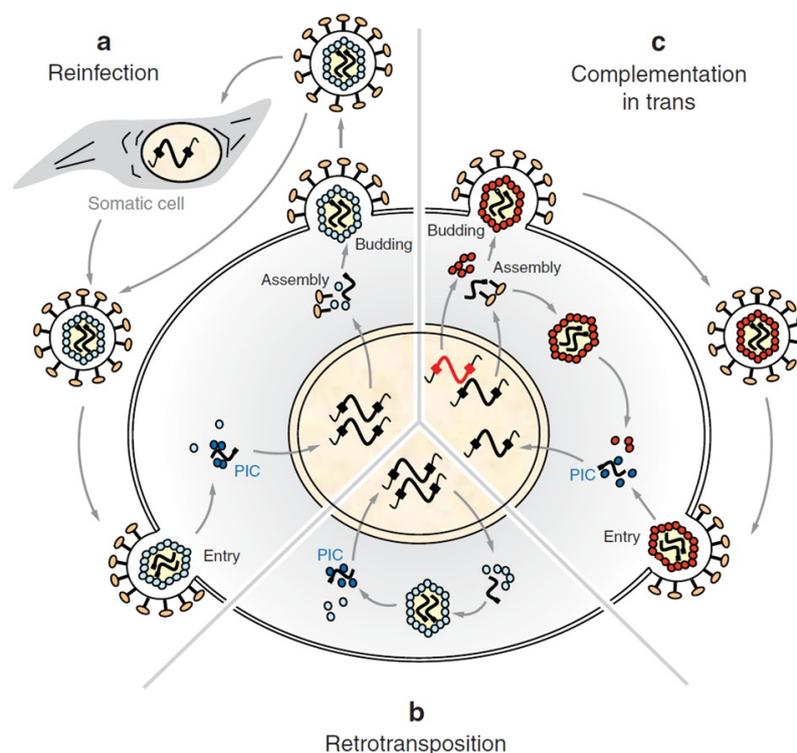


Abbildung 2: Proliferation endogener Retroviren

Endogene Retroviren haben drei Möglichkeiten der Vermehrung. **a)** Bei der Reinfektion ist das Provirus in der Lage funktionelle virale Partikel zu bilden, die andere somatische Zellen oder die Wirtszelle erneut infizieren können (horizontaler Weg). **b)** Als Retransposition bezeichnet man die intrazelluläre Vermehrung, welche ebenfalls zur Integration neuer Proviren ins Zellgenom führt. **c)** Die Komplementation in *trans* beschreibt die Rekombination von Viren. Ist das Provirus partiell defekt, so können diese durch Komponenten anderer Retroviren, die die Zelle infiziert haben, ersetzt werden (rot). PIC: Prä-Integrationskomplex (Abbildung aus: Bannert und Kurth, 2006)

Einige endogene Retroviren vermehren sich ausschließlich intrazellulär. Dieser als Retrotransposition bezeichnete Prozess, benötigt kein funktionelles *env*-Gen und führt zur erneuten Integration des Provirus in das Wirtsgenom (Abbildung 2b). Ein dritter Vermehrungsprozess, dem die Rekombination zu Grunde liegt, wird als Komplementation in *trans* bezeichnet und findet bei Proviren mit teils inaktiven Genen statt. Diese werden durch die Expression aktiver Gene anderer Proviren ersetzt, was zur Bildung funktioneller Partikel führen kann (Abbildung 2c; Bannert und Kurth, 2006).

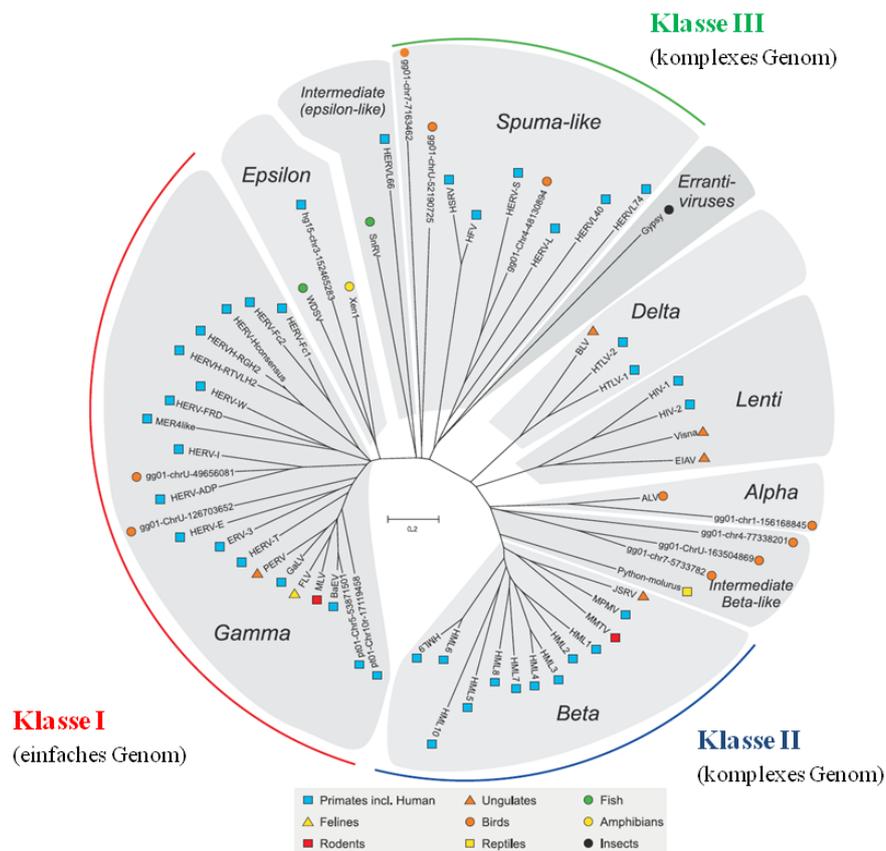


Abbildung 3: Einteilung endogener Retroviren

Das Dendrogramm, erstellt durch den Vergleich der *pol*-Sequenzen, von endogenen Vertretern aller retroviralen Gattungen. Die Symbole verweisen auf die Wirte der Proviren. Die humanen endogenen Retroviren (HERVs) können anhand ihrer Übereinstimmungen mit den Beta-, Gamma- und Spuma-artigen Retroviren in drei große Klassen unterteilt werden. (Abbildung modifiziert, aus: Jern et al., 2005)

Ende der 1960er Jahre wurden die ersten ERVs entdeckt. Dabei handelte es sich um die krebsauslösenden Viren MLV, MMTV und ALV (Weiss et al., 2006). Heute weiß man, dass der retrovirale Anteil im Genom von Wirbeltieren etwa fünf bis zehn Prozent ausmacht (Herniou et al., 1998; Smit, 1999). Für Menschen und Hühner sind bereits mehr als 3300 endogene Retroviren bekannt. Vergleiche der viralen hochkonservierten *pol*-

Sequenzen (800 bis 1100 Aminosäuren) bewiesen eine weite Verbreitung der ERVs. Ein Großteil sind Vertreter der Gammaretroviren, aber auch viele Betaretroviren und Spumaartige Retroviren wurden im Laufe der Evolution endogenisiert (Abbildung 3; Medstrand und Blomberg, 1993; Jern et al., 2005). 2007 fand man zudem das erste endogene Lentivirus im europäischen Hasen, welches mehr als sieben Millionen Jahre alt ist und komplette lentivirale *gag*-, *pol*- und *env*-Domänen aufweist (Katzourakis et al., 2007).

1.1.2 Humane endogene Retroviren (HERV)

Das menschliche Genom besteht zu 8% aus retroviralen Elementen mit terminalen LTRs, wobei es sich bei 4,7% um humane endogene Retroviren (HERVs) handelt (Lander et al., 2001; Bannert und Kurth, 2004; Beimforde et al., 2008). HERVs waren ebenfalls einst exogene Retroviren, welche die menschlichen Keimzellen infizierten, endogenisierten und durch Reinfektion und Retrotransposition mehrfach in das Genom integrierten (Gifford und Tristem, 2003). Im Rahmen des Humangenomprojektes 2001 spürte man aufgrund von Sequenzvergleichen mit bereits bekannten Retroviren von Säugetieren mehrere tausend HERVs im menschlichen Genom auf (Lander et al., 2001; Gifford, 2006). Humane endogene Retroviren werden aufgrund ihrer Übereinstimmungen mit den Beta-, Gamma- oder Spumaviren in drei Klassen eingeteilt (Abbildung 3). Die Einteilung in HERV-Unterklassen erfolgt meist nach der Primerbindestelle, welche die spezifische tRNA definiert, die als Primer für die Reverse Transkriptase fungiert. Im Falle von HERV-K dient die Lysin-tRNA als Primer, wobei Lysin im Einbuchstabencode der Aminosäuren den Buchstaben K hat (Anderson et al., 1999; Bock und Stoye, 2000).

HERVs spielen sowohl physiologisch als auch pathologisch eine wichtige Rolle. 1992 konnte der physiologische Einfluss der 5'LTR von HERV-E auf die Expression des von ihr aus C-terminal liegenden α -Amylase-Gens nachgewiesen werden. Die Promotorfunktion der LTR verstärkt dabei die Produktion des zuckerspaltenden Enzyms der Speicheldrüse und führt so zu einer schnelleren Verwertung von Kohlenhydraten in der Nahrung (Ting et al., 1992). Ein weiteres Beispiel sind die *env*-Gene von HERV-W und HERV-FRD, besser bekannt als Syncytin-1 und Syncytin-2, welche Einfluss auf die Plazentaentwicklung haben. Syncytin-1 ist an der Fusion der Zytotrophoplastenzellen beteiligt und führt so zur Ausbildung des mehrkernigen Syncytiotrophoblasten (Blond et al., 1999, 2000; Mi et al., 2000; Pötgens et al., 2004). Syncytin-2 trägt durch seine immunsuppressiven Eigenschaften zur Mutter-Kind-Toleranz während der Schwangerschaft bei (Malassiné et al., 2007). Neuste Untersuchungen verwiesen auf die

Expression des Hüllproteins von HERV-K in Zellen des Zytotrophoblasten der Plazenta, aber nicht im Syncytiotrophoblasten. Man vermutet ebenfalls immunsuppressive Eigenschaften und somit eine schützende Funktion vor Abstoßung des Fetus durch das mütterliche Immunsystem (Krämmerer et al., 2011). Pathologisch wurde HERV-K aber auch mit Keimzelltumoren und Melanomen in Zusammenhang gebracht (Götzinger et al., 1996; Muster et al., 2003; Büscher et al., 2005; Krone und Grange, 2010). Aber auch andere HERVs spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Krankheiten. Bei Prostatakarzinomen fand man eine erhöhte Expression des Hüllproteins von HERV-E, nicht aber im gesunden Gewebe (Wang-Johanning et al., 2003). HERV-W steht im Zusammenhang mit Multipler Sklerose und psychiatrischen Krankheiten, wie zum Beispiel Schizophrenie (Antony et al., 2011; Leboyer et al., 2011). Zudem wurden HERVs neben der Multiplen Sklerose mit weiteren Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, wie Diabetes Mellitus Typ-1, rheumatischer Arthritis, *Lupus erythematosus*, der primären biliären Zirrhose und dem Sjögren-Syndrom (Balada et al., 2010).

1.2 Aufbau und Replikation von Retroviren

1.2.1 Morphologie retroviraler Partikel

Retroviren sind behüllte Viren mit einem Durchmesser von 80-120nm und besitzen einen ikosaedrischen, zylindrischen oder konischen Kern. Sie bestehen zu 65% aus Proteinen, 30% aus Lipiden, 3% aus Kohlenhydraten und zu 2-3% aus RNA (Coffin et al., 1997; Vogt und Simon, 1999). Grundlegend unterscheidet man morphologisch zwischen unreifen und reifen, extrazellulären, retroviralen Partikeln (Abbildung 4). Unreife Partikel werden von den Zellen freigesetzt und reifen durch die Prozessierung des Polystrukturproteins Gag mittels viraler Protease. Beide Formen weisen eine virale Hüllmembran auf, angereichert mit Sphingolipiden, Cholesterol und weiteren Komponenten der Lipid Rafts (Quigley et al., 1971; Aloia et al., 1993). Ihre Oberfläche ist zudem homogen mit viralem, glykosilierten Hüllprotein assoziiert, das mittels viralem Transmembranprotein bestehend aus etwa 20 hydrophoben Aminosäuren die virale Membran durchspannt (Özel et al., 1988; Modrow et al., 2009). Bei unreifen Partikeln befindet sich dicht unter der viralen Membran eine homogene Schicht, welche durch das Vorläuferprotein Gag gebildet wird. Sie macht etwa dreiviertel des Proteingehaltes viraler Partikel aus und zeigt sich in der Transmissionselektronenmikroskopie als eine elektronendichte Schicht unter der Hüllmembran (Coffin et al., 1997; Abbildung 4). Wird das Vorläuferprotein Gag im Rahmen der Reifung durch die virale Protease in seine

einzelnen Strukturproteine gespalten, so kommt es zur Ausbildung reifer Partikel. Diese zeichnen sich im Gegensatz zu den unreifen Partikeln durch einen elektronendichten Kern aus (Abbildung 4). Nach der Reifung verbleibt das Matrixprotein dicht unter der Membran. Die Kapsidproteine formieren sich zum Viruskern, dem Kapsid. Es beherbergt den Ribonukleoproteinkomplex, bestehend aus zwei homologen RNA-Einzel-Plussträngen und Nukleokapsidproteinen, die an die RNA binden und diese kondensieren (Gelderblom, 1996; Nermut und Hockley, 1996; Takasaki et al., 1997). Zudem enthält das Kapsid weitere virale Proteine, wie die Reverse Transkriptase, die Integrase und die virale Protease (Abbildung 4).

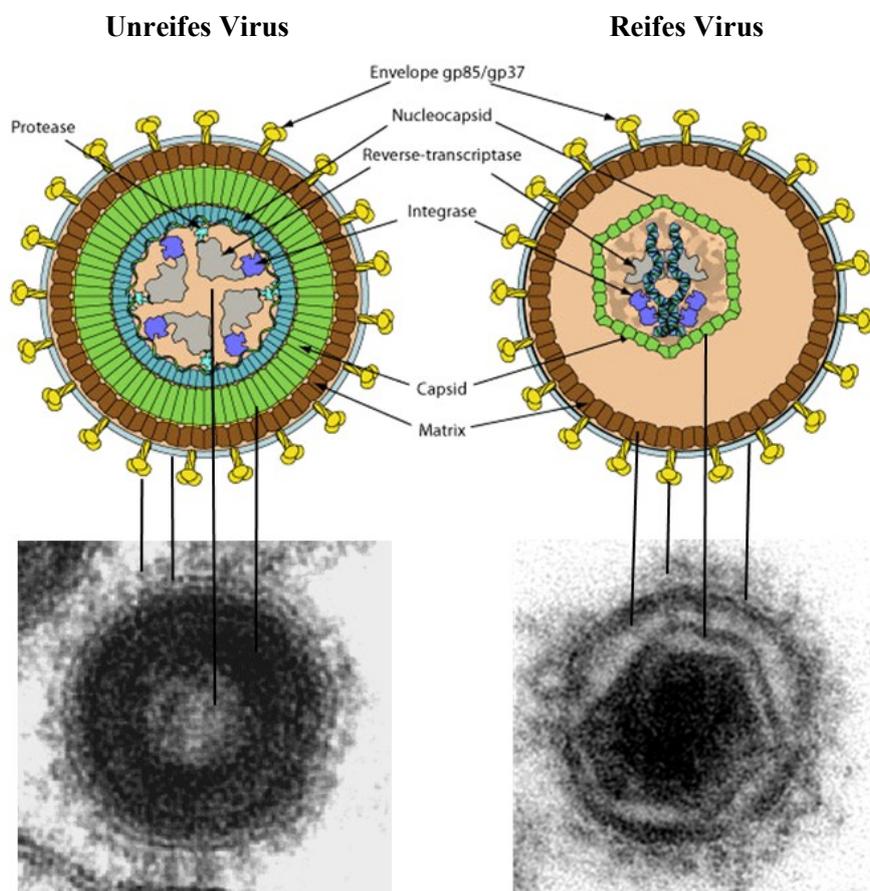


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Betaretrovirus

Die schematische Darstellung eines unreifen Virus mit Gag-Schicht und reifen Partikels mit Viruskern, dem Kapsid, am Beispiel des Betaretrovirus (Quelle: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/66.html, Zugriff vom: 08.05.2009). Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von betaretroviralen Partikeln im unreifen und reifen Zustand des humanen endogenen Retrovirus K113 (HERV-K113).

1.2.2 Virales Genom und Provirus

Retroviren besitzen ein 7 bis 12 Kilobasen (kb) großes Genom, bestehend aus zwei homologen RNA-Einzelsträngen in Plusstrangorientierung. Das Genom der Retroviren

besteht grundlegend aus den vier Genen, *gag*, *pro*, *pol* und *env*, wobei alle Gene einen offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) aufweisen (Abbildung 6). Die Gene *gag* und *env* sind Strukturgene. Aus dem *gag*-Gen geht das Vorläuferprotein Gag, das gruppenspezifisches Antigen, hervor. Es ist ein Polystrukturprotein und umfasst bei allen Retroviren die Hauptstrukturproteine: Matrixprotein, Kapsidprotein und Nukleokapsidprotein (Abbildung 5). Zudem weisen die meisten Gag-Proteine noch weitere Proteine von unterschiedlicher Funktion auf (Coffin et al., 1997; Demirov und Freed, 2004). Sie befinden sich entweder am C-Terminus von Gag oder zwischen den bereits erwähnten Strukturproteinen (Abbildung 5). Einige dieser Proteine besitzen eine oder mehrere L-Domänen und sind deshalb entscheidend für die Knospung und Freisetzung viraler Partikel. Zu diesen Proteinen zählen zum Beispiel das C-terminale p6 des HIV-1, p12 des MLV und p24 des *Mason-Pfizer Monkey Virus* (MPMV) (Göttlinger et al., 1991; Huang et al., 1995; Yuan et al., 1999; Gottwein et al., 2003). Das p6-Protein von HIV-1 ist zudem an der Inkorporation des akzessorischen Proteins Vpr in virale Partikel beteiligt (Bachand et al., 1999). Das C-terminale p4-Protein von MPMV interagiert mit dem TRiC-Chaperon. Diese Interaktion führt zu einer korrekten Faltung des Vorläuferproteins Gag und steht zudem unter Verdacht an der Assemblierung beteiligt zu sein (Hong et al., 2001).

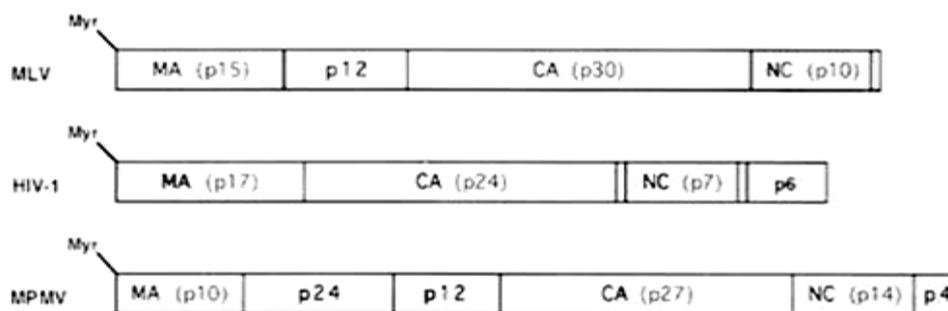


Abbildung 5: Retrovirale Gag-Proteine

Aufbau der retroviralen, myristoylierten (Myr) Vorläuferproteine Gag des Murinen Leukämievirus (MLV), des Humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) und des *Mason-Pfizer Monkey Virus* (MPMV). MA-Matrixprotein, CA-Kapsidprotein, NC-Nukleokapsidprotein (Abbildung modifiziert, aus: Coffin et al., 1997)

Das *pro*-Gen kodiert für die virale Protease, *pol* für die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase sowie RNaseH, und *env* für das Hüllprotein Env. Das Hüllprotein Env ist ebenfalls ein Vorläuferprotein, bestehend aus Signalpeptid, Oberflächenglykoprotein und Transmembranprotein (Abbildung 12). Es wird im

Gegensatz zum Gag-Protein vor dem Einbau in die viralen Partikel prozessiert (Coffin et al., 1997; Modrow et al., 2009; Kurth und Bannert, 2010). Komplexe Retroviren besitzen auch regulatorische Gene. Sie führen zur Expression von akzessorischen Proteinen, welche Einfluss auf Wirtsfaktoren nehmen können und entscheidend den Replikationszyklus beeinflussen (Coiras et al., 2010).

Wird das virale Genom in die DNA des Wirtes integriert, so spricht man von einem Provirus (Abbildung 6A). Die viralen Gene werden dann jeweils von einer LTR flankiert, die immer in der gleichen Orientierung vorliegen (Reuss und Schaller, 1991). Bei LTRs handelt es sich um 200 bis 600 Basenpaare (bp) lange, regulatorische DNA-Sequenzen, welche für die Integration beziehungsweise Reintegration von Retroelementen ins Wirtsgenom essentiell sind. Zudem dienen sie als Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren und enthalten alle Signalsequenzen für die Initiation, Verstärkung und Steuerung der Genexpression. Eine LTR setzt sich aus U3-Region, welche Promotor und Verstärker beinhaltet, R-Region und U5-Region zusammen. Die virale RNA wird am 5'-Ende durch eine 5'Cap-Struktur gefolgt von R- und U5-Region flankiert (Abbildung 6B). Hinter der U5-Region befindet sich direkt die Primerbindestelle (PBS), an welche die spezifische, zelleigene Transfer-RNA (tRNA) bindet. Hierdurch wird die reverse Transkription initiiert, da die tRNA in diesem Fall als Primer fungiert. Der PBS folgt die Ψ -Site, das Verpackungssignal der retroviralen RNA. Am 3'-Ende der viralen RNA befinden sich die R- und U3-Region mit einer 3'Polyadenylierung, auch als Poly-A-Schwanz bezeichnet (Modrow et al., 2009).

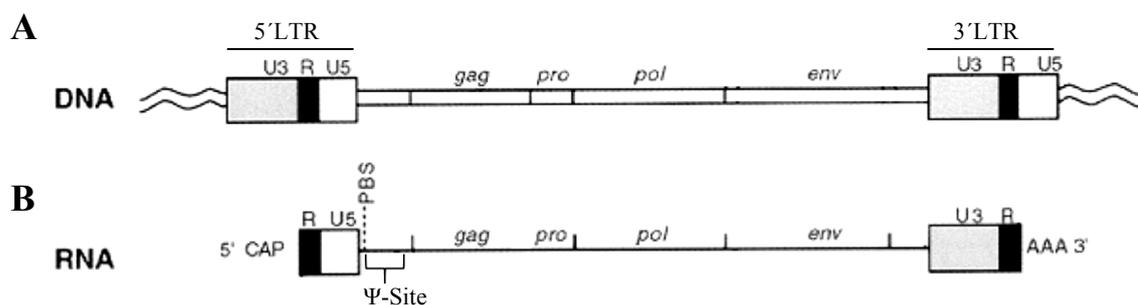


Abbildung 6: Schematische darstellen der retroviralen RNA und des Provirus

A: Provirus mit 5'LTR und 3'LTR, welche die retroviralen Gene *gag*, *pro*, *pol* und *env* flankieren. Die LTR (long terminal repeats) setzen sich aus U3-, R- und U5-Region (5'→3') zusammen. B: Virale RNA mit 5'-Cap-Struktur, Primerbindestelle (PBS) und Verpackungssignal (Ψ -Site) am 5'-Ende, sowie Poly-A-Schwanz am 3'-Ende. Die 5'Cap-Struktur dient als Signalsequenz zur Anlagerung ribosomaler Untereinheiten und schützt die mRNA vor der Hydrolyse durch Enzyme, ebenso wie der Poly-A-Schwanz. (Abbildung modifiziert, aus: Coffin et al., 1997)

1.2.3 Replikationszyklus

Die Replikation von Retroviren beginnt durch die Infektion der Wirtszelle (Abbildung 7). Dabei heftet sich das Virus, vermittelt durch seine glykosilierten Hüllproteine, an spezifische Rezeptoren der Zelle. Es führt zur Verschmelzung der Virushülle mit der Plasmamembran oder zur Endozytose des gesamten viralen Partikels. Nach dem Eintritt in die Zelle erfährt das hüllenlose Kapsid eine Konformationsänderung, gibt einige seiner Untereinheiten ab und wird so durchlässig für Nukleotide (Modrow et al., 2009). Dieser reverse Transkriptionskomplex beinhaltet den mit der Reversen Transkriptase assoziierten Ribonukleotidkomplex. Durch die Bindung der spezifischen tRNA an der Primerbindestelle der viralen RNA wird der Prozess der Reversen Transkription initiiert (Abbildung 6). Dabei wird die virale Erbinformation in doppelsträngige, provirale DNA umgeschrieben. Die virale RNA wird im Anschluss durch die virale RNaseH hydrolytisch abgebaut. Der daraus resultierende Prä-Integrationskomplex aus proviraler DNA und Proteinen wird bei den Lentiviren vom Zytoplasma über die Kernporen in den Zellkern transportiert. Hieran sind zum einen Kernimportfaktoren, aber auch akzessorische, virale Proteine beteiligt, wie zum Beispiel Vpr bei HIV-1 (Bukrinsky et al., 1993b; Freed, 2001). Prä-Integrationskomplexe anderer Retroviren sind ausschließlich während der Mitose fähig in den Zellkern einzuwandern, da kerntransportfördernde Faktoren fehlen. Im Zellkern integriert die provirale DNA dann mittels Integrase in das euchromatische Wirtsgenom. Dabei kann es zur Zerstörung, Inaktivierung oder Aktivierung zelleigener Gene kommen. Die Integration des Provirus ist essentiell für die Expression der viralen Proteine und wird durch Zellteilung vererbt (Weiss, 2006). Findet die Transkription der viralen Gene statt, was vom Aktivitätszustand der Wirtszelle abhängt, so werden verschiedene virale mRNA-Spezies beobachtet (Reed, 2003). Dabei handelt es sich zum einen um die Vollängen-mRNA, die aufgrund des Verpackungssignals auch als virales Genom zur Verfügung steht. Ihre Translation führt zur Synthese der Vorläuferproteine Gag, Gag-Pro und Gag-Pro-Pol (Swanstrom und Wills, 1997; Bannert et al., 2004). Zum anderen findet man einfach und mehrfach gespleißte mRNA (Abbildung 12). Das Spleißen ist ein essentieller Prozess, um mehrere Proteine, kodiert in einem Transkript, unabhängig voneinander zu exprimieren (Bodem et al., 2011). Aufgrund zellulärer Kontrollmechanismen kann zudem nur gespleißte mRNA aus dem Zellkern exportiert werden. Um das zu umgehen, besitzen komplexe Retroviren spezifische Shuttleproteine, die den Transport viraler Vollängen-mRNA in das Zytoplasma ermöglichen (Wodrich und Kräusslich, 2001; Cullen, 2002, 2003; Hanke et al., 2013). Die Expression fast aller

viralen Proteine findet an frei, im Zytoplasma liegenden Ribosomen oder Ribosomenketten (Polysomen) statt (Tritel und Resh, 2000). Der Transport der viralen Proteine erfolgt dann direkt oder über den endosomalen Transportweg zur Plasmamembran. Das Vorläuferprotein Env wird hingegen am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) durch die Translation einfach gespleißter mRNA gebildet und direkt in die ER-Membran integriert (Teissier et al., 2010; Checkerly et al., 2011). Im Anschluss erfolgt der vesikuläre Transport über das Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran. Je nach Assemblierungsort werden die viralen Partikel dann über Exozytose oder Knospung von der Plasmamembran freigesetzt und reifen extrazellulär durch die Prozessierung der Gag Vorläuferproteine mittels viraler Protease (Ono, 2009; George et al., 2011; Kraus et al., 2011). In den folgenden Abschnitten wird näher auf die späten Phasen des retroviralen Replikationszyklus eingegangen.

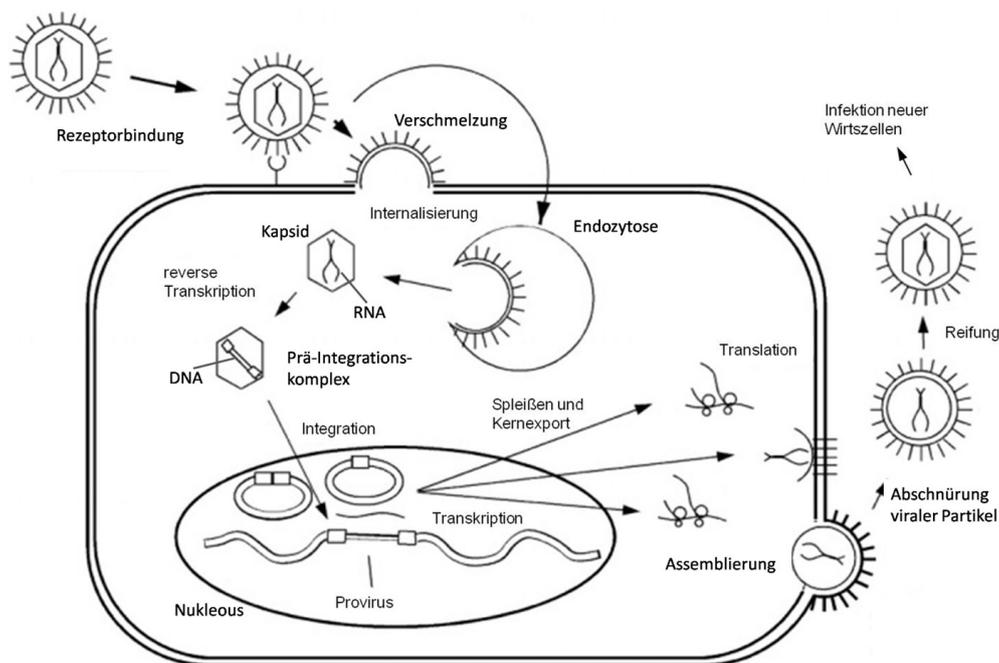


Abbildung 7: Schema des retroviralen Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von Retroviren beginnt mit der rezeptorabhängigen Bindung des Virus an die Wirtszelle. Das Kapsid wird je nach Virus durch die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran oder Endozytose internalisiert. Das Umschreiben einzelsträngiger RNA in doppelsträngige DNA erfolgt mittels reverser Transkriptase im Komplex. Der daraus resultierende Prä-Intergartionskomplex wird in den Zellkern importiert und das virale Genom als Provirus in die Wirts-DNA integriert. Die aus der Transkription der viralen DNA resultierende mRNA wird vor dem Kernexport teils differentiell gespleißt und dient der Proteinexpression. Vollängen-mRNA und virale Proteine assemblieren an zellulären Membranen zu viralen Partikeln. Diese werden freigesetzt und reifen extrazellulär. (Abbildung modifiziert, aus: Knipe et al., 2006)

1.2.3.1 Intrazellulärer Transport retroviraler Proteine

Der zielgerichtete, intrazelluläre Transport der viralen Proteine ist von entscheidender Bedeutung für den Zusammenbau und die Freisetzung der viralen Partikel an zellulären Membranen. Die entscheidende Rolle spielt das Strukturprotein Gag, das allein in der Lage ist, virusartige Partikel (VLPs, *virus-like particles*) zu formen, welche knospen und freigesetzt werden (Adamson und Jones, 2004; Jouvenet et al., 2009). Diese sind jedoch nicht funktionell. Durch die Interaktion von Gag mit zellulären Wirtsfaktoren wird das virale Protein gerichtet zur Zellperipherie transportiert (Coffin et al., 1997). Untersuchungen diverser Retroviren verweisen dabei auf eine entscheidende Rolle des endosomalen Stoffwechselweges (Abbildung 8). Er ermöglicht die Aufnahme von Stoffen aus dem extrazellulären Raum und die Degradation von Membrankomponenten. Eine Rezeptor-Liganden-Bindung an der Plasmamembran führt zur deren Einstülpung in das Zytoplasma der Zelle, gefolgt von der Abschnürung Clathrin-beschichteter Vesikel. Diese fusionieren mit frühen Endosomen, welche auch als Sorting-Endosomen bekannt sind und sich in der Zellperipherie befinden. Membrankomponenten wie Clathrin oder Rezeptoren werden im Anschluss mittels Recycling-Endosomen wieder in die Zellmembran integriert. Die frühen Endosomen werden hingegen Richtung Zellkern transportiert, wo sie mit späten Endosomen oder Multivesikulären Körperchen (MVBs, *multivesicular bodies*) fusionieren. Bei MVBs handelt es sich um späte Endosomen, die mit Hilfe des ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) Membranabschnitte in ihr Inneres abschnüren. Somit entstehen große Vesikel, welche kleine Vesikel in ihrem Lumen beinhalten. Die MVBs fusionieren mit Lysosomen oder setzen ihren Inhalt an der Plasmamembran frei. In Lysosomen findet der Abbau von zelleigenen als auch zellfremden Stoffen durch Hydrolyse im sauren Milieu statt. Auch kann ihr Inhalt in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Das Trans-Golgi-Netzwerk beliefert zudem den Endosomalen Stoffwechselweg mit Membrankomponenten, wie Lipide oder Membranrezeptoren (Mellman, 1996). Eine spezifische Verschmelzung der endosomalen Kompartimente wird durch kleine, membranständige GTPasen reguliert, die zur Familie der rab-Proteine gehören (Jordens et al., 2005; Soldati und Schliwa, 2006). Sie sind spezifisch für jedes endosomale Kompartiment (Abbildung 8). Zudem spielen die rab-Proteine eine entscheidende Rolle beim zytoplasmatischen Membrantransport, indem sie Motorproteine rekrutieren (Jordens et al., 2005). Als Beispiel sei rab5 genannt, dass in der Membran von frühen Endosomen verankert ist und an das Motorprotein Dynein bindet. Dynein vermittelt ausschließlich den Mikrotubuli-assoziierten Transport in das Zellinnere,

was somit die Fusion früher Endosomen mit späten Endosomen ermöglicht (Schnapp und Reese, 1989; Schroer et al., 1989). Die Fusion der beiden endosomalen Kompartimente wird ebenfalls durch rab5 gesteuert (Jordens et al., 2005).

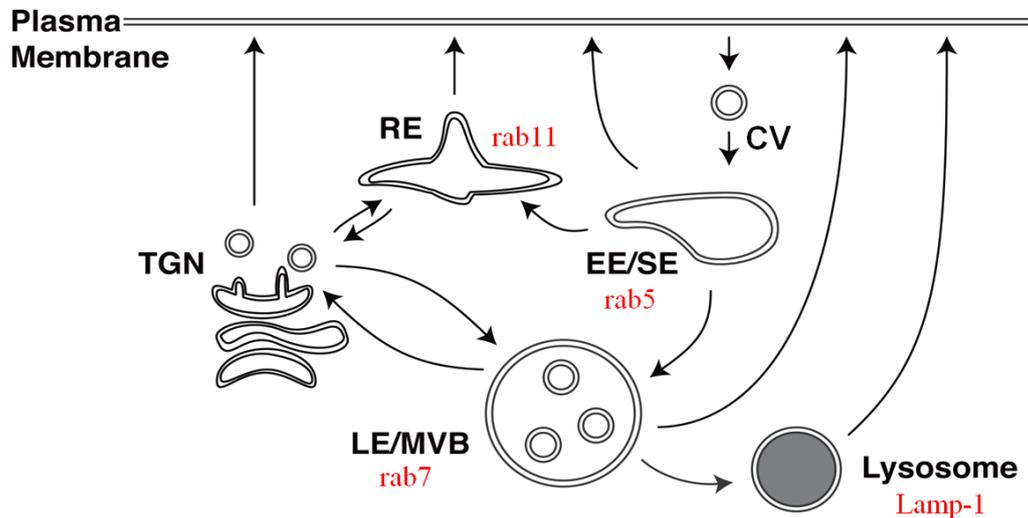


Abbildung 8: Endosomaler Stoffwechselweg

Durch die Einstülpung der Plasmamembran in das Zytoplasma der Zelle kommt es zur Abschnürung von Clathrin-beschichteten Vesikeln (CV) und deren Verschmelzung mit frühen Endosomen/Sorting-Endosomen (EE/SE). Diese überführen Membrankomponenten an die Recycling-Endosomen (RE) und fusionieren mit späten Endosomen (LE) oder Multivesikulären Körperchen (MVBs). Teils geben sie ihren Inhalt auch an Lysosomen weiter, in denen der hydrolytische Abbau erfolgt. Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) dient als Verteilungsstation und beliefert den endosomalen Stoffwechselweg mit Membrankomponenten. In rot sind die spezifischen Marker der einzelnen endosomalen Kompartimente dargestellt. (Abbildung modifiziert; aus: Ono, 2009)

Dass der endosomale Stoffwechselweg einen entscheidenden Einfluss auf den Transport retroviraler Proteine hat, zeigen bisherige Untersuchungen zu HIV-1 sehr deutlich. Bei HIV-1 Gag führt die co-translationale, N-terminale Myristoylierung des Matrixproteins, sowie ein Di-Leucin-Motiv im Kapsidprotein zum Transport und zur Bindung der Gag-Monomere an der zytosolischen Seite der MVB-Membran (Abbildung 9). Zudem interagiert die L-Domäne des C-terminalen p6-Proteins von HIV-1 Gag mit dem ESCRT der MVBs, was einen gerichteten Transport von Gag zur Plasmamembran ermöglicht (Resh, 2005; Raiborg und Stenmark, 2009). Aber nicht nur Gag, sondern auch Gag-Multimere, assoziieren mit viraler RNA und virale Partikel können mit intrazellulären Kompartimenten wie späten Endosomen und multivesikulären Körperchen in Zusammenhang gebracht werden (Basyuk et al., 2003; Nydegger et al., 2003; Pelchen-Matthews et al., 2003; Sherer et al., 2003; Ono und Freed, 2004). Zudem verstärkt ein transientser zyttoplasmatischer Kalziumanstieg die Freisetzung von viralen Partikeln durch

die Fusion von multivesikulären Körperchen mit der Plasmamembran (Perlman und Resh, 2006). Auch für andere Retroviren wie HTLV-1, MLV und MPMV wurde bereits der Einfluss des endosomalen Stoffwechselweges auf den intrazellulären Transport des Polystrukturproteins Gag gezeigt (Basyuk et al., 2003; Sfakianos und Hunter, 2003; Blot et al., 2004; Dorweiler et al., 2006).

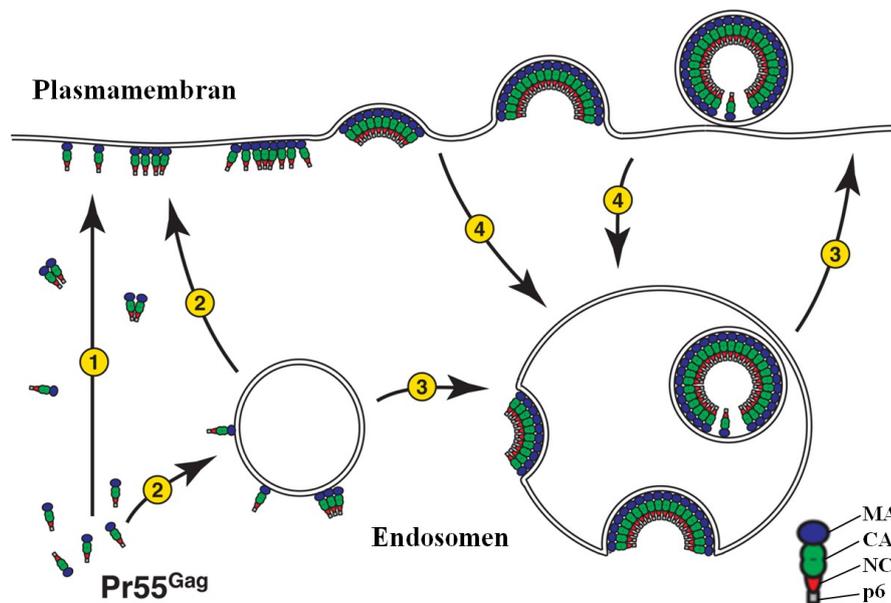


Abbildung 9: Intrazelluläre Transportwege und Assemblierung von HIV-1 Gag

Nach der Expression des Vorläuferproteins HIV-1 Gag (Pr55^{Gag}) erfolgt der Transport entweder direkt (1) oder über den endosomalen Transportweg (2) an die Plasmamembran. An den endosomalen Kompartimenten kann es zur Multimerisierung oder Bildung von viralen Partikeln kommen. Diese knospen in das Lumen und werden über die Membranfusion von Kompartiment und Plasmamembran freigesetzt (3). Zum Großteil findet die Assemblierung der viralen Partikel an der Plasmamembran statt, von wo aus jedoch jederzeit Vorstufen als auch virale Partikel endozytiert werden können (4). (Abbildung modifiziert; aus: Ono, 2009)

Aber nicht nur Gag sondern auch das Hüllprotein Env und die virale RNA nutzen diesen Weg. Das Hüllprotein wird nach seiner Synthese am rauen Endoplasmatischen Retikulum, mittels endosomalen Stoffwechselweg über das Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran transportiert (Rothman und Lodish, 1977; Pfeffer und Rothman, 1987; Checkerly et al., 2011). Währenddessen erfolgt die Prozessierung durch zelluläre Proteasen und die Glykosilierung des Hüllproteins. Durch die Fusion der Endosomen mit der Plasmamembran wird das Hüllprotein in die Plasmamembran integriert und bewegt sich lateral zum Ort der Partikelassemblierung (Coffin et al., 1997). Aber auch mit Hilfe von MVBs kann Env zur Plasmamembran gelangen. Zeigen die Zellen eine stark reduzierte Exozytoseaktivität, wie zum Beispiel Makrophagen, so führt dies zur Knospung

von viralen Partikeln in die Lumen von MVBs (Raposo et al., 2002; Pelchen-Matthews et al., 2003; Resh, 2005). Ebenso kann das virale Hüllprotein durch endosomale Abschnürungen der Plasmamembran dem endosomalen Stoffwechselweg wieder zugeführt werden (Basyuk et al., 2003). Eine weitere entscheidende Komponente funktioneller Partikel ist das virale Genom. Vorläufer-RNA, die ein Verpackungssignal aufweist, bindet über das Nukleokapsidprotein an das Gag-Vorläuferprotein und bildet so Gag-RNA-Komplexe. Sie treten an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran oder endosomalen Membran auf. Im letzteren Fall erfolgt der Transport des viralen Genoms gerichtet zur Zelloberfläche, wo der Gag-RNA-Komplex auf das glykosilierte Hüllprotein Env trifft. Auf der anderen Seite kann auch hier die Knospung funktioneller Partikel in das Lumen endosomaler Kompartimente stattfinden (Basyuk et al., 2003; Ono, 2009).

1.2.3.2 Assemblierung

Die Assemblierung viraler Partikel ist von vielen Komponenten abhängig und stellt damit einen sehr komplexen Prozess dar. Das Vorläuferprotein Gag spielt dabei die entscheidende Rolle, da ohne Gag eine retrovirale Assemblierung ausgeschlossen wäre. Zudem bestimmt die Assemblierung von Gag auch die Morphologie der Retroviren. Sie werden elektronenmikroskopisch in A-, B-, C- und D-Typ eingeteilt (Abbildung 10). Als A-Typ werden hüllenlose Vorläuferpartikel im Zytoplasma infizierter Zellen bezeichnet, die frei im Zytoplasma assemblieren und da verbleiben. Deshalb werden sie auch als intrazytosolische A-Typ-Partikel (ICAPs) bezeichnet (Coffin et al., 1997; Kurth und Bannert, 2010). Bei Nagetieren findet man zudem intrazisternale A-Typ-Partikel (IAPs) (Kuff und Lüders, 1988; Reuss und Schaller, 1991). Diese assemblieren an der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums und buddeln in dessen Zisternen. Im Gegensatz zu ICAPs besitzen sie eine Virushülle, die einst Bestandteil des Endoplasmatischen Retikulums war (Welker et al., 1997). Bei beiden Typen handelt es sich um unreife, virale Partikel. Reife, retrovirale Partikel unterscheidet man in B-, C- und D-Typ. B-Typ-Retroviren wie MMTV weisen ein nicht-zentriertes Kapsid im Inneren der Partikel auf. Beim C-Typ wie ALV oder MLV befindet sich das Kapsid zentriert im Zentrum der Virushülle. Die D-Typ-Retroviren wie MPMV besitzen im Gegensatz zu allen anderen Typen ein zylindrisches Kapsid (Abbildung 10; Nermut und Hockley, 1996; Coffin et al., 1997; Kurt und Bannert, 2010). Bei einigen B- und C-Typ Retroviren findet man zudem zwischen Membran und Gag-Schicht eine weitere Schicht, die Zwischenschicht (*intermediate layer*, IML; Abbildung 10B). Diese wurde in der

Vergangenheit sehr häufig in der Transmissionselektronenmikroskopie beispielsweise bei MLV oder MMTV beobachtet (Nermut und Hockley, 1997). Sie weist geringe Mengen des wirtseigenem Aktin-Membranskelettes auf und setzt sich wahrscheinlich aus verschiedenen zellulären Komponenten zusammen, die an der Assemblierung beteiligt sind (Wang et al., 1976; Naito und Matsumoto, 1978).

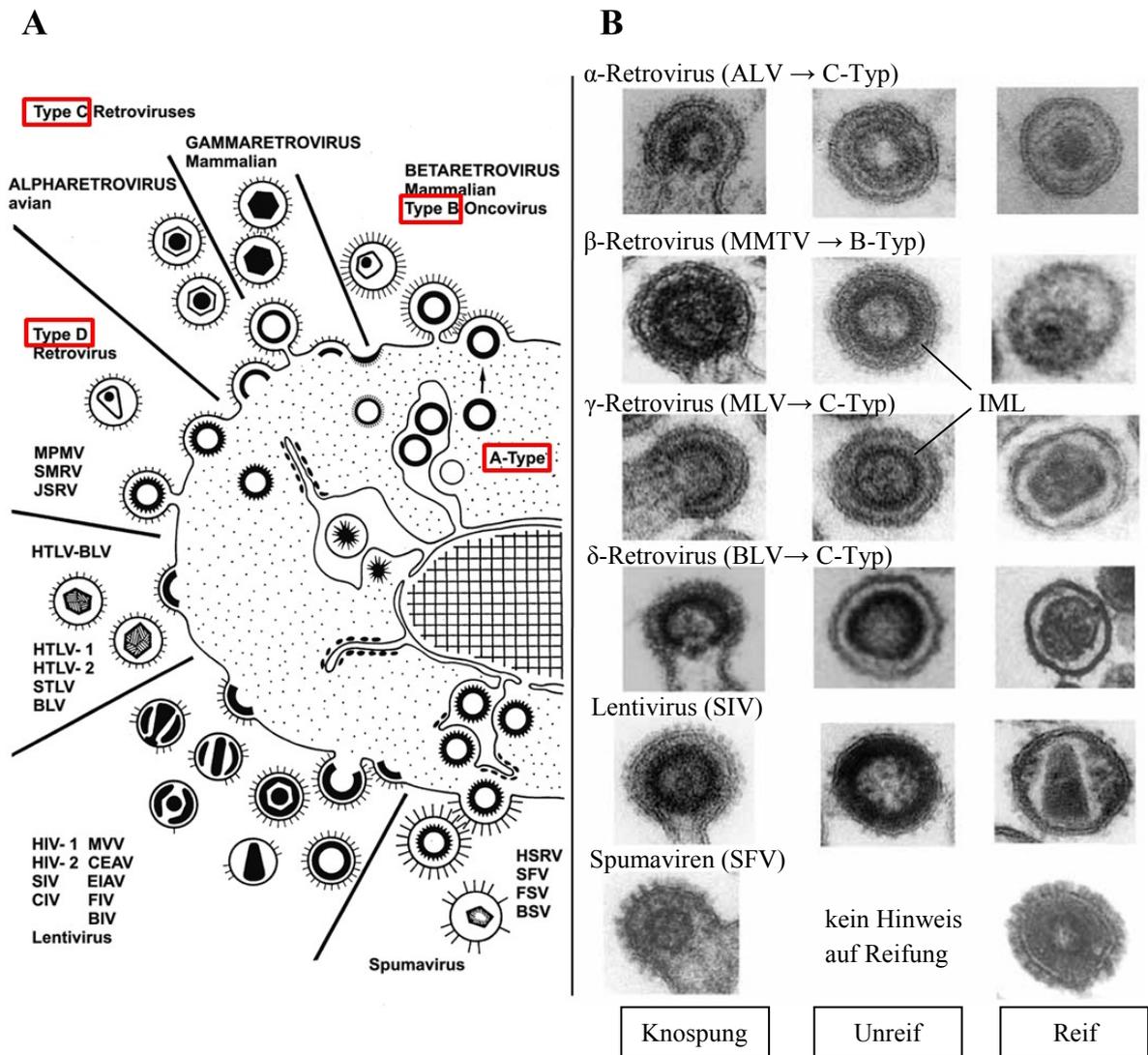


Abbildung 10: Morphologie von A-, B-, C- und D-Typ Retroviren

A: Schematische Darstellung der A-, B-, C- und D-Typ Retroviren. Es gilt zu beachten, dass B- und D-Typ Retroviren aus dem A-Typ hervorgehen (Abbildung modifiziert; aus: Gelderblom et al., 1985). B: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung retroviraler Vertreter der einzelnen Morphologietypen, während der Knospung und im unreifen sowie reifen Stadium. (Abbildung modifiziert; aus: Kurth und Bannert, 2010)

Die diversen morphologischen Formen verweisen auf unterschiedliche Formen der Partikelassemblierung. Betaretroviren (B-Typ), D-Typ-Retroviren und Spumaviren assemblieren im Zytosol zu A-Typ-Partikeln, werden zur Plasmamembran transportiert und hier durch Knospung und Abschnürung als umhüllte Partikel freigesetzt. Diesen Vorgang bezeichnet man als B/D-Typ-Assemblierung. Der Zusammenbau der Partikel an der Plasmamembran wird als C-Typ-Assemblierung bezeichnet und ist bei Alpha- und Gammaretroviren, sowie HTLV/BLV und Lentiviren zu beobachten (Abbildung 10A; Nermut und Hockley, 1996). Zwei Gattungen der Retroviren besitzen eine Sonderstellung. Zum einen die Lentiviren wie HIV und SIV, die an der Plasmamembran assemblieren, aber im reifen Zustand ein konisches Kapsid aufweisen (Abbildung 10). Somit vereinen die Lentiviren sowohl Merkmale vom C-Typ als auch vom D-Typ. Eine weitere Sonderstellung haben die Spumaviren, da bis heute kein Reifungsprozess der viralen Partikel beobachtet werden konnte (Wilk et al., 2001). Auch zeigte eine Punktmutation im Matrixprotein (R55W) des Vorläuferproteins Gag von MPMV (D-Typ), dass diese bereits ausreicht, um die Assemblierung der Partikeln vom Inneren der Zelle an die Plasmamembran zu verlagern (Rhee und Hunter, 1990).

Die kovalente Bindung von Gag/Gag-Pro/Gag-Pro-Pol Monomeren oder Multimeren an zelluläre Membranen erfolgt über das saure Phospholipid Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat der zytosolischen Membran. Seitens Gag wird diese Bindung durch eine kotranslationelle, N-terminale Myristoylierung und eine N-proximale, hochbasische Region im Matrixprotein des Vorläuferproteins Gag gewährleistet (Bryant und Ratner, 1990; Spearman et al., 1994; Resh, 1994; Zhou et al., 1994; Ono et al., 2004; Rudner et al., 2005). Der Myristoylrest, bestehend aus einer gesättigten C₁₄-Fettsäure, der Myristoyle Säure, liegt in der Tertiärstruktur von Gag-Monomeren versteckt vor. Die Interaktion der Kapsidproteine mehrerer Gag-Monomere und die Bindung der viralen RNA an das C-terminale Nukleokapsid führen zur Multimerisierung im Zytoplasma. Die Bindung zwischen RNA und Nukleokapsid erfolgt dabei über ein bis zwei Zinkfinger motive (CCHC), die mit den Guanosinen im Verpackungssignal (ψ -Site) der viralen Vollängen-RNA interagieren (Summers et al., 1992; De Guzman et al., 1998). Durch die Multimerisierung der Vorläuferproteine Gag/Gag-Pro/Gag-Pro-Pol kommt es zur Konformationsänderung der Gag-Tertiärstruktur und damit zur Freilegung des Myristoylrestes (Tang et al., 2003; Fledderman et al., 2010; Hamard-Peron und Mutiaux, 2011). Dieses *myristyl switch model* ermöglicht die Bindung der viralen Vorläuferproteine

an der zellulären Membran und hat zudem einen regulatorischen Effekt. Er beruht auf der Hemmung der Partikelassemblierung, bis eine ausreichende Expression aller viralen Komponenten stattgefunden hat (Zhou und Resh, 1996; Spermann et al., 1997; Paillart und Göttlinger, 1999; Resh, 2005). Bereits frühere Untersuchungen zeigten, dass die Bindungsenergie eines Myristoylrestes für eine stabile kovalente Bindung von Gag oder Gag-Multimeren an der Membran nicht ausreicht (Blenis und Resh, 1993). Verstärkt wird diese durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der hochbasischen Region im Matrixprotein und den sauren Phospholipiden der zellulären Membran (Resh, 1994; Hamard-Peron und Mutiaux, 2011). Zudem führt die Bindung zur Rekrutierung von Lipid Raft-Komponenten, wie Cholesterol oder Spingolipiden. Die daraus resultierenden Mikrodomänen der Membran, auch Lipid Rafts genannt, stellen den Ort der Assemblierung von glykosiliertem Hüllprotein Env mit den Vorläuferproteinen Gag/Gag-Pro/Gag-Pro-Pol dar (Ono und Freed, 2005; Saad et al., 2006). Die Inkorporation des Hüllproteins Env und somit die Bildung infektiöser Partikel wird über das Matrixprotein gewährleistet. Dabei sind Unterschiede zwischen den einzelnen Genera der Retroviren zu verzeichnen. Bei RSV konnte gezeigt werden, dass eine Bindung zwischen dem Matrixprotein und dem Transmembranprotein von Env besteht (Gebhardt et al., 1984). Ein Verlust des zytoplasmatischen Teils des Transmembranproteins führt trotzdem zur Bildung infektiöser Partikel (Perez et al., 1987). Bei HIV-1 ist sowohl die Funktionalität des Matrixproteins als auch der zytoplasmatische Teil des Transmembranproteins entscheidend für die Inkorporation des Oberflächenproteins in die Virushülle (Yu et al., 1993; Freed und Martin, 1995). Es zeigt, dass die Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen Anteil von Env und dem Matrixprotein von Gag verschiedener Retroviren variiert. Zudem kann es zu viralen Pseudotypen kommen, wenn verschiedene Viren eine Zelle infizieren. Während der Assemblierung können dann Hüllproteine verschiedener Viren in ein virales Partikel eingebaut werden (Pickl et al., 2001; Briggs et al., 2003). Diese Fähigkeit wird häufig ausgenutzt, um virale Partikel überhaupt oder mit funktionellen Hüllproteinen zu versehen (Rubin, 1965).

1.2.3.3 Budding und Reifung

Durch die Knospung (Budding) der viralen Partikel an zellulären Membranen in das Lumen zellulärer Membrankompartimente oder in den extrazellulären Raum erhalten diese ihre Hüllmembran mit transmembranen, viralen Glykoproteinen (Abbildung 9 und 10A). Die entscheidende Rolle für die Freisetzung der viralen Partikel spielen dabei eine

oder mehrere L-Domänen des Gag-Proteins. Die aus vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren bestehenden Sequenzen können unterschiedliche Motive (PT/SAP, PPxY oder YPxL) aufweisen, besitzen aber immer mindestens ein Prolin (Freed, 2002; Bieniasz, 2006). Die L-Domänen interagieren mit den Wirtsfaktoren der ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Komplexe und regulieren so die Freisetzung der Partikel (Raiborg und Stenmark, 2009). Die ESCRT-Komplexe setzen sich aus Klasse E Vps (*vacuolar protein sorting*) Proteinen zusammen und sind für die Bildung MVBs verantwortlich (Katzmann et al., 2002; Babst, 2005; Raiborg und Stenmark, 2009). Man unterscheidet vier Komplexe (0 bis III), wobei im Fall der viralen Partikelfreisetzung nur ESCRT-I und ESCRT-III von Bedeutung sind. Der Komplex ESCRT-I ist für den selektiven, Ubiquitin-gestützten, vesikulären Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk oder der Plasmamembran verantwortlich. Seine Komponente Tsg101 besitzt eine Bindestelle für Ubiquitin, aber auch für die L-Domäne PT/SAP (Katzmann et al., 2001). Durch die Interaktion mit der PT/SAP, sowie die Übertragung eines Ubiquitinrestes von ubiquitiniertem Gag auf Tsg101 reguliert der ESCRT-I-Komplex den Transport und die Freisetzung der viralen Partikel (Amit et al., 2004; Demirov und Freed, 2004). Wird das Motiv P(T/S)AP inaktiviert, so kommt es zur Bildung unreifer, viraler Partikel, die aber nicht in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Viren mit einem defekten PPxL-Motiv weisen ein Fehlen der Knospung auf, was zu einer reinen Akkumulation von Gag an der Zellmembran führt (Le Blanc et al., 2002; Heidecker et al., 2004). Hemmt man die mit dem Trans-Golgi-Netzwerk assoziierte Ubiquitin-Ligase (hPOSH), so wird der Transport von HIV-Gag zur Zellmembran unterbunden (Alroy et al., 2005). Es zeigt, dass nicht nur die hochkonservierte L-Domäne, sondern auch die Ubiquitinierung des Gag-Proteins entscheidend für den endosomalen Transport ist (Vogt, 2000). Tritt andererseits eine Störung innerhalb der ESCRT-Komplexe auf, so findet man Akkumulationen von Gag ausschließlich an endosomalen Membranen vor. Das Knospen von viralen Partikeln in das Lumen dieser endosomalen Kompartimente kann hier aber nicht beobachtet werden (Katzmann et al., 2002; Goff et al., 2003; von Schwedler et al., 2003). Falls eine Freisetzung viraler Partikel in das Lumen von MVBs stattfindet, so können diese bereits im Lumen reifen. Die meisten reifen jedoch erst nach ihrer Freisetzung in den extrazellulären Raum (Demirov und Freed, 2004). Hierfür ist die virale Protease verantwortlich, welche während der Assemblierung durch die Vorläuferproteine Gag-Pro und Gag-Pro-Pol in die viralen Partikel inkorporiert wird. Die Reifung beruht auf der proteolytischen Spaltung der Vorläuferproteine Gag/Gag-Pro/Gag-Pro-Pol. Dabei

verbleibt das N-terminale Matrixprotein aufgrund seiner kovalenten Bindung über Myristoylreste an der Virushülle. Die seit der Assemblierung miteinander interagierenden Kapsidproteine erfahren durch die Prozessierung eine Konformationsänderung, was letzten Endes zur Ausbildung des viralen Kapsids führt (Abbildung 4; Ganser-Pornillos et al., 2008). Es umschließt die viralen Proteine sowie den Ribonukleoproteinkomplex, der sich während der Prozessierung von Gag verdichtet. Durch die aus der Prozessierung resultierende Strukturierungsänderung im Inneren des viralen Partikels ist dieses nun in der Lage Zellen zu infizieren (Wang und Barklis, 1993).

1.3 Die HERV-K(HML-2) Familie

Humane endogene Retroviren variieren stark bezüglich ihres erstmaligen Integrationszeitpunktes in das menschliche Genom (Johnson und Coffin, 1999). Vor 35 Millionen Jahren endogenisierten die ersten exogenen Retroviren in die Keimzellen der Vorfahren von Altweltprimaten und *Homo sapiens*. Die meisten der derzeit bekannten HERVs integrierten vor etwa 30 Millionen Jahren und verloren im Laufe der Evolution ihre Replikationskompetenz. Heute exprimieren sie nur noch einzelne Gene oder sind vollständig inaktiv (Löwer et al., 1984; Bieda et al., 2001; Beimforde et al., 2008). Der ständige Erwerb von weiteren HERV-K(HML-2) Elementen durch Reinfektion und deren Endogenisierung während der Evolution resultierte in etwa 91 humanspezifischen proviralen Kopien und 2500 solitären LTRs im menschlichen Genom. Dabei gingen viele der solitären LTR's aus Intra- und Inter-LTR-Rekombinationen hervor (Mager und Patrik, 2003; Macfarlane und Simmonds, 2004; Subramanian et al., 2011). Die Abkürzung HML-2 bezeichnet hierbei eine Untergruppe der HERV-K und steht für *human MMTV-like 2*. Man unterscheidet elf HML-Gruppen, welchen die nahe Verwandtschaft zu MMTV zugrunde liegt (Callahan et al., 1982; Muradrasoli et al., 2006; Subramanian et al., 2011). Durch Analysen des humanen Genoms wurden bis heute 91 Proviren und 944 alleinstehende LTRs der HML-2 Familie identifiziert, von denen etwa 20 Proviren heute noch hochkonserviert vorliegen (Buzdin et al., 2003; Macfarlane und Simmonds, 2004; Beimforde et al., 2008; Subramanian et al., 2011). Jedoch gehen aus keinem dieser Proviren replikationskompetente Partikel hervor. Die Generierung der Konsensussequenz von HERV-K(HML-2) zeigte, dass das Provirus in das Zellgenom integrierte und die daraus resultierenden viralen Proteine zu virusartigen Partikeln assemblierten. Die Bildung von infektiösen Partikeln oder gar eine Reinfektion konnten nicht beobachtet werden (Dewannieux et al., 2006; Lee und Bieniasz, 2007; Kraus et al., 2011).

Die Mitglieder der HERV-K(HML-2) Familie gehören zu den Betaretroviren und lassen sich in zwei Typen (Abbildung 11) unterteilen (Löwer et al., 1993). Typ-2 kodiert für das akzessorische Protein *rec*, das am Kernexport der viralen Vollängen-mRNA beteiligt ist. Somit handelt es sich bei *rec* um ein Analog zum *rev*-Protein von HIV, *rex*-Protein von HTLV und *rem*-Protein von MMTV (Magin et al., 1999; Magin-Lachmann et al., 2001; Mayer et al., 2004; Mertz et al., 2009). Durch alternatives Spleißen des *env*-Transkriptes exprimieren Retroviren vom Typ-1 ein etwa 9kDa großes Onkoprotein, das *np9*-Protein (Armbrüster et al., 2002).

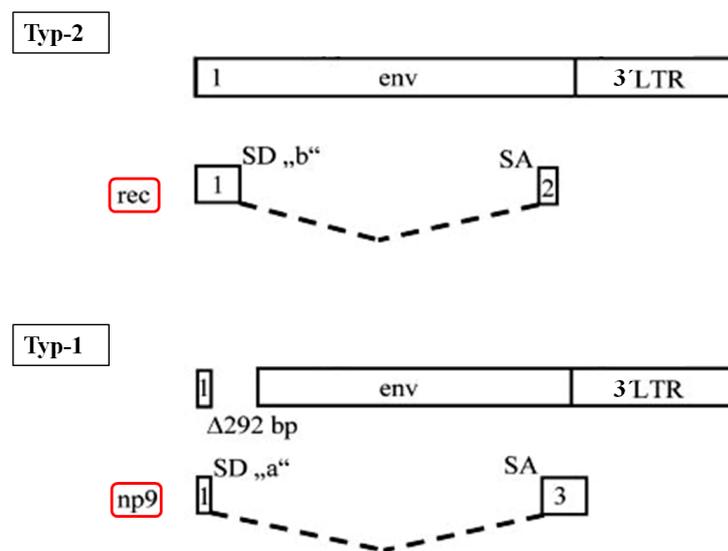


Abbildung 11: Einteilung von HERV-K(HML-2) Retroviren

Schematische Darstellung der aus dem alternativen Spleißen resultierenden Transkripte. Man unterscheidet dabei zwei Typen innerhalb der HERV-K(HML-2) Familie. Typ-2 exprimiert das akzessorische Protein *rec*. Typ-1 exprimiert ausschließlich das Onkoprotein *np9*. *Np9* weist eine 292bp großen Deletion im ersten Leserahmen und eine 56bp lange Überlappung mit der 3'LTR auf. Die Nummern in den jeweiligen Boxen repräsentieren den Leserahmen. SD-Spleißdonor, SA-Spleißakzeptor (Abbildung modifiziert, aus: Bannert und Kurt, 2004)

Die mRNA von *np9* differenziert sich durch eine Deletion von 292 Nucleotiden von der *rec* mRNA. N-Terminal besitzen die Transkripte von *rec* und *np9* eine Homologie von 15 Nucleotiden. C-terminal weist *np9* eine Überlappung von 56 Nucleotiden mit einem dritten Leserahmen im Bereich der 3'-LTR auf (Bannert und Kurth, 2004). Beide Proteine akkumulieren im Zellkern, führen zu Zelltransformationen und können in kanzerogenen Zellen nachgewiesen werden (Armbrüster et al., 2002, 2004; Bannert und Kurth, 2004; Galli et al., 2005; Büscher et al., 2006). Von den derzeit bekannten 75 humanspezifischen Proviren gehören 20 zum Typ-1 und 55 zum Typ-2 (Subramanian et al., 2011).

1.3.1 HERV-K113

Bis vor kurzem vermutete man, dass HERV-K113 vor etwa 150.000 bis 200.000 Jahren in Afrika in das humane Chromosom 19p13.11 integrierte (Turner et al., 2001). Dem lagen fast identische LTRs zugrunde. LTRs sind hochkonservierte Sequenzen, welche das virale Genom flankieren und zum Zeitpunkt der Integration des Provirus identisch sind. Im Laufe der Zeit treten Mutationen und Deletionen auf bis hin zu ganzen Sequenzverlusten. Man geht davon aus, dass alle 200.000 bis 450.000 Jahre ein Basenaustausch in einer LTR stattfindet, was einer Mutationshäufigkeit von $2,3 \times 10^{-9}$ bis 5×10^{-9} pro Jahr entspricht (Johnson und Coffin, 1999). Kürzliche Untersuchungen ließen jedoch auf Rekombinationsereignisse zwischen 3'- und 5'LTR schließen, was den vermuteten Integrationszeitpunkt von vor etwa zwei Millionen Jahren verfälscht. Trotz allem handelt es sich bei HERV-K113 um ein sehr junges Provirus, das durch die Populationsverteilung nord- und ostwärts gestreut wurde. Dem liegt die Trennung des *Homo sapiens* vom Schimpansen vor etwa fünf bis sechs Millionen Jahren zugrunde. Man fand jedoch heraus, dass sowohl vor als auch nach der Trennung der beiden Linien etwa gleich viele Endogenisierungen von exogenen Retroviren stattfanden (Belshaw et al., 2005).

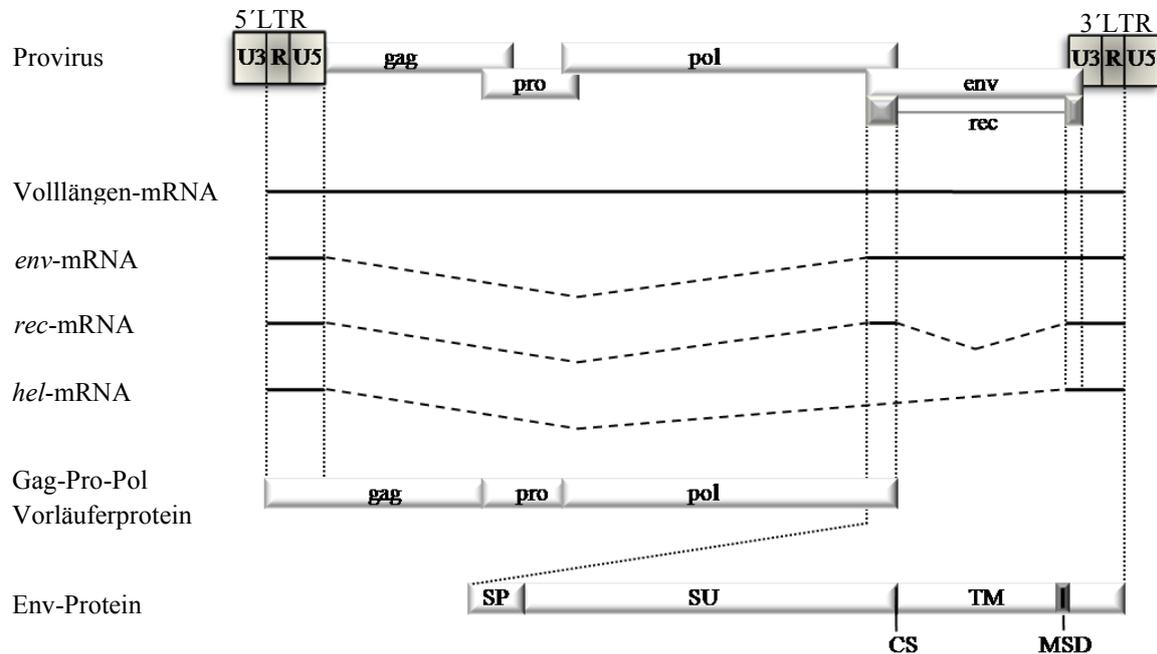


Abbildung 12: Provirus und Transkripte von HERV-K113

Das Provirus von HERV-K113 besitzt offene Leserahmen für *gag*, *pro*, *pol* sowie *env* und wird durch eine 5' und 3'LTR terminiert. Aus der Transkription des Provirus resultiert eine Vollängen-mRNA, aus der durch alternatives Spleißen die *env*-, *rec*- und *hel*-mRNA hervorgeht. Die Translation der Vollängen-mRNA führt zur Expression der Vorläuferproteine Gag, Gag-Pro oder Gag-Pro-Pol. Das Env-Protein setzt sich aus dem N-terminalen Signalpeptid (SP), dem Oberflächenprotein (SU) und Transmembranprotein (TM) mit der membrandurchspannenden Domäne (MSD) zusammen. Zwischen Oberflächenprotein und Transmembranprotein befindet sich eine Schnittstelle (CS) für die proteolytische Spaltung.

Das Betaretrovirus HERV-K113 (Abbildung 12) besitzt als einziges Provirus der HERV-K(HML-2) Familie offene Leserahmen für alle Gene. Das Provirus mit einer Länge von 8.9kb wird durch eine 5'- und 3'LTR terminiert (Turner et al., 2001). Diese unterscheiden sich in nur drei Positionen, hervorgerufen durch postinsertionelle Substitutionen. Im Gegensatz zur 3'LTR weist die 5'LTR eine höhere Promotoraktivität auf. Man geht davon aus, dass es sich hierbei um die ursprünglich integrierte Sequenz handelt, da sie sich nicht von der durch Dewannieux veröffentlichten Konsensussequenz unterscheidet (Dewannieux et al., 2006; Beimforde et al., 2008). Das virale Genom von HERV-K113 (Abbildung 12) besitzt, wie bereits im Abschnitt 1.2.2 beschrieben, den typischen retroviralen Aufbau *5'-gag-pro-pol-env-3'* (Bannert und Kurth, 2004; Beimforde et al., 2008; Hanke et al., 2009).



Abbildung 13: Gag-Vorläuferprotein von HERV-K113

Gag setzt sich aus dem Matrixprotein (MA), Spacer-Peptid (SP1), p15-Protein, Kapsidprotein (CA), Nukleokapsidprotein (NC) und zwei Glutamin- und Prolin-reichen Peptide (QP1 und QP2) zusammen.

Die *gag*-Sequenz kodiert für das Vorläuferprotein Gag (Abbildung 13) und beinhaltet die grundlegenden retroviralen Strukturproteine, Matrixprotein (MA, 15kDa), Kapsidprotein (CA, 27kDa) und Nukleokapsidprotein (NC, 10kDa). Zudem befindet sich zwischen Matrix- und Kapsidprotein ein Spacer-Peptid (SP1, 14AS) gefolgt von einem 15kDa großen Protein (p15), dessen Funktion unbekannt ist. Auch wurden im Rahmen dieser Arbeit und der von Maja George zwei weitere, kleine, C-terminale, Prolin- und Glutamin-reiche Peptide (QP1 und QP2) entdeckt. QP1 umfasst eine Länge von 23 Aminosäuren, QP2 ist mit 19 Aminosäuren etwas kleiner (George et al., 2011). Kürzliche Untersuchungen zeigten zudem, dass die Schnittstellen innerhalb des Vorläuferproteins Gag bei allen HERV-K-Viren hoch konserviert vorliegen (Kraus et al., 2011).

C-Terminal von *gag* befindet sich das *pro*-Gen, welches mit Gag überlappt, einen Frameshift von -1 aufweist und für die virale Protease kodiert. Am 3'-Ende überlappt *pro* mit *pol*, wiederum mit einem Frameshift von -1. *Pol* trägt die genetischen Informationen für die Reverse Transkriptase, RNaseH und die Integrase. Die Überschneidung der Leserahmen von *pol* und *env* zieht ebenfalls eine Überschneidung des Leserahmens von

rec mit sich (Bannert und Kurth, 2004). Der Frameshift zwischen *pol* und *env* beträgt +1. *Rec* und *env* verlaufen hingegen im gleichen Leseraster. *Env* kodiert für das virale, glykosilierte Hüllprotein (75 bis 95kDa), welches aus einer einfach gespleißten mRNA hervorgeht. Es setzt sich aus dem N-terminalen Signalpeptid (SP), dem Oberflächenglykoprotein (SU) und dem Transmembranprotein (TM) mit seiner 20 Aminosäuren großen membrandurchspannenden Domäne (MSD) zusammen (Hanke et al., 2009). Am 3'-Ende überlappt der Leserahmen von *env* mit der 3'LTR. *Rec*, hervorgehend aus einer doppelt gespleißten viralen Vollängen-mRNA, setzt sich aus Sequenzabschnitten des *env*-Gens zusammen. Die Präsenz des akzessorischen Proteins *Rec* verweist darauf, dass HERV-K113 ein Typ-2 Element ist (Löwer et al., 1984). Aus dem alternativen Spleißen der Vollängen-mRNA resultiert zudem das 1,5kb große *hel*-Transkript (Abbildung 12). Seine Funktion ist aber noch unbekannt (Bannert und Kurth, 2004; Beimforde et al., 2008).

1.3.2 Rekonstruktion der ursprünglichen HERV-K113 Sequenz

Das Provirus von HERV-K113 ist nicht in der Lage replikationskompetente, virale Partikel zu bilden. Zudem ist die Expression der viralen Proteine sehr gering, was deren Nachweis erschwert (Boller et al., 2008). Dem liegen sowohl seltene Codons als auch postinsertionelle Veränderungen, wie Deletionen oder Substitutionen, in der Nukleotidsequenz zugrunde, die schrittweise zur Inaktivierung des Provirus führten (Hanke et al., 2009; Heslin et al., 2009). Das wird besonders gut deutlich am Beispiel des Hüllproteins von HERV-K113. Durch die Aufhebung von acht Mutationen (Abbildung 14) und die Codonoptimierung der *env*-Sequenz von HERV-K113 konnte bereits die Expressionsrate, der Einbau in virale Partikel und die Infektionseffizienz des Hüllproteins drastisch gesteigert werden. Jedoch ging aus weiteren Versuchen hervor, dass ausschließlich zwei der acht Mutationen entscheidend für die Infektiosität sind. Dabei handelt es sich zum einen um die Mutation C140R in der Sequenz des Oberflächenglykoproteins und zum anderen um die Mutation C577R in der Sequenz des Transmembranproteins. Zwei weitere Mutationen (N506K und T626P) im Transmembranprotein verringern hingegen die Infektiosität nur geringfügig (Hanke et al., 2009). Ein weiteres Beispiel ist die Reverse Transkriptase (RT) von HERV-K113. Im Vergleich zu der sehr schwachen RT-Aktivität von HERV-K113 weist HERV-K10.1 eine starke RT-Aktivität auf (Berkhout et al., 1999). Ein Austausch von sechs Aminosäuren, homolog zur Sequenz von HERV-K10.1, resultierte in einem starken Anstieg der RT-

Aktivität von HERV-K113 (Beimforde et al., 2008). Neben postinsertionellen Veränderungen können Mutationen auch während der reversen Transkription entstehen und somit vor der Integration in das Wirtsgenom. Dies beruht auf der fehlenden Fähigkeit der Reversen Transkriptase ihre Lesegenauigkeit zu prüfen (*proof reading function*). Daraus resultiert eine Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsch gepaarten Basen innerhalb der proviralen DNA vor der Endogenisierung (Modrow et al., 2009).

Für die Rekonstruktion der Wildtypsequenz (Abbildung 14) wurde die Aminosäuresequenz des Wildtyp HERV-K113 (AY037928) mit zehn weiteren hochkonservierten, humanen HERV-K(HML-2) Sequenzen verglichen. Dabei handelte es sich um HERV-K101 (AF164609), HERV-K102 (AF164610), HERV-K104 (AC116309), HERV-K107 (AF164613), HERV-K108 (AC072054), HERV-K109 (AC055116), HERV-K115 (AY037929), Y178333, AP000776 und AC025420. Deren Vergleich bezüglich der Aminosäuresequenz von Gag, Pro, Pol und Env wurde den Veröffentlichungen von George beziehungsweise Hanke und Kollegen entnommen (Hanke et al., 2009; George et al., 2011). Es wurde zwischen natürlichen Polymorphismen und eigentlichen postinsertionellen Mutationen unterschieden. Hierbei galt, wenn keine oder nur eine der Sequenzen die gleiche Aminosäure an der gleichen Position aufweist wie bei der HERV-K113 Sequenz, so handelt es sich um einen postinsertionellen Austausch. Stimmen zwei oder mehr HERV-Ks in den Aminosäuren einer Position überein, auch wenn sie sich von der Konsensussequenz unterscheidet, so spricht man von einem natürlichen Polymorphismus. Insgesamt konnten fünf vermeintlich postinsertionelle Substitutionen im Gag-Protein, weitere drei in der Protease-Sequenz, sowie jeweils acht im *pol*- und im *env*-Leserahmen identifiziert werden (Hanke et al., 2009; George et al., 2011). Durch die Rückmutationen (Abbildung14) wurde so die vermutete Wildtypsequenz von HERV-K113 (oriHERV-K113) wiederhergestellt. Sowohl der Sequenzvergleich als auch die Rückmutationen wurden im Rahmen der Doktorarbeiten von Nadine Beimforde und Kirsten Hanke am Robert Koch-Institut durchgeführt (Hanke et al., 2009; George et al., 2011).

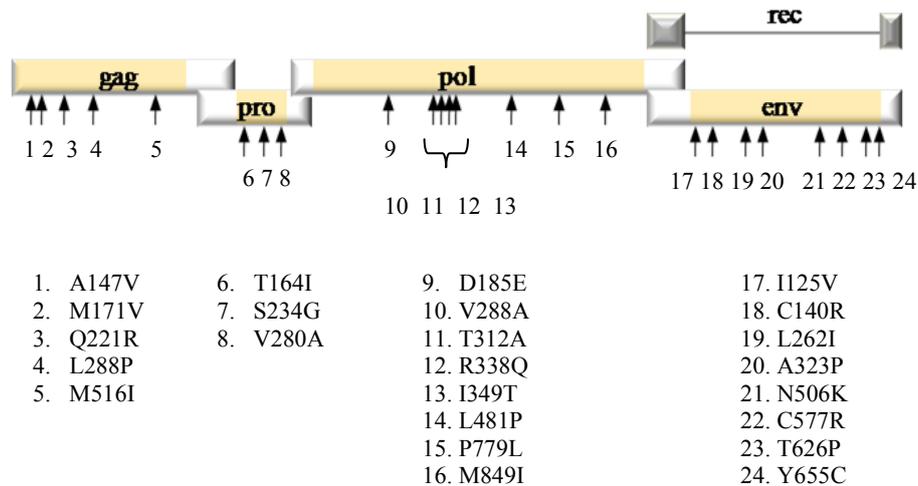


Abbildung 14: Aminosäureaustausche bei HERV-K113

Es erfolgten 24 Aminosäureaustausche zur Herstellung der Ursprungssequenz, davon fünf in *gag*, drei in *pro*, sowie je acht in *pol* und *env*. In orange sind die codonoptimierten Bereiche dargestellt.

Um die Expression der virale Proteine zu verstärken, wurde die Sequenz von oriHERV-K113 in den nicht überlappenden Bereichen der einzelnen Leserahmen für Säugerzellen codonoptimiert. Dies wurde von der Firma GeneArt durchgeführt (Regensburg, Germany). Bereiche mit einer Leserahmenverschiebung als auch die Slippery-Sequenzen wurden in ihrer nativen Form belassen, um eine optimale Expression der viralen Proteine als auch der Vorläuferproteine, wie Gag-Pro oder Gag-Pro-Pol, zu gewährleisten. Die codonoptimierte, originale Sequenz von HERV-K113 (oricoHERV-K113) wurde in den Vektor pcDNA3 kloniert und N-Terminal anstelle der 5'LTR mit dem früh exprimierenden Promotor des Cytomegalovirus (CMV_{ie}) versehen. Am 3'-Ende wird das Konstrukt CMVoricoHERV-K113 von der 3'LTR terminiert. CMVoricoHERV-K113 bildet die Grundlage dieser Arbeit und zeichnet sich durch eine verstärkte Expression der viralen Proteine aus, was für einige Gene bereits publiziert wurde (Hanke et al., 2009; George et al., 2011).

1.4 Zielsetzung

Die späte Phase der HERV-K113 Replikation weist noch zahlreiche offene Fragen auf. Bisher war eine genaue Untersuchung der Kinetik des intrazellulären Transports und der Bildung viraler, reifer Partikel aufgrund der geringen Expressionsrate der viralen Proteine nicht möglich. Die Rekonstitution einer möglichen Wildtypsequenz durch Rückmutationen und eine Kodonoptimierung verstärkte die Expression der viralen Proteine und somit die Freisetzung viraler Partikel.

Basierend auf dieser viralen Wildtypsequenz sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit Fluoreszenzkonstrukte des Polystrukturproteins Gag und des Hüllproteins Env kloniert werden, um die späte Replikationsphase von HERV-K113 licht- als auch elektronenmikroskopisch näher zu untersuchen. Vorab gilt es jedoch die fluoreszenzmarkierten, viralen Proteine auf ihr natürliches intrazelluläres Verteilungsmuster und ihre Fähigkeit zur Partikelassemblierung zu prüfen. Erweisen sich beide Proteine in diesen Punkten als funktionell, so können weitere Untersuchungen bezüglich des intrazellulären Transportes nach Expression vorgenommen werden. Dabei gilt es im genaueren den Einfluss des endosomalen Stoffwechselweges zu klären. Bereits bei anderen komplexen Retroviren wurde endosomalen Kompartimenten eine entscheidende Rolle beim intrazellulären Transport und der Assemblierung, sowie der Freisetzung viraler Partikel zugewiesen. Zudem ist für komplexe Retroviren sowohl die intrazelluläre (A/B-Typ) als auch die Assemblierung an der Plasmamembran (C-Typ) beschrieben. Welchen Assemblierungstyp die rekonstituierte, mögliche Wildtypsequenz von HERV-K113 aufweist, ist ebenfalls noch nicht untersucht und soll mittels elektronenmikroskopischen Verfahren geklärt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellt die Generierung von zweifach fluoreszenzmarkierten, viralen HERV-K113 Partikeln dar, die für spätere Infektionsstudien genutzt werden können. Es setzt jedoch die Reifung der fluoreszenzmarkierten, viralen Proteine als auch den verstärkten Einbau des Hüllproteins Env voraus. Bislang wurde Env nur in geringem Maße in virale Partikel inkorporiert.

Während der Untersuchung zum Fluoreszenzprotein-markierten Gag wurde die Existenz der Peptide QP1 und QP2 am C-Terminus des Vorläuferproteins aufgedeckt (George et al., 2011). Die Klärung, ob diesen Peptiden eine Funktion in der späten Phase der HERV-K113 Replikation zukommt, stellte einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Agarose- Gelelektrophorese-System Sub-Cell GT	Biorad, Hercules, USA
Alphaimager 2200 MultiImage Light Cabinet	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
CO ₂ -Inkubator C200 für eukaryotische Zellen	Labortec, Göttingen, Deutschland
Diamantmesser Ultra 45°	Diatome AG, Biel, Schweiz
Digital Grafic Printer UP-D895	Sony Electronics Inc., Park Ridge, USA
Einbettautomat Leica EM TP	Leica Microsystems, Wetzlar,
Deutschland Elektroporationsgerät Gene Pulser XCell	Biorad, Hercules, USA
Feinwaage TE	Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Filmentwicklungermaschine Agfa Curix 60	Agfa – Gevaert, Mortsels, Belgien
Horizontalschüttler GFL 3016	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Kritischerpunkttrockner Blazers CPD 030	BAL-TEC AG, Blazers, Lichtenberg
Magnetrührer IKA RTC	IKA Labortechnik GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Osterod, Deutschland
Metallpetrischale Attofuor® Cell Chamber	Invirogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mikrofuge 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Mini-Protean 3 Electrophoresis	Biorad, Hercules, USA
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	NanoDrop, Wilmington, USA
pH-Meter 744	Metrohm AG, Herisau, Schweiz
Photometer UV-1202	Shimadzu, Duisburg Deutschland
Pipetus ®	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg, Deutschland
Power Pac HC	Biorad, Hercules, USA
Schüttler Certomat K/MO	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
SEM Coating Unit E5100	Polaron Equipment Ltd, Hertfordshire, England
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tischzentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland

Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Biorad, Hercules, USA
Transilluminator UV-Licht (254 + 312nm)	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Trimmer EM Rapid	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Ultramikrotom Ultracut S	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Ultramikrotom Ultracut UCT	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima-L100K	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Ultrazentrifugenrotor SW32Ti	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Deutschland
Vakuumbedampfer EMITECH K950X	Quorum Technologies, Ashford, England
Vortex Mixer	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad HB4 Basic	IKA Labortechnik GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Zellzähler Coulter-Counter Z2	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland

Tabelle 2: Mikroskope

Mikroskope	Hersteller
Axiophot	Carl Zeiss AG, Jena Deutschland
Kamera Colorview III	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Jena Deutschland
Kamera XM10	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Jena Deutschland
cLSM 510 META	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
cLSM 780	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Stativ Observer.Z1	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Durchlichtbeleuchtung HAL 100	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Auflichtbeleuchtung HXP 120 C	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Inkubator	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Petrischalenhalter, beheizter	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Heizeinheit TempModul S	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
CO ₂ -Einheit CO ₂ Modul S1	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Definite Focus System	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Live Cell Imager Eclipse TE2000-E	Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland

Cascade II 512 -16bit - EMCCD Kamera	Photometrics, Tucson, USA
Inkubationskammer – klein	Prior Scientific Instruments GmbH, Jena, Deutschland
Inkubationskammer – groß	Solent Scientific Ltd, Segensworth, England
Lambda DG-4 (Xenon) Lampe	Sutter Instruments Company, Novato, USA
Perfect Focus System	Prior Scientific Instruments GmbH, Jena, Deutschland
Piezo – motorisierter Tisch	Prior Scientific Instruments GmbH, Jena, Deutschland
TIRF 3–System	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Stativ Observer.Z1	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Durchlichtbeleuchtung HAL 100	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Aufflichtbeleuchtung HXP 120 C	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Inkubator	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Lasersicherheitssystem	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Heizeinheit TempModul S	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
CO ₂ -Einheit CO ₂ Modul S1	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
CCD-Kamera AxioCam	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop Tecnai 12	FEI Company, Hillsboro, USA
CCD-Kamera MegaView II	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop Leo Gemini 1530	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
In-lense Sekundärelektronen-Detektor	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Rückstreuelektronen-Detektor	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

2.1.2 Software

Tabelle 3: Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop® CS4	Adobe Systems Inc., San José, USA
Adobe Illustrator	Adobe Systems Inc., San José, USA
Alpha Imager 2200	Cell Biosciences Inc., Santa Clara, USA
Autoscreenrecorder	Wisdom Software Inc., Victoria, Canada
AxioVision 4	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
CellF	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
CorelDRAW Graphics Suite 12	Coral Corporation, Unterschleißheim, Deutschland
DNASTAR Lasergene 8	GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland

Inspect3D 2.0 (Xplore3D Software suite)	FEI Company, Hillsboro, USA
iTEM	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland
ITK-SNAP	Penn Image Computing and Science Laboratory (PICS), Pennsylvania, USA
LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
LSM Image Browser	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
MBF Image J	National Institute of Mental Health, Bethesda, USA
Nanodrop ND-1000 v3.3	Molecular Dynamics/ Amersham Bioscience Nanodrop, Wilmington, USA
NIS Elements 2.3 + Tracking Modul	Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland
ZEN 2010b	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
ZEN 2009 Light Edition	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

2.1.3 Labormaterialien

Tabelle 4: Labormaterialien

Materialien	Hersteller
Blottembran Roti® PVDF – Membran, 0.45µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Blottpapier, extradick	Biorad, Hercules, USA
Deckgläschen, Ø25mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Diamantmesser Ultra 45°	Diatome AG, Biel, Schweiz
Einbettungsmatte aus Silikon	SPI Supplies/ Structure Probe, Inc., West Chester, USA
Einwegspritzen, steril, 20ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Elektroporationsküvetten, 2mm	Biorad, Hercules, USA
Falkon Tubes, steril, 15ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Falkon Tubes, steril, 50ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Film 18x24cm, Kodak Medical X-ray	Carestream Health Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland
Filmkassette, Kodak X-Ray	Carestream Health Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland
Filterpapier, Ø 90 cm	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland
Freezing container, Nalgene® Mr. Frosty	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Gelatinekapseln Gr.3	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Glasperlen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Gridbox für 100 Grids	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kohlegarn 3,5m	BALTIC preparation, Koppelheck, Deutschland
Kryoobjektträgerkasten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kryoröhrchen, 2ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Kupfergrids, Cu 200mesh	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kupfergrids, Cu 2x1 Slot	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leit-Tabs, 12mm	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Metallpetrischale, Attofuor® Cell Chamber	Invirogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nickelgrids, Ni 300 Hexa	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektträger mit Mattrand	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten, Einweg	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm, Größe S und M	Pechiney Plastic Packing, Chicago, USA
PCR -Tubes 200µl, Softstrips	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Petrischalen, steril, 0.4cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Petrischalen, steril, 10cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Präzisionswischtücher KIMTECH Science	Kimberly-Clark Professional, Koblenz, Deutschland
Serologische Pipetten, Einweg	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Sterilfilter, Porengröße 0.45µm	Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Stiftprobenteller, Ø 12,5mm, Stift: 6mm (Aluminium Stub Short Pin, 0.5Inch)	Agar Scientific Ltd., Stansted, England
Zellkulturflaschen, steril, 75cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten, steril, 6/12-Well	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber, 24cm	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugentube, konischer Boden	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifugentube Thinwall Ultra-Clear	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
µDish Grid500 ^{High}	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
µSlide 18-Well mit PEN-Membranboden	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland

2.1.4 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acrylatkleber Roti®coll 1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Agarose, low melting point	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS), 10%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bleizitrat	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Complet-Protaseinhibitor Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Deutschland
DABCO 33480	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Mix, 100mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Entwicklerlösung A/B	AGFA HealthCare NV, Mortsel, Belgien
Epon – Epoxidharz (Glycil-ether 100, DMP-30, DDSA, MNA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolut	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-400	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fixierlösung Rapid	AGFA HealthCare NV, Mortsel, Belgien
Gelatine (Cold Water Fish Gelatine)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Glutaraldehyd, 25%	TAAB Laboratories, Berkshire, England
Glycerin, 86%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin, 100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen aus Kälberhaut	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Laemmli –Probenpuffer, 2x	BioRad, Hercules, USA
Laufpuffer, 10x	BioRad, Hercules, USA
L-Glutamin, 200mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lowicryl [®] HM20 (Crosslinker, Monomer, Initiator)	Polyscience Ltd., Eppelheim, Deutschland
Magermilchpulver, Sucofin	TSI GmbH & Co.KG, Zeven, Deutschland

Methanol, 100%	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Natriumazid, 3x	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 10%	BioRad, Hercules, USA
Natriumhydroxid, Plätzchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Normal-Ziegenserum (NGS)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad, Hercules, USA
Orange-G	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Osmiumtetroxid, 99.9%	Koch-Light-Laboratories Ltd., Colnbrook, England
Paraformaldehyd, Pulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptavidin, 100x	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pioloform	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Propylenoxid, 100%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA), Fraction V, 96%	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Sucrose (D+)Saccharose)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Tanninsäure	Mallinckrodt Chemical Inc., St. Louis, USA
Toluidinblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Transferpuffer, 10x	BioRad, Hercules, USA
Tris-HCL 0.5M	BioRad, Hercules, USA
Tris-HCL 1,5M	BioRad, Hercules, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trolox	Calbiochem/Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin (0.25%)/EDTA (0.2%)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat - Dihydrat	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6: Enzyme

Enzyme	Hersteller
<u>Restriktionsendonukleasen:</u>	
BamH I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Bgl II	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Dpn I (10U/μl)	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
EcoR I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Kpn I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Not I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Sac I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Sal I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Xba I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Xho I	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
<u>Weitere Enzyme:</u>	
CIP- alkalische Posphatase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Red-Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Pfu-Turbo-Polymerase (2,5U/μl)	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA

Tabelle 7: Größenstandards

Größenstandards	Hersteller
Gene Ruler 1kb Ladder Plus	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.5 Antikörper und Vitalfarbstoffe

Tabelle 8: Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
Anti-Alpha-Tubulin Monoclonal Antibody (Kaninchen)	Epitomics Inc., Burlingame, USA
Anti-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV K) capsid protein IgG (Maus)	Austral Biologicals, San Ramon, USA
Anti-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV K) envelop protein IgG (Maus)	Austral Biologicals, San Ramon, USA
Living Colors® DsRed Polyclonal Antibody (Kaninchen)	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA

Rattenserum anti-CA Protein HERV-K113	Immunisierung und Aufreinigung Dr. Hohn, FG18, RKI; George et al., 2011
Rattenserum anti-p15 Protein HERV-K113	Immunisierung und Aufreinigung Dr. Hohn, FG18, RKI; George et al., 2011
Ziege anti-GFP	Rockland Immunochemicals for Research, Gilbertsville, USA

Tabelle 9: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
<u>Fluoreszenzmikroskopie:</u>	
AlexaFluor488 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
AlexaFluor647 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
AlexaFluor488 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
AlexaFluor568 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
AlexaFluor647 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
AlexaFluor488 Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<u>Western Blot:</u>	
Esel anti-Ziege IgG HRP	DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Kaninchen HRP	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ziege anti-Mause HRP	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ziege anti-Ratte HRP	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
<u>Elektronenmikroskopie:</u>	
Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L), 10nm Au	BBInternational, Cardiff, England
Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L), 5nm Au	BBInternational, Cardiff, England
Ziege anti-Ratte IgG (H+L), 5nm Au	BBInternational, Cardiff, England

Tabelle 10: Vitalfarbstoffe

Vitalfarbstoffe	Hersteller
ER Tracker® Red	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LysoTracker® Red DND-99	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TC-FIAsH II Detection Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Vybrant® DiO cell-labeling solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Puffer und Nährmedien

Tabelle 11: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer, 6x	10mM Tris-Acetat, 50mM EDTA, 10% Ficoll-400(w/v), 0.4% Orange-G (w/v) in Aqua dest.
HEPES Buffer Saline (HBS), 0.05M	280mM Natriumchlorid, 50mM HEPES (pH 7.1), 1.5mM Na ₂ HPO ₄
HEPES Buffer Saline (HBS), 2x	280mM Natriumchlorid, 50mM HEPES (pH 7.1), 1.5mM Na ₂ HPO ₄
Immuno-EM Blockpuffer	PBS, 0,5% BSA, 0,1% Gelatine, 0,1% Natriumazid
Milchpulverpuffer	5% (w/v) Magermilchpulver, 0,1% Tween20 in PBS
Phosphate Buffer Saline (PBS)	123mM Natriumchlorid, 2.7mM Kaliumchlorid, 10mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 2mM Kalium-Di-Hydrogenphosphat; pH 7.0
TAE, 1x	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA; pH 7.2
TE, 1x	10mM Tris/HCl, 1mM EDTA; pH 8.0
Zellysispuffer	1% Triton X-100, 20mM Tris (pH 7.7), 150mM Natriumchlorid

Der Lysispuffer wurde mit Complett-Proteaseinhibitor-Tabletten nach Herstellerangaben komplementiert.

Tabelle 12: Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
D-MEM - Dulbeccos modifiziertes Egel Medium	Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einfriermedium für eukaryotische Zellen	90% FKS, 10% DMSO
LB-Agar	LB-Medium mit 20g/l Agar
LB-Medium	1% Bacto-Hefe-Extrakt, 1% NaCl in Aqua dest.; pH 7.0
Opti-MEM I Reduced Serum Medium - ohne Phenolrot	Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SOB-Medium	20g Bacto-Tryptone, 5g Bacto-Hefe-Extrakt, 0.186g KCl, 0.584g NaCl in 970ml Aqua dest.; pH 7.0
SOC-Medium	9.7 Teile SOB-Medium, 0.1 Teile Mg-Mix, 0.2 Teile Glukose
2x TY-Agar	2xTY-Medium mit 20g/l Agar
2x TY-Medium	1% Bacto-Trypton, 1% Bacto-Hefe-Extrakt, 0.5% Natriumchlorid; pH 7.0

LB-Medium oder LB-Agar wurde mit Ampicillin (100µg/ml) oder Kanamycin (35mg/ml) versetzt. D-MEM wurde vor dem Gebrauch für die Zellkultur mit 10% FKS, 2mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100µg/ml Steptomycin vervollständigt. Opti-MEM wurde vor dem Gebrauch mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100µg/ml Steptomycin und 100µM Trolox (Scheenen et al., 1996) komplementiert.

2.1.7 Kits

Tabelle 13: Kits

Kit	Hersteller
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Solution	GE Helthcare, Buckinghamshire, UK
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Foster City, USA
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PolyFect Transfektionsreagenz	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep® Spin MiniPrep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, Kanada

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 14: Adhärente, humane Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen
HeLaSS6	Humane Epithelzellen des Zervixkarzinoms
HUH-7	Humane hepatozelluläre Karzinomzellen

2.1.9 Leervektoren

Tabelle 15: Leervektoren

Bezeichnung (Größe)	Resistenz	Bezugsquelle
pcDNA3 (5.4kb)	Ampicillin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pUC19 (2.7kb)	Ampicillin	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
pmCherry-N1 (4.7kb)	Kanamycin	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA
pEGFP-N1 (4.7kb)	Kanamycin	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA

2.1.10 Konstrukte

Tabelle 16: Konstrukte

Konstrukt	Vektor	Bezugsquelle
<u>Retroviral (HERV-K113):</u>		
CMV _{orico} HERV-K113	pcDNA3	Nadine Beimforde, FG18, n.p.
CMV _{orico} HERV-K113_ΔQP	pcDNA3	Anja Zimmermann, FG18, n.p.
oricoEnv_TC	pcDNA3	Anja Zimmermann, FG18, n. p.
oricoEnv_V5	pcDNA3	Hanke et al., 2009
oricoGag_ΔQP	pcDNA3	Anja Zimmermann, FG18, n.p.
oricoGagCherry	pmCherry-N1	Anja Zimmermann, FG18, n.p.
oricoGagCherry_ΔQP	pmCherry-N1	Anja Zimmermann, FG18, n.p.
oricoGagEGFP	pEGFP-N1	Anja Zimmermann, FG18, n.p.
oricoGagHERV-K113	pcDNA3	Bachtijor Asomuddinov, FG18, n.p.
ProteaseMutanteHERV-K113	pcDNA3	Claudia Chudak, George et al., 2011
		n.p. - nicht publiziert
<u>Zellulär:</u>		
DsRed-rab11wt	pDsRed-C1	Brune et al., n.p.; addgene Sherer et al., 2003
EGFP-rab7wt	pEGFP-C1	Brune et al., n.p.; addgene Sherer et al., 2003
Lamp1-RFP	pRFP-N1	Brune et al., n.p.; addgene Sherer et al., 2003
YFP-Tubulin	pYFP-C1	Dr. Larissa Kolesnikova, n.p.

2.1.11 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden *Escherichia coli*, *E. coli*, „One Shot Top10“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

2.1.12 Primer (Oligonukleotide)

Alle verwendeten Primer (Anhang: Tabelle 26-28) wurden durch die Firma Invitrogen GmbH (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert und lyophilisiert. Vor Gebrauch wurden die Primer in Aqua dest. auf eine Konzentration von 10µM verdünnt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Analytik

2.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Bei den verwendeten Primern (Anhang: Tabelle 26-28) wurde darauf geachtet, dass diese keine internen Haarnadelschleifen oder andere Sekundärstrukturen, sowie keine Homodimere mit sich selbst oder Heterodimere mit dem zweiten Primer, bildeten. Zudem wiesen die Standard-Primer eine Länge von 18 bis 24 Nukleotiden, einen ausgeglichenen AT/GC-Gehalt und eine Schmelztemperatur (T_M) von 55°C bis 65°C auf. Dabei unterschied sich die Schmelztemperatur zweier Primer um maximal 5°C. Sie variierte durch die unterschiedliche Nukleotidzusammensetzung und wurde wie folgt berechnet:

$$T_M = (AT \times 2) + (GC \times 4) - 5$$

Verwendeter Standardansatz:

100ng Template-DNA
 5µl 10x Polymerase-Puffer
 1µl 25x dNTP-Mix
 1µl Forward-Primer (10µM)
 1µl Reverse-Primer (10µM)
 1µl Pfu-Turbo-Polymerase (2,5U/µl)
 add. 50µl Aqua dest.

PCR-Bedingungen:

95°C, 2min	(Initiale Denaturierung)	} 35x
95°C, 30s	(Denaturierung)	
60°C, 30s	(Primer-Annealing)	
72°C, 1min/kb	(Elongation)	
72°C, 10min	(Finale Elongation)	
4°C, ∞	(Lagerung)	

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Tabelle 13) nach Herstellerangaben. Dabei wurden DNA-Fragmente zwischen 100 und 10.000 Basenpaaren (bp) bei einem pH-Wert von ≤ 7.5 und hohen Salzkonzentrationen an

eine Silikatgelmembran gebunden, durch Waschschr itte gereinigt und in 30µl Aqua dest. eluiert.

2.2.1.2 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR (QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit) ermöglicht den Austausch, das Hinzufügen oder Entfernen einzelner bis hin zu mehrerer Basenpaare. Hierfür wurden Primer (Anhang: Tabelle 27-28) verwendet, welche die zu verändernden Basen im Zentrum der Primersequenz beinhalten. C- und N-terminal dieses Bereiches befinden sich je mindestens 15 Basen, homolog zur DNA-Sequenz. Somit konnte eine gute Primerbindung sichergestellt werden. Die Schmelztemperatur der Primer sollte nach Herstellerangaben mindestens 75°C aufweisen.

Berechnung der Schmelztemperatur T_M :

$$T_M = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

GC-Gehalt = Anteil an Guanin und Cytosin der Primersequenz; optimal $\geq 40\%$

N = Primergesamtlnge

Mutagenese-Ansatz:

100ng	Template-DNA
5µl	10x Polymerase-Puffer
1µl	25x dNTP-Mix
1µl	Forward-Primer (10µM)
1µl	Reverse-Primer (10µM)
1µl	Pfu-Turbo-Polymerase (2,5U/µl)
add. 50µl Aqua dest.	

Mutagenese-Bedingungen:

95°C, 1min	(Initiale Denaturierung)	} 18x
95°C, 1min	(Denaturierung)	
60°C, 1min	(Primer-Annealing)	
68°C, 2min/kb	(Elongation)	
68°C, 10min	(Finale Elongation)	
4°C, ∞	(Lagerung)	

Mit Hilfe der Pfu-Turbo-Polymerase wurde das komplette Plasmid amplifiziert und anschließend der methylierte Ursprungsvektor mit zehn Einheiten DpnI für eine Stunde bei 37°C verdaut. DpnI erkennt die einst in Bakterien vermehrte, methylierte und hemimethylierte, parentale DNA. Neu synthetisierte, nicht methylierte DNA wird von DpnI nicht verdaut und bleibt erhalten. 1-2µl des Mutagenese-Ansatzes wurden anschließend in elektrokompente *E. coli* „One Shot Top10“ transformiert (Abschnitt 2.2.1.8).

2.2.1.3 Ligation

Das Einfügen von DNA-Fragmenten, Inserts, in Vektoren wird als Ligation bezeichnet. Hierbei werden 3'-Hydroxid-Gruppen mit 5'-Phosphatresten freier DNA-Enden durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft. Dafür müssen Vektor und Insert in linearisierter Form vorliegen und komplementäre Enden aufweisen.

Vektor und Insert wurden vorab mittels Restriktionsendonukleasen spezifisch verdaut (Abschnitt 2.2.1.4). Um eine spontane Verknüpfung von kompatiblen freien DNA-Enden zu verhindern, mussten diese für eine Stunde bei 37°C mit der alkalischen Phosphatase CIP dephosphoryliert werden. Die Ligation erfolgte im Anschluss durch die Verknüpfung freier DNA-Enden mittels T4-DNA-Ligase und ATP. Die zu verwendende Menge an Insert berechnete sich wie folgt:

$$m_{\text{Insert}} = F \times m_{\text{Vektor}} \times (\text{bp}_{\text{Insert}}/\text{bp}_{\text{Vektor}})$$

m_{Insert} = benötigte Menge an Insert

F = Faktor 5

m_{Vektor} = Menge an Vektor (20ng)

$\text{bp}_{\text{Insert}}$ = Basenpaare des Inserts

$\text{bp}_{\text{Vektor}}$ = Basenpaare des Vektors

Ligationsansatz:

20ng Vektor

m_{Insert} [ng] berechnete Menge an Insert

1µl Ligationspuffer (10x)

0,5µl T4-DNA-Ligase (100U/µl)

add. 10µl Aqua dest.

Der Ligationsansatz wurde für eineinhalb Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1-2µl des Ansatzes in elektrokompetente *E.coli* „One Shot Top10“ transformiert (Abschnitt 2.2.1.8).

2.2.1.4 Restriktion mittels Endonukleasen

Zur Überprüfung von Vektoren und für Klonierungen wurde die DNA mit spezifischen bakteriellen Restriktionsendonukleasen (Tabelle 6) verdaut. Sie erkennen jeweils eine spezifische palindrom-artige Sequenz innerhalb der DNA und erzeugen dort Enden mit 5'-Überhang. Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden für etwa zwei Stunden bei 37°C der DNA zugesetzt. Zur Analyse des Restriktionsverdaus wurden die Ansätze mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1.5) überprüft.

Ansatz - Kontrollverdau: 500ng Plasmid
 1µl Endonukleasen-Puffer
 1µl BSA
 0,5µl Endonuklease 1
 0,5µl Endonuklease 2
 add. 10µl Aqua dest.

2.2.1.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese als Standardmethode dient der Kontrolle, Identifikation und Aufreinigung von Nukleinsäuren nach Größe und Ladung (Sambrook et al., 1989). Das Agarosepulver wurde mit 1x TAE-Puffer (Tabelle 11) zu einer 0.8%-1.5%igen Agaroselösung aufgekocht, je nach Größe der aufzutrennenden DNA. Für diese Arbeit wurden 1%ige Agarosegele verwendet, denen nach dem Gießen im noch warmen Zustand 0.5µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Ethidiumbromid bindet während der Auftrennung im elektrischen Feld an die DNA und ermöglicht so deren Visualisierung unter UV-Licht. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese sechs zu eins mit 6fach DNA-Ladepuffer (Tabelle 11) versetzt und bei einer Spannung von 40-120V in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Der Status der Probenauftrennung konnte mittels Orange-G im DNA-Ladepuffer verfolgt werden. Durch das Mitführen eines Größenstandards, „Gene Ruler 1kb Ladder Plus“ von Fermentas, war eine Größenbestimmung und Zuordnung der Fragmente möglich. Die Dokumentation des Agarosegels erfolgte unter UV-Licht bei

einer Wellenlänge von 302nm mittels „Alphaimager 2200“ und „Digital Grafic Printer UP-D895“.

2.2.1.6 Gelextraktion

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Jede DNA-Fraktion war als Bande mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar. Um mit bestimmte DNA-Fragmenten weiter arbeiten zu können, wurden diese mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Tabelle 13) und einer Mikrofuge nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Gel wurde dabei bei 50°C in einem Lösungs- und Bindepuffer mit pH-Indikator gelöst. Alle weiteren Schritte entsprechen denen der PCR-Aufreinigung (Abschnitt 2.2.1.1).

2.2.1.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* „One Shot Top10“

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden gekaufte *E. coli* „One Shot Top10“ von Invitrogen auf einer 2xTY-Agarplatte (Tabelle 12) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien gepickt und in je 10ml 2xTY-Medium (Tabelle 12) bei 37°C und 250 Umdrehungen pro Minute (Upm) über Nacht angeschüttelt. Je 2,5ml der Über-Nacht-Kultur wurden in vier 2l Schikanekolben mit je 250ml vorgewärmten 2xTY-Medium gegeben und ebenfalls bei 37°C und 250Upm angeschüttelt. Hatten die Kulturen eine optische Dichte von 0.6 bis 0.8 erreicht, wurden je zwei Kulturen vereint und für 15-30min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien in mit 0.1M HCL desinfizierten Zentrifugenbechern bei 4000Upm und 4°C für 20min abzentrifugiert und die Pellets in je 250ml eiskalten 1mM Hepes Puffer resuspendiert. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterienpellets in je 125ml 1mM Hepes Puffer aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Den Waschrufen folgte das Vermischen der Pellets mit je 50ml 10%igen Glycerin in 1mM Hepes Puffer sowie anschließendes Zentrifugieren bei 5000Upm und 4°C für 20min. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die verbleibenden Pellets in je 3ml eiskalten 10%igen Glycerin in 1mM Hepes Puffer resuspendiert. Je 55µl Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Effizienzbestimmung der *E. coli* „One Shot Top10“ wurde ein Aliquot mit 1pg pUC19-Vektor, wie in Abschnitt 2.2.1.8 beschrieben, transformiert, angeschüttelt und komplementiert mit Ampicillin auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten inkubierten

bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag konnten die Kolonien ausgezählt und die Effizienz nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Effizienz} = \text{Anzahl Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor pUC Konzentration}$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \text{SOC-Volumen} / \text{ausplattiertes Volumen}$$

$$\text{Umrechnungsfaktor pUC Konzentration} = 10^6$$

Die Effizienz der elektrokompenten *E. coli* „One Shot Top10“ sollte mindestens 1×10^9 Kolonien/ $1 \mu\text{g}$ pUC19 Vektor betragen.

2.2.1.8 Transformation

Die Transformation der verwendeten Plasmide (Tabelle 15 und 16) erfolgte durch Elektroporation. Dafür wurde je Plasmid ein Aliquot elektrokompenter *E. coli* „One Shot Top10“ (Abschnitt 2.2.1.7) auf Eis mit $1 \mu\text{l}$ Plasmid versetzt und in eine spezielle 2mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2.5kV, 25 μF und 200 Ω mit dem „Gen Pulser XCell“. Sofort nach dem Pulsen wurden 500 μl SOC-Medium (Tabelle 12) zugegeben und für zwei Stunden bei 37°C und 250Upm inkubiert. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde dann auf LB-Agar-Selektionsplatten, komplementiert mit Ampicillin oder Kanamycin, ausplattiert.

2.2.1.9 Plasmidklonierung und -isolierung

Zur Klonierung von Plasmiden wurden elektrokompente *E. coli* „One Shot Top10“ mit diesen transformiert, angeschüttelt und ausplattiert, wie bereits im vorherigem Abschnitt beschrieben. Am nächsten Tag wurden die Einzelkolonien in 5ml LB-Medium, komplementiert mit Ampicillin oder Kanamycin, überführt und bei 37°C und 250Upm über Nacht angeschüttelt. Die anschließende Plasmidisolierung erfolgte nach Herstellerangaben mittels „QIAprep® Spin MiniPrep Kit“ (Tabelle 13). Die Elution in 50 μl Aqua dest. führte zu einer DNA-Ausbeute von 50-500ng/ μl . Um höhere Ausbeuten von 1-4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erzielen, wurden Plasmide mit Hilfe des „Endo-free Plasmid Maxi Kit“ (Tabelle 13) aufgereinigt. Hierfür wurden 5ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und tagsüber bei 37°C und 250Upm angeschüttelt. Diese 5ml Tag-Kultur wurde in einen 2l Schikanekolben mit 250ml LB-Medium überführt und unter gleichen Bedingungen über Nacht angeschüttelt.

Die Plasmidisolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die DNA in 200µl Aqua dest. eluiert.

2.2.1.10 Glycerolstock

Um für häufig verwendete Plasmide den Klonierungsprozess zu beschleunigen, wurden Glycerolstocks angefertigt. Von der Über-Nacht-Kultur wurde dafür vor Beginn der Plasmidisolierung (Abschnitt 2.2.1.9) 400µl Bakterienlösung abgenommen, zusammen mit 600µl 86%igem Glycerol vermischt und für zwei Tage bei -20°C, danach bei -80°C gelagert. Für zukünftige Plasmidpräparationen wurde eine Pipettenspitze kurz in den Glycerolstock getaucht, in 5ml beziehungsweise 250ml LB-Medium gegeben und bei 37°C sowie 250Upm über Nacht angeschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidisolierung mittels „Endo-free Plasmid Maxi Kit“, wie bereits in vorherigen Abschnitt beschrieben.

2.2.1.11 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung erfolgte mit einem „NanoDrop Spektrophotometer ND-1000“ nach Herstellerangaben, bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm. Zur Absorptionsmessung der DNA wurde 1µl der eluierten DNA eingesetzt. Um eine Aussage über die Reinheit der DNA zu treffen, wurde der Koeffizient aus der optischen Dichte bei 260nm und 280nm berechnet. Die hoch aufgereinigte DNA wies eine kaum messbare Proteinkonzentration auf, was sich in einen Koeffizienten von 1.8 bis 2.0 widerspiegelte.

2.2.1.12 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR dient der Überprüfung der Nukleotidsequenz klonierter Plasmide. Hierfür wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger herangezogen (Sanger et al., 1977). Bei dieser Methode werden Sequenzierprimer (Anhang: Tabelle 26) verwendet, welche sich durch eine Länge von 18-25 Nukleotiden, einen GC-Gehalt von nicht weniger als 40% und einer Schmelztemperatur von mindestens 51°C auszeichnen. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das „Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Tabelle 13) verwendet. Dazu gehört der „BigDye-Premix“, der eine „AmpliTaQ DNA-Polymerase“ und einen Mix aus fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxynukleotriphosphaten (ddNTP's) enthält. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes war wie folgt:

Sequenzierungs-Ansatz:

- 1µl Template-DNA (150ng-300ng)
- 0.5µl Sequenzierprimer (10µM)
- 1µl ABI-Puffer (5x)
- 1-2µl Big Dye
- add. 10µl Aqua dest.

Sequenzierungs-Bedingungen:

96°C, 2min	(Initiale Denaturierung)	} 25x
96°C, 10s	(Denaturierung)	
50-60°C, 10s	(Primer-Annealing)	
60°C, 4min	(Elongation)	
4°C, ∞	(Lagerung)	

Die Sequenzanalyse erfolgte im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts und wurde mit dem Computerprogramm „DNASTAR Lasergene 8“ ausgewertet.

2.2.2 Protein-Analytik

2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten humanen, adhärenen Zelllinien (Tabelle 14) wurden in Zellkulturmedium, bestehend aus Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (D-MEM), 10%igem Fetalen Kälberserum (FKS), 50 U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin, in 75cm² Zellkulturflaschen steril kultiviert und passagiert. Die Zellkultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 98% Luftfeuchtigkeit. Vor dem Passagieren der Zellen wurden diese mit einem Axiovert 100 Mikroskop bei einer 10fachen Vergrößerung optisch kontrolliert, um Bakterien oder Pilzinfektionen auszuschließen. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die adhärenen Zellen vorsichtig mit 8ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS, Tabelle 11) gewaschen, um Medium, Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch den Verdau der Adhäsionsproteine mit 1ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in etwa 10ml 37°C warmen Zellkulturmedium gut resuspendiert und vereinzelt. Je nach Konfluenz der Zellen wurde ein Teil in 12ml 37°C warmen Zellkulturmedium weiter kultiviert und der Rest verworfen. Der Vorgang wurde in Abhängigkeit von der Zelldichte aller zwei bis drei Tage wiederholt.

Für weiterführende Experimente wurden die überschüssigen Zellen nach dem Passagieren für 5min bei 1200Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in

10ml 37°C warmen Zellkulturmedium gründlich resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem Zellzähler „Coulter-Counter Z2“ nach Herstellerangaben bestimmt und die Zellen, abhängig von ihrer Wachstumsrate und Zellgröße, in Kulturgefäßen ausgesät.

Tabelle 17: Ausplattierte Zellzahlen der verwendeten humanen Zelllinien

Zellen	12-Well-Platte	6-Well-Platte	10cm Petrischale
HEK293T	100.000 Zellen/Well	250.000 Zellen/Well	4.000.000 Zellen/Schale
HeLaSS6	-	150.000 Zellen/Well	3.000.000 Zellen/Schale
HUH-7	-	100.000 Zellen/Well	-

2.2.2.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Um eine langfristige Nutzung einer Zelllinie zu gewährleisten, wurde ein Teil dieser nach dem Auftauen und etwa zweimaligen Passagieren wieder eingefroren. Hierfür wurden die überschüssigen Zellen nach dem Passagieren einmal in PBS gewaschen und bei 1200Upm für 5min abzentrifugiert. Das Zellpellet einer 75cm² Zellkulturflasche wurde anschließend in 2ml Einfriermedium (Tabelle 12) resuspendiert. Davon wurden je 500µl in einem Kryoröhrchen über 24 Stunden hinweg mit einem Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter langsam auf -80°C runtergekühlt, um ein zellschonendes Einfrieren zu gewährleisten. Die Lagerung der Zelllinien erfolgte dauerhaft in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zum Auftauen der in flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese sofort im Wasserbad bei 37°C erwärmt und in 5ml komplementierten D-MEM resuspendiert. Nach anschließendem Pelletieren der Zellen bei 1200Upm für fünf Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 12ml komplementiertem D-MEM resuspendiert. Die weitere Kultivierung der Zellen wurde, wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Das Einfrieren und Auftauen von Zelllinien erfolgte steril.

2.2.2.1.2 Transfektion von Zelllinien

Bei der Transfektion von Zellen wird Plasmid-DNA mit Hilfe verschiedener Methoden transient oder permanent in eukaryotische Zellen steril eingeschleust. Dabei erfolgte die Transfektion der Zellen frühestens einen Tag nach dem Aussäen im Kulturgefäß, um eine gute Adhärenz der Zellen am Untergrund zu gewährleisten. Die Zellen wiesen dabei eine gespreitete Morphologie und eine Konfluenz von 40-50% auf.

2.2.2.1.2.1 Transfektion mittels PolyFect

„PolyFect-Transfektionsreagenz“ (Tabelle 13) wurde zur transienten Transfektion von Zellen genutzt, welche für lichtmikroskopische Zwecke oder korrelative Mikroskopie benötigt wurden. Dieses chemische Verfahren basiert auf dem Prinzip der von Dendrimeren umschlossenen DNA. Die positiv geladenen PolyFect-Plasmidkomplexe fusionieren mit der Zellmembran eukaryotischer Zellen nach erfolgter Bindung an negativ-geladene Rezeptoren, wie zum Beispiel Sialinsäure gekoppelten Glykoproteine.

Die Transfektion der in 12-Well- oder 6-Well-Platten (Tabelle 17) ausgesäten Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Nach 8 bis 14 Stunden wurde der Transfektionsansatz abgenommen und die Inkubation der Zellen in komplementiertem D-MEM bis zum gewünschten Zeitpunkt fortgeführt.

2.2.2.1.2.2 Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode

Zur transienten Transfektion von in 10cm Petrischalen ausgesäten Zellen (Tabelle 17) für die Elektronenmikroskopie und zur Gewinnung großer Mengen an viralen Partikeln mittels Ultrazentrifugation wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet (Chen und Okayama, 1988). Hierbei bindet die zu übertragende Plasmid-DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Die entstandenen Kristalle werden anschließend durch Endozytose von den Zellen aufgenommen.

Die bei diesem chemischen Verfahren verwendeten Lösungen sowie deren eingesetzten Volumina gehen aus Tabelle 18 hervor. Es wurde Plasmid-DNA in Aqua dest. verdünnt und mit 2.5M Calciumchlorid durch Vortexen gut vermischt. Der Ansatz wurde langsam und tropfenweise auf 2x HBS (Tabelle 11) pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen erfolgte der Wechsel des Kulturmediums der zu transfizierenden Zellen mit komplementiertem D-MEM. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde das Calciumphosphat-Plasmid-Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben, die anschließend für mindestens acht Stunden im Brutschrank inkubierten. Nach erneutem Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 24 bis 48 Stunden kultiviert. Dies führte zu einem verstärkten Expressionslevel der zu untersuchenden Proteine und einer gut gespreiteten Zellmorphologie. Die Zellen standen während der gesamten Transfektion unter optischer Kontrolle.

Tabelle 18: Mengenangaben der verwendeten Lösungen für die Calciumphosphat-Transfektion

Kulturgefäß	DNA (µg)	Aqua dest. (µl)	CaCl ₂ (µl)	2xHBS (µl)	Medium (ml)
6-Well Platte	2	90	10	100	2
10cm Petrischalen	20	450	50	500	10

2.2.2.2 Ultrazentrifugation

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

2.2.2.2.1 Ultrazentrifugation für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Hierfür wurden die Zellen in 10cm Petrischalen kultiviert und mittels Calciumphosphat-Methode (Abschnitt 2.2.2.1.2.2) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden 20ml Überstand pro Ansatz abgenommen, für acht Minuten bei 4000Upm abzentrifugiert und mittels 0,45µm Porenfilter steril filtriert, um ihn von Zelltrümmern zu befreien. Dem Überstand wurden 10µl kationisches Gold mit einer Partikelgröße von 15nm zugesetzt. Es lässt sich zusammen mit den viralen Partikeln abzentrifugieren und führte zu einer rötlichen Färbung des Pellets am Boden des Zentrifugenröhrchens. Vor ihrer Verwendung wurden die dünnwandigen „Thinwall Ultra-Clear“-Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden zur Reinigung mit 70%igen vergällten Ethanol und zweimal mit PBS (Tabelle 11) gespült. Anschließend wurden 15ml 20%ige Sucrose in Aqua dest. eingefüllt und mit dem Zellkulturüberstand vorsichtig überschichtet. Alle sechs Ansätze wurden mit PBS und einer Feinwaage austariert. Innerhalb von 3 Stunden pelletierten die viralen Partikel bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 32.000Upm und 4°C. Nach Beendigung der Ultrazentrifugation wurde der Überstand abgekippt und die Röhrchen über Kopf kurz zum Abtropfen aufgestellt. Die Pellets wurden anhand der rötlichen Färbung lokalisiert, mit je 100µl 0.05M Hepes Puffer (Tabelle 11) überschichtet und für etwas 30 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Pellets vorsichtig resuspendiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) bei -20°C gelagert.

In der SDS-Page (Abschnitt 2.2.2.3) wurde zum Vergleich auch das Zelllysat benötigt. Dafür erfolgte nach Abnahme des Überstandes die Lyse der mit PBS gewaschenen, transfizierten Zellen durch 200µl Zelllysispuffer (Tabelle 11), versetzt mit Complet-

Proteaseinhibitor nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden vom Petrischalenboden abgespült, in 2ml Eppendorfgefäße überführt und zur Entfernung der Zelltrümmer bei 13.000U_{pm} für zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und ebenfalls bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.2.2 Ultrazentrifugation für Transmissionselektronenmikroskopie

Wurden die Proben für elektronenmikroskopische Analysen benötigt, so musste in einigen Punkten der Präparation anders verfahren werden, als bei der Präparation für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2.2.1).

Die Ultrazentrifugation erfolgte in spitz zulaufenden Zentrifugenröhren, um das Pellet der viralen Partikel besser auf einen kleinen Bereich zu konzentrieren. Sie fassen jedoch ein geringes Volumen, was zur Verwendung von nur 10ml 20%iger Sucrose führte. Die Kulturüberstände wurden mit 20 μ l 6nm kationischem Gold versetzt, da es sich aufgrund seiner geringeren Größe unscheinbarer in der Elektronenmikroskopie verhielt. Das virale Pellet wurde nach Abgießen des Überstandes mit 20 μ l warmer 3%igen *Low melting point* Agarose in Aqua dest. überschichtet und durch Anheben mittels Pipettenspitze von dieser umschlossen. Die Fixierung erfolgte sofort im Anschluss durch 1ml 2,5%igem Glutaraldehyd in 0.05M Hepes Puffer. Das Virenpellet wurde vor der Eponeinbettung (Abschnitt 2.2.4.1.2) in kleine Blöckchen mit einer Kantenlänge von je 2mm geschnitten und in Fixativ bei 4°C gelagert.

Zur elektronenmikroskopischen Analyse der transfizierten Zellen wurden diese nach Abnahme des Überstandes mit PBS gespült, durch 5ml 2,5%igem Glutaraldehyd in 0.05M Hepes Puffer fixiert und bis zur Einbettung in Agarose (Abschnitt 2.2.4.1.1) bei 4°C in Fixativ gelagert.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page ist ein Verfahren zur Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrer Größe im elektrischen Feld (Laemmli, 1970). Natriumdodecylsulfat (SDS) führt dabei zur Denaturierung der Proteine und überdeckt deren eigene Ladung. Somit erhalten alle SDS beladenen Proteine eine negative Ladung und wandern im Gel aufgrund ihrer ungleichen Größe unter dem Einfluss des elektrischen Feldes unterschiedlich schnell und werden somit aufgetrennt. Es wurden 5%ige Sammelgele und 12%ige Trenngele (Tabelle 19) mit einer Dicke von 1,5mm verwendet, wobei die Konzentration des Trenngels von der Größe der aufzutrennenden Proteine abhing. Je kleiner das aufzutrennende Protein, umso

hochprozentiger sollte das Trenngel sein. Der optimale Aufdrehungsbereich 12%iger Trenngele liegt bei 72kDa bis 34kDa. Das weitporige, dem Trenngel vorangestellte Sammelgel macht etwa ein Viertel des gesamten Gels aus und dient dem Aufkonzentrieren der Probe an der Grenzschicht der beiden Gele. Somit dringt die Probe als sehr dünne Bande in das Trenngel ein und kann klar strukturiert aufgetrennt werden. Die Komponenten der Gele (Tabelle 19) werden zusammen gemischt, wobei Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) die Vernetzung der Acrylmonomere katalysiert. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit dem gleichen Volumen an 2x Laemmli-Probenpuffer sowie 5% β -Mercaptoethanol versetzt und für 10 Minuten bei 75°C im Heizblock denaturiert. Dabei werden durch das im Probenpuffer enthaltene SDS die Wasserstoffbrücken der Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgebrochen und durch β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken reduziert. Als Größenstandard wurden 10 μ l Page „Ruler Prestained Protein Ladder“ von Fermentas aufgetragen. Das Aufkonzentrieren der Proben und des Größenstandards im Sammelgel erfolgte bei 100kV bis die Lauffront die Grenzschicht zum Trenngel passierte. Die Spannung wurde zur Auftrennung der Proben auf 180kV erhöht bis die Lauffront nach etwa 40 Minuten aus dem Gel zu laufen begann. Im Anschluss folgten Western Blot Analysen, wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben.

Tabelle 19: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponenten	1x Trenngel 12%	2x Sammelgel 5%
Aqua dest.	3,4ml	5,7ml
Acrylamid	4,0ml	1,7ml
1,5M Tris, pH 8,8	2,5ml	-
0,5M Tris, pH 6,8	-	2,5ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

2.2.2.4 Western Blot (Immunoblot)

Die durch die SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden im Western Blot auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen und mit Hilfe spezifischer Antikörper im Anschluss identifiziert und quantifiziert (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979; Brunette, 1981).

Zunächst wurde die zugeschnittene PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45µm für fünf Minuten in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer gewaschen. Das SDS-Gel wurde ebenfalls für mindestens 20 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der anschließende Protein-Transfer erfolgte mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren. Hierfür wurde das Gel zwischen zwei mit Transferpuffer durchsogenen Blottpapieren auf die PVDF-Membran aufgelegt und für 40 Minuten bei 20V geblottet. Das anschließende Schwenken der PVDF-Membran im Milchpulverpuffer (Tabelle 11) für eine Stunde blockierte eine unspezifische Antikörperbindung. Die Inkubation in Milchpulverpuffer verdünnten Primärantikörper (Tabelle 20) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in PBS mit 0.5% Tween für jeweils fünf Minuten inkubierte die PVDF-Membran in mit Milchpulverpuffer verdünntem Sekundärantikörper (Tabelle 20) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die an den Sekundärantikörper kovalent gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) ließ sich nach weiteren Waschstufen durch den Umsatz von „Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Solution“ nachweisen. Das in der Lösung enthaltene Luminol wurde durch die HRP oxidiert. Die daraus resultierende Chemilumineszenz konnte als Schwärzung auf einem Röntgenfilm von Kodak mittels Filmkassette und Filmentwicklermaschine „Agfa Curix 60“ visualisiert werden.

Tabelle 20: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper im Western Blot und deren Verdünnung (Hersteller: Tabelle 8 und 9)

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV K) capsid protein IgG	1:5.000	Ziege anti-Maus HRP	1:5.000
Anti-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV K) envelop protein IgG	1:4.000	Ziege anti-Maus HRP	1:5.000
Living Colors® DsRed Polyclonal Antibody (Kaninchen anti-DsRed)	1:6.000	Ziege anti- Kaninchen HRP	1:10.000
Ziege anti-GFP	1:2.000	Esel anti-Ziege IgG HRP	1:5.000
Rattenserum anti-CA HERV-K113	1:70.000	Ziege anti-Ratte HRP	1:5.000

2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Detektion von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper bei Zellen und Gewebe. Es wurde die Zwei-Schritt-Methode (Abbildung 15) der indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Dabei wird ein Primärantikörper verwendet, der spezifisch für das zu detektierende Antigen ist. Dieser wird anschließend mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

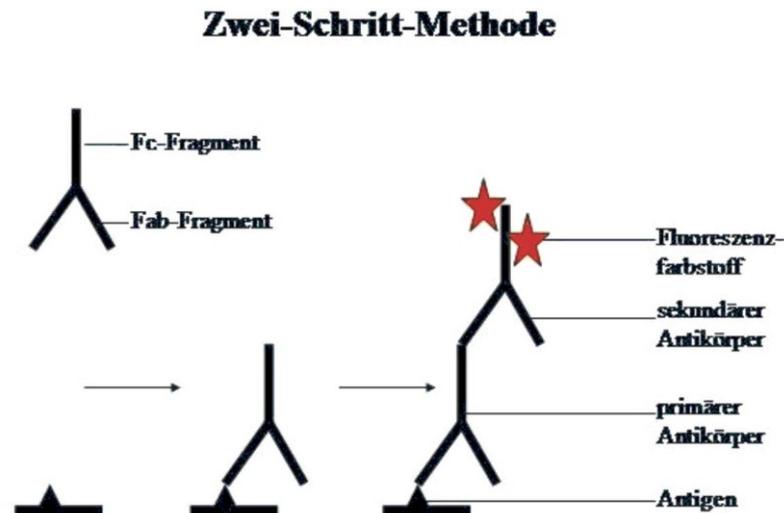


Abbildung 15: Indirekte Zwei-Schritt-Methode der Immunlokalisation

Bei dieser Methode bindet ein antigenspezifischer, unkonjugierter Primärantikörper mit dem F(ab)₂-Fragment an ein Antigen. Visualisiert wird die Bindung durch einen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten, für das Fc-Fragment des primären Antikörpers spezifischen Sekundärantikörper. Deshalb muss der sekundäre Antikörper gegen die Immunglobuline der Tierspezies gerichtet sein, aus welcher der Primärantikörper abstammt (Boenisch, 2003; Luttmann et al., 2006).

Diese Technik erlaubt im Gegensatz zur Direktmethode, bei der der primäre Antikörper bereits fluoreszenzgekoppelt ist, mehr Flexibilität durch Verwendung verschiedener, fluoreszierender Sekundärantikörper. Somit können verschiedene sekundäre Antikörper an ein- und denselben primären Antikörper binden, und umgekehrt. Alle Antikörper müssen jedoch von einer Tierspezies abstammen (Boenisch, 2003; Luttmann et al., 2006).

Die Zellen wurden hierfür auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 25mm in 6-Well-Platten ausgesät. Vor ihrer Verwendung wurden die Deckgläschen in 70%igen Ethanol und zweimal in sterilen PBS gewaschen. Je nach Wachstumsrate und Größe wurden die Zellen mit unterschiedlicher Zellzahl ausgesät (Tabelle 17), kultiviert (Abschnitt 2.2.2.1) und mittels „PolyFect Transfektionsreagenz“ transfiziert (Abschnitt 2.2.2.1.2.1). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mit 2%igen

Paraformaldehyd in PBS für 30 Minuten im Brutschrank fixiert und bei 4°C dunkel gelagert.

Vor der Fluoreszenzfärbung wurden die Proben zum Entfernen von überschüssigen Paraformaldehyd dreimal mit PBS gewaschen. Die anschließende Permeabilisierung der Zellen mit 0.5%igem Triton X-100 für 30 Minuten ermöglichte eine gute Zugänglichkeit der intrazellulären Antigene für die Antikörper. Gleichzeitig erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10%igem Ziegennormalserum (NGS) in PBS. Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper (Tabelle 21) wurden in einer Inkubationslösung bestehend aus 1% NGS, 0.5% Triton X-100 in PBS verwendet. Die Inkubationsphase im Primärantikörper betrug eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen für je fünf Minuten in PBS wurden die Zellen für eine Stunde mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf dem Schüttler inkubiert. Durch dreimaliges Spülen für je zehn Minuten mit PBS wurden nicht gebundene Sekundärantikörper ausgewaschen. Die Einbettung der am Deckglas haftenden Zellen erfolgte kopfüber in hydrophilem Mowiol 4-88 versetzt mit dem Antibleichmittel DABCO 33480 (Abschnitt 2.2.2.5.1). Die Lagerung der Präparate erfolgte in Kryo-Objektträgerkästen bei 4°C.

Tabelle 21: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz und deren Verdünnung (Hersteller: Tabelle 8 und 9)

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV K) capsid protein IgG (Maus)	1:500	AlexaFluor488 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	1:300
		AlexaFluor568 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	1:300
Anti-human Endogenous Retrovirus Typ K (HERV K) envelop protein IgG (Maus)	1:500	AlexaFluor488 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	1:300
		AlexaFluor568 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	1:300
		AlexaFluor647 Ziege anti-Maus IgG (H+L)	1:300
Anti-Alpha-Tubulin Monoclonal Antibody (Kaninchen)	1:500	AlexaFluor488 Ziege anti- Kaninchen IgG (H+L)	1:300
		AlexaFluor647 Ziege anti- Kaninchen IgG (H+L)	1:300

2.2.2.5.1 Mowiol

Das hydrophile Einbettmedium Mowiol 4-88 wurde durch permanentes Rühren unter leichter Erwärmung für 16 Stunden in PBS gelöst. Danach wurde das Medium für 16 Stunden mit 100%igem Glycerin durchmischt. Ungelöstes Mowiol 4-88 und Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000Upm aus dem Medium entfernt. Der Überstand wurde anschließend mit 1mg/ml DABCO 33480 versetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren für zehn Minuten war das Medium gebrauchsfertig oder wurde in 1,5ml Eppendorfgläsern aliquotiert und bei -20°C langfristig gelagert.

<u>Ansatz für 30 ml:</u>	Mowiol 4-88	2g
	PBS	20ml
	Glycerin (100%)	10ml
	DABCO 33480	3g

2.2.2.6 Vitalfärbung für Lebenszellmikroskopie

Die *in vivo* Färbung erfolgte nach Transfektion der Zellen (Abschnitt 2.2.2.1.2) und ermöglichte die auf Fluorophoren basierende Visualisierung verschiedener Zellkompartimente in physiologisch aktiven Zellen. Die Vitalfarbstoffe hatten dabei keinen Einfluss auf die Zellfunktion und -morphologie. Sie beruhen auf der Diffusion des Farbstoffes und dessen spezifischer Bindung an die Zielstruktur.

2.2.2.6.1 Membranfärbung *in vivo*

Zelluläre Membranen wurden mit Hilfe des langkettigen Carbocyanins DiO (3,3'-Dioctadecyloxycarbocyanin-Perchlorat; $C_{53}H_{85}ClN_2O_6$; Tabelle 10) effizient und permanent *in vivo* gefärbt (Axelrod, 1979; Honig und Hume, 1986). Der lipophile aber gut wasserlösliche Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 484nm und einem Emissionsmaximum von 501nm zeigt eine schwache Fluoreszenz in Lösung. Seine laterale Inkorporation über lange Kohlenwasserstoffketten in die Plasmamembran führt zu einer starken Fluoreszenz und Photostabilität. Jedoch musste für die Transfektion der Zellen die Calciumphosphat-Methode (Abschnitt 2.2.2.1.2.2) angewendet werden, da die Inkorporation des Farbstoffes in die Membran nach einer Transfektion mit „PolyFect Transfektionsreagenz“ gehemmt war. Die Markierung erfolgte nach den Herstellerangaben von Invitrogen.

2.2.2.6.2 Lysosomenfärbung *in vivo*

Lysosomen konnten vital mittels „LysoTracker® Red DND-99“ (C₂₀H₂₄BF₂N₅O; Tabelle 10) visualisiert werden. Der *in vivo* Farbstoff zeigt eine hohe Sensitivität bezüglich Organellen mit einem sauren pH-Wert wie Lysosomen (pH4,5-5) und weist ein Absorptionsmaximum von 577nm und ein Emissionsmaximum von 590nm auf. LysoTracker enthalten Fluorophore, die an schwach-basische Amine gekoppelt sind. Diese Fluorophoramin-Komplexe liegen bei neutralem pH-Wert schwach-protoniert vor, und besitzen dadurch eine hohe Membrangängigkeit. Somit infiltrieren die Komplexe die Zellen und es kommt zur Anreicherung im sauren Lumen von Lysosomen, was in einer Ausprägung der Fluoreszenz resultiert. Die *in vivo* Markierung der zellulären Lysosomen erfolgte nach Herstellerangaben (<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07525.pdf>; Zugriff am: 18.11.2011).

2.2.2.6.3 ER-Färbung *in vivo*

Der „ER-Tracker™ Red (BODIPY®TR)“ (Tabelle 10) ermöglicht eine selektive Visualisierung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in lebenden Zellen. Der Farbstoff besitzt ebenfalls eine hohe Zellpermeabilität und weist ein Absorptionsmaximum von 587nm und ein Emissionsmaximum von 610nm auf. „ER-Tracker™ Red“ ist ein Konjugat des Medikaments Glibenclamid, das zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe gehört. Es wird Diabetes-Patienten verabreicht und erhöht die Insulinausschüttung der Bauchspeicheldrüse. Ebenso wird es für Untersuchungen der Zellfunktion des Myokards und bei Herzrhythymien eingesetzt. Seine Wirkungsweise beruht auf der Bindung an Sulfonylharnstoff-Rezeptoren der ATP-abhängigen Kaliumkanäle und verhindert so das Ausströmen der Kaliumionen. Diese Kaliumkanäle findet man vermehrt in der ER-Membran, was zu einer verstärkten Bindung des ER-Trackers führt. Die *in vivo* Markierung des ERs erfolgte nach Herstellerangaben (<http://biology.fullerton.edu/facilities/em/Library/ERtracker.pdf>; Zugriff am: 18.11.2011).

2.2.2.6.4 FIAsh-EDT₂ Färbung *in vivo*

Der bisarsene Farbstoff „Fluorescein arsenical helix binder“ (FIAsh-EDT₂; Tabelle 10) ist vom Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein abgeleitet (Griffin et al., 1998; Stroffekova et al., 2001). Demnach liegt das Absorptionsmaximum bei 508nm und das Emissionsmaximum bei 528nm. FIAsh-EDT₂ bindet *in vivo* an eine sechs Aminosäuren lange Tetracystein-Sequenz (TC-Tag, 585Da), bestehend aus je zwei Cysteinen, getrennt durch ein Prolin und

ein Glycin. Mittels Mutagenese-PCR (Abschnitt 2.2.1.2) kann die kurze Sequenz des TC-Tags in die Sequenz des zu untersuchenden Proteins kloniert werden. Bei Zellen, die das Fusionsprotein nach Transfektion exprimieren und anschließend im biarsenen Farbstoff FIAsh-EDT₂ inkubieren, bindet der Farbstoff selektiv über Sulfidbrücken an dem TC-Tag. Dies führt zur Ausbildung seiner fluoreszierenden Eigenschaften (Abbildung 16). Die *in vivo* Färbungen erfolgten nach den „TC-FIAsh II Detection Kit“-Herstellerangaben (<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp34561.pdf>, Zugriff am: 18.11.2011).

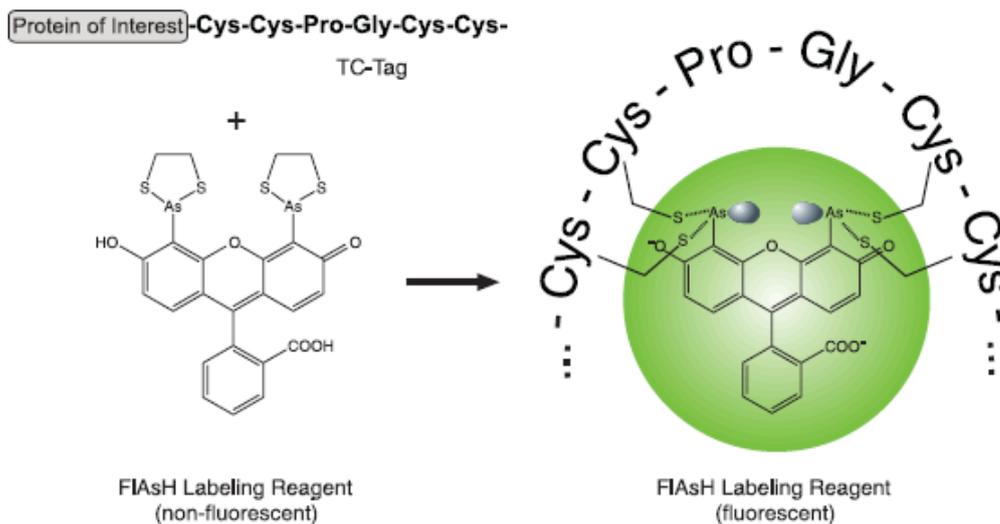


Abbildung 16: Funktionsweise von FIAsh-EDT₂ *in vivo*

Das zu untersuchende Protein wird mit einem Tetracystein-Tag (TC-Tag) versehen. Durch die Inkubation im biarsenen Farbstoff, kann dieser über die Ausbildung von Schwefelbrücken an den TC-Tag des Fusionsproteins binden. Der Farbstoff bildet über die Bindung am TC-Tag seine Fluoreszenz aus. (TC-FIAsh™ TC-ReAsH™ II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kits - User manual, <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34561.pdf>, Zugriff am: 27.03.2011)

2.2.3 Lichtmikroskopie

2.2.3.1 Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie

In der Lichtmikroskopie wird sichtbares Licht (450 - 750nm) über optische Linsen auf einen Brennpunkt gebündelt, der in der Fokusebene des Präparates liegt. Anschließend wird das emittierte Licht über weitere optische Linsensysteme an das Auge oder die Kamera weitergeleitet. Dabei wird das Probenabbild optisch vergrößert. Man unterscheidet zwischen Durchlicht- und Auflichtmikroskopie. Bei der Durchlichtmikroskopie wird das Licht direkt durch die Probe geleitet und dann vom Objektiv aufgefangen. Bei der Auflichtmikroskopie trifft das Licht durch das Objektiv auf die Probe, wird reflektiert oder regt Fluorophore an. Das von der Probe kommende Licht

wird wiederum vom Objektiv aufgefangen und an das Auge oder die Kamera weitergeleitet. Zudem unterscheidet man zwischen aufrechten oder inversen Mikroskopen, bei denen sich das Objektiv jeweils ober- oder unterhalb der Probe befindet.

Die visuelle Kontrolle der Morphologie kultivierter Zellen erfolgte mit dem inversen Mikroskop Axiovert 100, ausgestattet mit einem 10fach Objektiv (NA 0.25). Transfizierte Zellen, welche Fluoreszenz-gekoppelte Proteine exprimierten, wurden durch ein Axiovert 40CFL ausgestattet mit einer HBO 50 Quecksilberlampe und den Filtersätzen 49 DAPI, 38 Endow GFP, 45 HQ TexasRed auf ihre Transfektionseffizienz hin überprüft. Für die Durchlichtmikroskopie wurde eine 12V/35W Halogenlampe verwendet. Verfügbar waren je ein 10fach (NA 0.25), ein 20fach (NA 0.40) und ein 40fach (NA 0.60) Objektiv.

2.2.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie (cLSM) werden Fluorophore mit gebündelten Lasern definierter Wellenlänge angeregt und die Probe punktförmig abgerastert (gescanned). Das emittierte Licht wird durch eine spezifische Lochblende, konfokale Blende oder Pinhole genannt, an den Detektor weitergeleitet. Der Durchmesser der Blende bestimmt wie groß die optische Schnittdicke ist, aus der das Licht detektiert wird. Je kleiner das Pinhole, desto dünner ist der optische Schnitt. Als optischen Schnitt bezeichnet man dabei ein Bild, das nur einen bestimmten Bereich der Z-Dimension der Probe darstellt. Im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie, welche die gesamte Z-Dimension der Probe darstellt, ermöglicht die cLSM eine höhere Auflösung durch Reduktion des Hintergrundes. Zudem ist es möglich einen Z-Stapel an optischen Schnitten einer Probe aufzunehmen, was eine dreidimensionale Rekonstruktion der Probe ermöglicht.

Die cLSM wurde durchgeführt zum einen mit einem aufrechten cLSM 510 META, ausgestattet mit einem Argon-Laser Multiline (488nm, 514nm), einem HeNe-Laser (543nm), einem HeNe-Laser (633nm) und einem Metadetektor. Zum anderen wurde ein inverses cLSM 780 verwendet, ausgestattet mit einer Laserdiode (405nm), einem Multiline Argon-Laser (458nm, 488nm, 514nm), drei verschiedenen HeNe-Lasern (543nm, 594nm, 633nm) und einem 32 Kanal GaAsP-Detektor (Spektraldetektor) sowie zwei PMT-Detektoren. Als Betriebssysteme wurden cLSM META 510 beziehungsweise ZEN 2010b der Firma Carl Zeiss genutzt. Die Aufnahme von konfokalen Bildern, Zeitserien und Z-Stapeln für die dreidimensionale Rekonstruktion erfolgte mit 512 x 512 Pixeln und in "lsm"-Kodierung. Dafür wurde ein 63fach Öl-Objektiv (NA1.40) oder

100fach Öl-Objektiv (NA 1.40) genutzt. Die Zeitserien wurden unter natürlich-physiologischen Bedingungen aufgenommen. Dabei wurden die Zellen mit humiden 5%igem Kohlendioxid begast. Um eine ausreichende Temperaturstabilität des Systems während der Datenakquise zu gewährleisten, wurde das System vor Beginn der Versuche für etwa zwei Stunden auf 37°C vorgeheizt. Die Z-Stapel wurden mit einer Voxelgröße von 0,6-0,8µm und optimaler Z-Überlappung aufgenommen, so dass sich zwei aufeinander folgende optische Schnitte zur Hälfte in der Z-Achse überlappen. Die Bearbeitung der Bilddaten erfolgte durch den cLSM Image Browser oder die ZEN 2010b Software.

2.2.3.3 Lebendzellmikroskopie

Die Probe wird bei diesem lichtmikroskopischen Verfahren im physiologisch aktiven Zustand mikroskopiert, um dynamische Prozesse zu beobachten. Um spezifische Strukturen der Probe zu visualisieren, wurden diese entweder durch Vitalfarbstoffe angefärbt oder durch die Expression spezifisch fluoreszierender Fusionsproteine visualisiert. Zudem sollten während der Bildaufnahme natürlich-physiologische Bedingungen herrschen.

Für die Lebendzellmikroskopie wurden die Deckgläschen (Durchmesser: 25mm) mit den adhären, transfizierten Zellen (Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.1.2) in eine Metallpetrischale „Attofuor® Cell Chamber“ eingespannt. Die Proben wurden mit, auf 37°C vorgewärmten und mit dem Vitamin-E Derivat Trolox versetzten, Opti-MEM überschichtet. Trolox mindert als Radikalfänger die Phototoxizität des Anregungslichtes während der Datenakquise (Scheenen et al., 1996). Um für die lebenden Zellen natürlich-physiologische Bedingungen zu schaffen, wurden sie mit humiden, in synthetischer Luft abgemischten 5%igen Kohlendioxid begast. Zudem wurde das System vor Versuchsbeginn für zwei Stunden vorgeheizt, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten und einen temperaturabhängigen Fokustrift zu vermeiden. Die Lebendzellmikroskopie erfolgte mit dem „Live Cell Imaging System Eclipse TE2000-E“ der Firma Nikon. Das Beleuchtungssystem beinhaltet eine Halogenlampe für die Durchlichtbeleuchtung und ein Lambda DG-4 Beleuchtungssystem für die Auflichtmikroskopie. Letzteres besteht aus einer Xenon Lampe und einem Spiegelsystem, das durch unterschiedliche Kippwinkel der Spiegel und den in verschiedenen Positionen angebrachten Filtern die Wellenlänge des Anregungslichtes bestimmt. Dies ermöglichte einen probenschonenden und schnellen Wechsel des Anregungslichtes. Die Bilder wurden

mit einer 16bit EM-CCD Kamera und einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln im „nd2“-Fileformat der „NIS Elements 2.3“-Software aufgenommen. Übersichtsaufnahmen wurden mit einem 20fach Trockenobjektiv (NA 0.5) und hochauflösende Bilddaten mit einem 60fach Öl-Objektiv (NA 1.40) generiert. Das Mikroskop war zudem mit einem „Perfect Focus System“ ausgestattet, das eine konstante Fokusebene über längere Zeiträume gewährleistete. Hierbei wird das von einer Rotlichtdiode ausgesendete und vom Deckgläschen reflektierte Licht permanent positionell gemessen und abgeglichen.

2.2.4 Elektronenmikroskopie

In der Elektronenmikroskopie werden Proben im Vakuum mit Elektronen von hoher Geschwindigkeit bestrahlt. Es ermöglicht eine höhere Auflösung als die Lichtmikroskopie und somit eine bessere Strukturauflösung der Probe. Man unterscheidet prinzipiell zwei Formen, die Transmissions- und die Rasterelektronenmikroskopie. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie durchdringen Elektronen die Probenschnitte und geben Aufschluss über deren Morphologie. Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Probe vorab mit einer Metallschicht überzogen, welche die Elektronen reflektiert. Deren Detektion gibt dann Aufschluss über die Oberflächenstruktur.

2.2.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Proben, welche mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht werden sollten, mussten vorab fixiert, entwässert, gehärtet, ultradünn geschnitten und kontrastiert werden. Im Anschluss wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einem 120kV „Tecnai 12 Bio Twin“ angefertigt, ausgestattet mit der CCD-Kamera „Mega View II“. Die Bilddaten im „tif“-Fileformat wurden mit der „iTEM“-Software aufgenommen.

2.2.4.1.1 Agaroseeinbettung von Zellen

Die Agaroseeinbettung von Zellkulturproben ermöglichte die Portionierung der aufkonzentrierten Zellen und hält sie in Lösung zusammen.

Hierfür wurden die adhärenen Zellen in 10cm Petrischalen ausplattiert, wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben, und nach 24 Stunden mittels Calciumphosphat-Methode (Abschnitt 2.2.2.1.2.2) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen kurz mit PBS gespült, mit 2.5% Glutaraldehyd (für Eponeinbettung, Abschnitt 2.2.4.1.2) oder 4% Paraformaldehyd (für Lowicryleinbettung, Abschnitt 2.2.4.1.3) in 0.05M Hepes Puffer fixiert und bei 4°C gelagert.

Für die Einbettung von Zellen in *Low melting point* Agarose wurden diese mittels Zellschaber vom Petrischalenboden gelöst, in ein 15ml Falcon Tube überführt und bei 4000Upm für zehn Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit gekühltem 0.05M Hepes Puffer gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und erneut abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und das Pellet im Wasserbad auf 40°C temperiert. Nach dem Mischen des Zellpellets mit einem gleichen Volumen an 3%iger *Low melting point* Agarose in Aqua dest. wurde das Gemisch im warmen Zustand bei 15.000Upm für zehn Minuten abzentrifugiert und zum vollständigen Erkalten auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Pellet aus dem Eppendorfgefäß gelöst, mit einer Rasierklinge die überschüssige Agarose entfernt und zu kleinen Blöckchen mit einer Kantenlänge von etwa 2mm zugeschnitten. Diese Probengröße ermöglichte eine gleichmäßige und gute Penetration der Zellen während der Einbettung. Die Blöckchen wurden erneut mit 3%iger *Low melting point* Agarose dünn überschichtet, um dem Zellverband zu fixieren. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in Fixativ bis zur Einbettung in Epon (Abschnitt 2.2.4.1.2) oder Lowicryl (Abschnitt 2.2.4.1.3).

2.2.4.1.2 Eponeinbettung mittels Einbettungsautomat Leica EM TP

Epon ist ein Kunstharz und gehört zu den Epoxidharzen. Als Epoxid enthält es Epoxygruppen (-HC—CH₂), welche die Grundlage für vernetzte, unlösliche Kunststoffe bilden. Allgemein werden bei Kunstharzeinbettungen flüssige bis visköse Harze eingesetzt, die unter Wärmeeinwirkung oder UV-Licht zu einer harten aber schneidbaren Substanz auspolymerisieren. Die Einbettung dient der Strukturhaltung und Stabilisierung der Probe, und ermöglicht das Anfertigen von bis zu 70nm dünnen Probenschnitten.

Für die Einbettung wurden die bei 4°C in Fixativ gelagerten Agaroseprobenblöckchen (Abschnitt 2.2.3.2.2 und 2.2.4.1.1) dreimal in 0.05M Hepes Puffer gewaschen und mit 1% Osmiumtetroxid in Aqua bidest. dunkel für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dies dient der Nachfixierung und Kontrastverstärkung bei biologischen Proben. Nach zweimaligen Waschen mit Aqua bidest. für jeweils fünf Minuten erfolgte die Einbettung bei Raumtemperatur mittels Einbettautomaten „Leica EM TP“. Das Einbettprotokoll ist in Tabelle 22 hinterlegt. Im Anschluss wurde je ein Probenblöckchen in eine Beamkapsel überführt und mit frischem Epon gefüllt. Die Polymerisation des Epoxidharzes erfolgte bei 60°C im Wärmeschrank für 48 Stunden. Die Proben konnten in den Beamkapseln, bestehend aus Gelatine, direkt mittels Ultramikrotom geschnitten werden (Abschnitt

2.2.4.1.5). Epon setzte sich wie folgt zusammen und Reste wurden bei -20°C gelagert (Luft, 1961).

Eponansatz nach Luft: 23,52g Glycidether (Komponente A)
 12,35g DDSA (Komponente B)
 14,13g MNA (Härter)

⇒ gut mischen mittels Magnetrührer für etwa 30min

0,65g DMP-30 (Beschleuniger)

⇒ gut mischen für etwas 20min

Tabelle 22: Einbettprotokoll für den Einbettautomaten Leica EM TP

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationszeit
Kontrastierung	Tannin 0,1% in 0,05M Hepes	30min
Waschen	2x Na ₂ SO ₄ 1% in 0,05M Hepes	je 10min
	3x Aqua bidest.	je 10min
Kontrastierung	Uranylacetat 2% in Aqua bidest.	2h
Dehydrierung	Ethanol 30%	30min
	Ethanol 50%	30min
	Ethanol 70%	30min
	Ethanol 95%	1h
	2x Ethanol absolut	je 1h
	2x Propylenoxid	je 30min
Infiltration	Propylenoxid / Epon 2+1	3h
	Propylenoxid / Epon 1+1	3h
	Propylenoxid / Epon 1+3	8h
	2x Epon	je 2h

2.2.4.1.3 Lowicryleinbettung

Lowicryl[®]HM20 ist ein hoch quervernetzendes, hydrophobes, auf Acrylat- und Methylacrylat-basierendes Einbettmedium. Es weist eine geringe Viskosität bei -35°C auf und photopolymerisiert unabhängig von der Temperatur unter der Einwirkung von UV-Licht (360nm). Diese Einbettungsmethode wird als fortschreitende Temperatursenkungsmethode (*progressive lowering temperature*, PLT) bezeichnet, da die Temperatur schrittweise reduziert wird, während die Konzentration der Dehydrierungsagens Ethanol steigt. Dabei liegt die Temperatur immer über dem Gefrierpunkt der zuvor verwendeten Ethanolkonzentration, welche das Probenblöckchen bereits durchsogen hat (Carlemalm et al., 1985).

Tabelle 23: Einbettprotokoll für die PLT mit Lowicryl[®]HM20

Arbeitsschritt	Lösung	Temperatur / Ort	Inkubationszeit
Waschen	3x 0.05M Hepes	Raumtemperatur	je 10min
Dehydrierung	Ethanol 30%	0°C / auf Eis	30min
	Ethanol 50%	-20°C / Gefrierfach	1h
	Ethanol 70%	-20°C / Gefrierfach	1h
	Ethanol 95%	-35°C / Gefriersubstitutionsanlage	1h
	2x Ethanol absolut	-35°C / Gefriersubstitutionsanlage	je 1h
Infiltration	Ethanol absolut / HM20 1+1	-35°C / Gefriersubstitutionsanlage	1h
	Ethanol absolut / HM20 1+2	-35°C / Gefriersubstitutionsanlage	1h
	HM20	-35°C / Gefriersubstitutionsanlage	über Nacht
	HM20	-35°C / Gefriersubstitutionsanlage	8h
Indirekte UV-Polymerisation	HM20	-35°C / Gefriersubstitutionsanlage	über Nacht
UV-Polymerisation mit stufenweiser Temperaturerhöhung		-30°C / Gefriersubstitutionsanlage	2h
		-20°C / Gefriersubstitutionsanlage	2h
		-10°C / Gefriersubstitutionsanlage	2h
		-0°C / Gefriersubstitutionsanlage	2h
		Raumtemperatur	über Nacht

Für die Einbettung (Tabelle 23) wurden die bei 4°C in Fixativ gelagerten Agaroseprobenblöckchen (Abschnitt 2.2.4.1.1) jeweils in ein 0,5ml Save-Lock

Eppendorfgesäß überführt und mit einem feinen Edelstahlnetzchen am Boden des Gefäßes fixiert. Sie verhindern den Verlust der Probe bei einem schnellen Lösungswechsel während der Tieftemperatureinbettung mittels Gefriersubstitutionsanlage „Blazers FSU 010“ von BAL-TEC. Die Lösungen wurden jeweils auf ihre Gebrauchstemperatur vorgekühlt. Vor der indirekten Polymerisation, bei der das UV-Licht ausschließlich durch Reflektion am Behälterboden direkt auf das Probenblöckchen trifft, wurden mit Bleistift beschriftete Etiketten aus Papier eingesetzt. Die endgültige Polymerisation erfolgt durch eine direkte Bestrahlung der Probe mit UV-Licht. Anschließend wurden die Proben mit einer Rasierklinge aus dem Eppendorfgesäß gelöst und mittels Ultramikrotomie (Abschnitt 2.2.4.1.5) ultradünn geschnitten.

<u>Lowicrylansatz:</u>	5,96g	Crosslinker D
	34,04g	Monomer E
		⇒ 50ml Falcon Tube vorsichtig schwenken
	0,2g	Initiator C
		⇒ 50ml Falcon Tube vorsichtig schwenken

2.2.4.1.4 Gridbeschichtung

Grids sind kleine, runde Kupfer-, Nickel- oder Gold-Netzchen, die vergleichbar zu Objektträgern in der Lichtmikroskopie als Träger für Probenschnitte dienen. Zur mechanischen Stabilisierung des Probenschnittes im Elektronenstrahl werden die Grids vor ihrer Verwendung mit Plastikfilmen aus Pioloform oder Formvar überzogen und zur Stabilisierung und besseren Hitzeableitung mit Kohle bedampft.

2.2.4.1.5 Trimmen und Ultramikrotomie

Vor dem Schneiden der Proben musste das überschüssige Einbettmedium so gut wie möglich entfernt werden. Hierfür wurden die Probenblöcke im Trimmer „EM Rapid“ durch einen Diamanten zu einer Trapez-Form mit abgeschrägten Seiten gefräst. Im Anschluss wurde die Probe in das Ultramikrotom „Ultracut S/UCT“ eingespannt und mit einem Diamantmesser Ultra 45° semi- (1µm) oder ultradünn (70nm, silberfarben) geschnitten. Die Schnitte wurden auf die beschichtete Seite der Grids übertragen. Überschüssiges Wasser wurde mit fussselfreiem Filterpapier entfernt und die Grids unter einer Lampe getrocknet. Die Lagerung erfolgte in einer Gridbox.

2.2.4.1.6 Immunogoldmarkierung

Zum immunologischen Nachweis von spezifischen Proteinen wurde auch hier die indirekte Zwei-Schritt-Methode (Abbildung 15) angewendet. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das zu detektierende Antigen und wird über einen Sekundärantikörper, konjugiert mit 5 bis 10nm Goldpartikeln, im Elektronenmikroskop visualisiert. Für die Zugänglichkeit der Antigene wurden die Proben mit 4%igem Paraformaldehyd und 0.1%igem Glutaraldehyd in 0.05M Hepes Puffer fixiert und in Lowicryl®HM20 eingebettet (Abschnitt 2.2.4.1.3). Zudem wurden die Schnitte auf Nickelnetzchen überführt, um das Herauslösen von Kupfer durch Salzlösungen und den daraus resultierenden Niederschlag auf die Schnitte bei der Verwendung von Kupfernetzchen zu vermeiden.

Die Nickelgrids Hexa 300 wurden für eine Stunde mit den Lowicrylschnitten nach unten auf einem Tropfen Immuno-EM Blockpuffer (Tabelle 11) inkubiert, um unspezifische Antigene zu blocken. Alle weiteren Schritte der Immunogoldmarkierung erfolgten ebenfalls auf Tropfen mit einem Volumen von 20 bis 30µl. Nach dem Abziehen des überschüssigen Immuno-EM Blockpuffers mit einem feuchten Filterpapier wurden die Grids in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C auf in Immuno-EM Blockpuffer verdünntem Primärantikörper (Tabelle 24) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Grids viermal für fünf Minuten auf Immuno-EM Blockpuffer gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf in Immuno-EM Blockpuffer verdünnten, Gold-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 24) inkubiert.

Tabelle 24: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunogoldmarkierung und deren Verdünnung (Hersteller: Tabelle 8 und 9)

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Rattenserum anti-CA Protein HERV-K113	1:1000	Ziege anti-Ratte IgG (H+L), Au 5nm	1:20
Rattenserum anti-p15 Protein HERV-K113	1:1000	Ziege anti-Ratte IgG (H+L), Au 5nm	1:20
Ziege anti-GFP	1:300	Hase anti-Ziege IgG (H+L), Au 10nm	1:20
		Hase anti-Ziege IgG (H+L), Au 5nm	1:20

Nach fünfminütigem Waschen auf Immuno-EM Blockpuffer erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS und eine Nachfixierung mit 1%igem Glutaraldehyd in 0.05M Hepes Puffer für 15 Minuten. Es diente der Stabilisierung der gebundenen Antikörperkomplexe

für die anschließende Kontrastierung und Kohlebedampfung. Im Gegensatz zu der in Abschnitt 2.2.4.1.7 beschriebenen Kontrastierung beträgt die Inkubationszeit auf dem Tropfen der Uranylacetat-Lösung für immunogoldmarkierte Probenschnitte nur fünf Minuten.

2.2.4.1.7 Kontrastierung und Kohlebedampfung

Biologische Proben weisen aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Elementen niedriger Ordnungszahl eine geringe Streuung von Elektronen auf. Dies führt zu kontrastarmen Bildern in der Transmissionselektronenmikroskopie. Zur Steigerung des Kontrastes und der Signalausbeute werden die Proben mit Schwermetallen wie Osmiumtetroxid, Uranylacetat oder Bleizitrat behandelt.

Für die Doppelkontrastierung wurden Grids mit den Ultradünnschnitten nach unten für 20 Minuten auf einem Tropfen 2%igen Uranylacetats in Aqua bidest. bei Dunkelheit inkubiert und anschließend dreimal kurz in Aqua bidest. gewaschen. Nach dem Abziehen des überschüssigen Wassers inkubierten die Schnitte für zwei Minuten auf einem Tropfen von 0.2%igem Bleizitrat in 0.02M Natriumhydroxid zwischen Natriumhydroxidplättchen. Natriumhydroxid bindet das Kohlendioxid in der Luft, das ansonsten mit Bleizitrat einen unlöslichen Niederschlag bildet, der sich auf die Schnitte legt. Die Schnitte wurden mit 0.02M Natriumhydroxid, 0.01M Natriumhydroxid und dreimal mit Aqua bidest. gewaschen. Überschüssiges Wasser wurde von den Grids mit fusselfreiem Filterpapier entfernt und die Schnitte unter einer Lampe getrocknet. Zur Kontrastverstärkung und besseren Wärmeableitung im Elektronenstrahl wurden die Proben unter Anwendung des Vakuumbedampfers „EMITECH K950X“ mit einer dünnen Kohleschicht bedampft.

2.2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Proben fixiert, entwässert und mit einer Schwermetallschicht überzogen. Anschließend wurde die Rasterelektronenmikroskopie mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (FE-REM) „Leo Gemini 1530“ durchgeführt. Es ist ausgestattet mit einem In-lense-Detektor, der sich direkt im Strahlengang befindet und die Sekundärelektronen auffängt. Der In-lense-Detektor führt im Gegensatz zu normalen SE-Detektoren zu einer höheren Auflösung und Sekundärelektronenausbeute. Der verwendete Arbeitsabstand lag zwischen 3-4mm, die angelegte Spannung bei 3kV und die Aperturblende hatte einen Durchmesser von 30µm.

2.2.4.2.1 Kritische Punkt-Trocknung

Für die Rasterelektronenmikroskopie werden die zu untersuchenden Proben mit Hilfe der Kritischen Punkt-Trocknung (Abbildung 17) entwässert. Dabei nutzt man aus, dass Substanzen im gasförmigen und flüssigen Zustand bei einer bestimmten Temperatur und einem bestimmten Druck die gleiche Dichte aufweisen und sich somit die Phasengrenze auflöst. Der Kritische Punkt von Wasser liegt bei einer Temperatur von 374,12°C und einem Druck von 221,2bar, der von Kohlendioxid bei 31°C und 73,8bar.

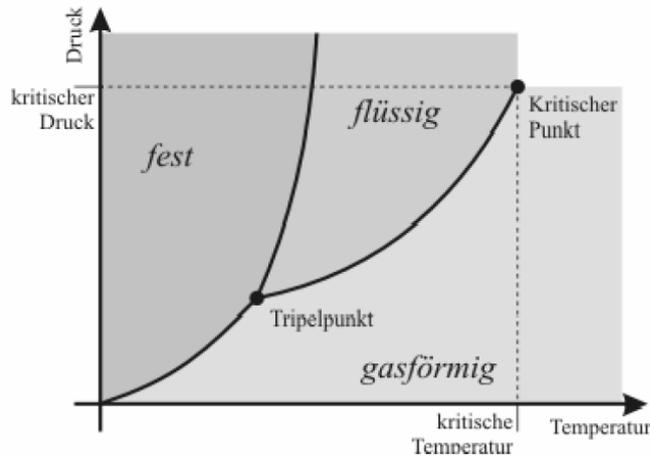


Abbildung 17: Phasendiagramm und Kritischer Punkt

Das Phasendiagramm zeigt alle möglichen Phasenzustände eines Stoffes, abhängig von Temperatur und Druck. Am Tripelpunkt, dem Dreiphasenpunkt, sind alle drei Phasenzustände im Gleichgewicht. Am kritischen Punkt verschwinden die Dichteunterschiede zwischen flüssigen und gasförmigen Aggregatzustand. (Quelle: <http://www.naturalium.de/Sonstiges/Elektronenmikroskopischer%20Kurs.pdf>, Zugriff am: 14.04.2011)

Die adhären, transfizierten Zellen wurden auf Deckgläschen (Durchmesser: 10mm) in einer 12-Well-Platte kultiviert und transfiziert (Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.1.2). Die Fixierung der Proben erfolgte mit 2.5%igem Glutaraldehyd in 0.05M HEPES Puffer. Vor der Kritischen Punkt-Trocknung wurden die Proben dreimal mit Aqua bidest. gewaschen und mittels Ethanolreihe (EtOH 30%, 50%, 70%, 90%, 96% je 15 min; EtOH absolut 2 x 30 min) entwässert. Anschließend wurden sie gut bedeckt mit Ethanol absolut in den Kritischen Punkttrockner „Blazers CPD 030“ eingesetzt und flüssiges Kohlendioxid bei einer Temperatur von 10°C und einem Druck von 50bar eingeleitet. Durch mehrfaches Mischen und Gas Ablassen wurde überschüssiges Ethanol herausgewaschen und die Probe in reines Kohlendioxid überführt. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 31°C und der Druck auf 73,5bar erhöht, bis die Phasengrenze verschwand. Das Ethanol in der Probe wurde so gegen flüssiges Kohlendioxid ausgetauscht und die Probe vollständig entwässert, ohne zu kollabieren oder sich morphologisch zu verändern. Die sehr empfindliche Probe wurden mit 12mm Leit-Tabs auf einen Stiftprobenteller aufgeklebt.

2.2.4.2.2 Metallbeschichtung (Sputtern)

Beim Sputtern wird die Probe mit einer dünnen Schwermetallschicht bedampft. Diese elektronenreflektierende Schicht führt zur Bildentstehung und dient der Wärmeableitung der Probe. Die Metallschicht sollte nicht zu dick aufgedampft werden, da ansonsten Oberflächendetails der Probe verlorengehen können.

Die Probe samt Probentisch wurde in die „SEM Coating Unit E5100“ eingesetzt und im Vakuum mit einem Gold-Palladium-Gemisch 3nm dick bedampft. Dabei wurde eine Spannung von 20mA angelegt und durch die Kathodenzerstäubung Gold- und Palladiumpartikel aus der Gold-Palladium-Platte herausgelöst. Zudem wurde in die Probenkammer Argon-Gas eingeleitet, das zur Streuung der Gold- und Palladiumpartikel führte. Durch die Ablenkung der Partikel wurde die Probe in allen Winkeln homogen bedampft.

2.2.5 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM)

Unter der Korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie versteht man die Untersuchung ein- und derselben Probe durch Licht- und Elektronenmikroskopie. Dabei wird der zu untersuchende Bereich mittels Lichtmikroskopie identifiziert, um anschließend unter Zuhilfenahme elektronenmikroskopischer Verfahren detaillierte Einblicke in die Probenmorphologie zu erhalten. Bei dieser noch sehr jungen Methode spielt die Relokalisation des zu untersuchenden Bereiches eine entscheidende Rolle.

2.2.5.1 Korrelative Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie

Die Nutzung spezifischer Probensubstrate als auch mögliche Relokalisationsmethoden wurden mit der Unterstützung von Dr. Michael Laue am Robert Koch-Institut etabliert.

2.2.5.1.1 Probensubstrat: μ Slide

Für die korrelative Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Zellen in einem speziellen, sterilen, 18-Well-Plastikobjektträger (Abbildung 18A) mit einem 1-2 μ m dicken PEN-Membranboden ausplattiert. Dieser μ -Slide wurde von der Firma ibidi für Lasermikrodissektion entwickelt. Er eignet sich jedoch auch für die korrelative Mikroskopie, da Diamantmesser die PEN-Membran problemlos schneiden und die 18-Well verschiedene Probenansätze in einem Versuch ermöglichen. Jedes Well fasst ein Volumen von 30 μ l und kann durch in den Plastikrahmen geprägten Zahlen in der Horizontalen und Buchstaben in der Vertikalen eindeutig identifiziert werden. Zudem

weist die PEN-Membran die gleichen optischen Eigenschaften auf, wie ein Glasobjektträger.

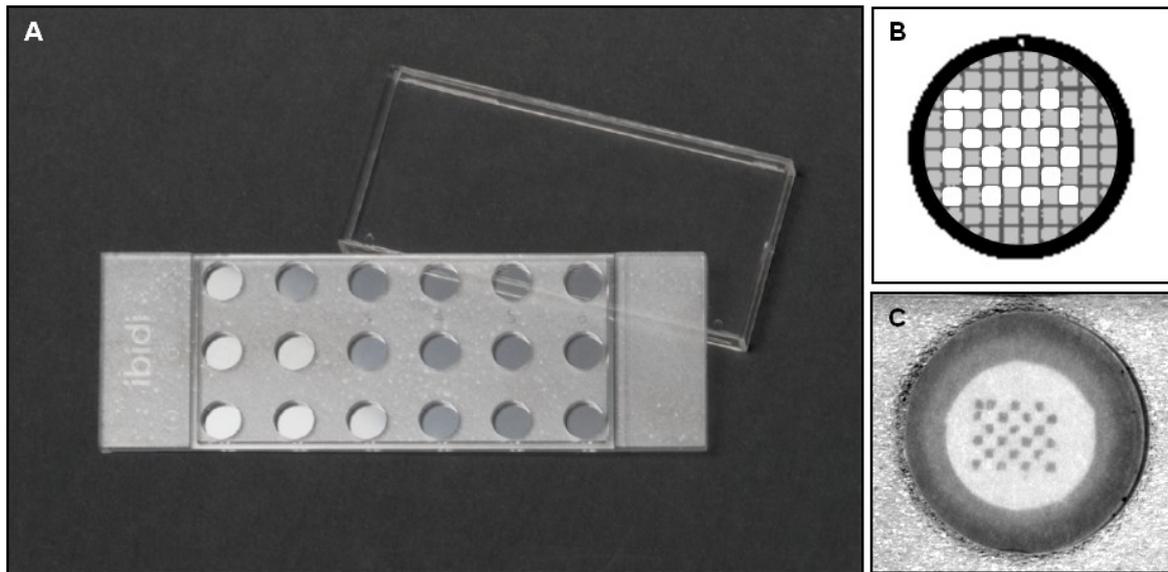


Abbildung 18: 18-Well- μ Slide mit PEN-Membranboden, Gridschablone und Kohlekoordinatenmuster

A: 18-Well- μ Slide mit PEN-Membranboden und Deckel. Die Maße des μ -Slides entsprechen denen eines Glasobjektträgers. B: Schema der verwendeten 100 Mesh Gridschablonen für das Aufdampfen der Kohleschachbrettmuster. Die weißen Quadrate zeigen die perforierten Maschen. C: Ein Well eines μ -Slides nach der Bedampfung mit einer dünnen Kohleschicht und mit bloßem Auge gut sichtbarem Kohleschachbrettmuster.

Vor der Verwendung des μ -Slides wurden die PEN-Membranböden zuerst mit einem dünnen Kohleschachbrettmuster bedampft (Abbildung 18C). Die dafür notwendigen Gridmatrizen wurden aus 100 Mesh Kupfer-Grids mit kohlebedampften Pioloformfilm angefertigt. Unter einem Stereomikroskop wurde dann jede zweite Masche mit einer sehr feinen Kanüle durchstochen. Zudem wurde in der linken oberen Ecke des Musters eine Modifikation vorgenommen (Abbildung 18B), um eine eindeutige Relokalisation zu gewährleisten. Die Matrizen wurden in den Wells des μ -Slides mit gleicher Ausrichtung platziert. Das daraus resultierende Kohlemuster auf der PEN-Membran nach der Kohlebedampfung durch den Vakuumbedampfer „EMITECH K950X“ zeigte ein negatives Abbild der Gridmatrize (Abbildung 18C). Im Anschluss wurde der μ -Slide mit Druckluft gereinigt und durch eine einstündige UV-Bestrahlung unter der Sterilbank „Thermo HeraSafe“ keimfrei gemacht. Jedes Well wurde zusätzlich durch das Eintrocknen von 20 μ l 0.01M Essigsäure mit 0.1mg Kollagen aus Kälberhaut beschichtet. Sowohl die homogene dünne Kohleschicht, als auch die Kollagenbeschichtung, ermöglichten eine bessere Adhärenz der Zellen sowie einen homogenen Zellrasen.

2.2.5.1.2 Ausplattieren und Transfizieren der Zellen

Für die korrelative Mikroskopie wurden 50.000 HeLaSS6 Zellen/ml oder 150.000 HEK293T Zellen/ml ausgesät. Dafür wurden die gewünschten Zellzahlen in einem Milliliter komplementierten D-MEM gut resuspendiert und je 30 μ l des Ansatzes in jedes Well überführt. Nach etwa 28 Stunden wurden die adhärenen Zellen mittels PolyFect Transfektionsreagenz über Nacht transfiziert (Abschnitt 2.2.2.1.2.1). Vor dem Auftragen von 18 μ l Transfektionsansatz pro Well wurde das Medium in den Wells durch 12 μ l vorgewärmtes, frisches Zellkulturmedium ersetzt. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz abgenommen, komplementiertes Opti-MEM auf die Zellen gegeben und diese für weitere ein bis zwei Stunden bis zur Lebendzellmikroskopie im Brutschrank inkubiert.

2.2.5.1.3 Lebendzellmikroskopie und Fixierung

Die Lebendzellmikroskopie erfolgte unter gleichen Bedingungen, wie bereits im Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben. Für die Generierung der Bilddaten wurde das 60fache Objektiv (NA 1.40) herangezogen und Bereiche der Probe sowohl im Hellfeld als auch im Fluoreszenzkanal aufgenommen. Diese Bereiche wurden zudem in ein Koordinatensystem eingetragen, um die Relokalisation der zu untersuchenden Bereiche zu erleichtern. Pro Well wurden nur ein bis zwei Bereiche aufgenommen um die Probe zu schonen. Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit 2.5%igem Glutaraldehyd in 0.05M Hepes Puffer für 30 Minuten im Brutschrank fixiert und bis zur Einbettung in einer feuchten Kammer bei 4°C im Fixativ gelagert.

2.2.5.1.4 Handeinbettung in Epon

Die Handeinbettung der μ -Slide Proben in Epon für die CLEM wurde bei Raumtemperatur und nach dem in der Tabelle 25 angegebenen Einbettprotokoll durchgeführt. Alle Lösungen wurden durch das Umkippen des μ -Slides auf ein Papiertuch abgezogen, um einen Zellverlust oder die Perforation der PEN-Membran durch eine Pipette zu vermeiden. Dabei stellte sich heraus, dass der μ -Slide mit dem PEN-Membranboden Propylenoxid beständig ist, im Gegensatz zum Deckel des μ -Slides.

Tabelle 25: Einbettprotokoll für die Handeinbettung bei Raumtemperatur in Epon

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationszeit
Waschen	3x 0.05M Hepes	je 2min
Kontrastierung + Nachfixierung	Osmiumtetroxid 1% in Aqua bidest., dunkel	1h
Waschen	6x Aqua bidest.	je 1min
Kontrastierung	Tannin 0,1% in 0,05M Hepes	30min
Waschschrift	4x Na ₂ SO ₄ 1% in 0,05M Hepes	je 5min
	6x Aqua bidest.	je 5min
Kontrastierung	Uranylacetat 2% in Aqua bidest., dunkel	1h
Dehydrierung	Ethanol 30%	15min
	Ethanol 50%	15min
	Ethanol 70%	15min
	Ethanol 95%	15min
	3x Ethanol absolut	je 15min
	2x Propylenoxid	je 5min
Infiltration	Propylenoxid / Epon 2+1	30min
	Propylenoxid / Epon 1+1	30min
	Propylenoxid / Epon 1+3	1h
	Epon	1h
Polymerisation	Epon	48h, 60°C

2.2.5.1.5 Trimmen, Ultramikrotomie und Kontrastierung der CLEM-Proben

Die Proben mussten vor dem Trimmen und der Ultramikrotomie aus dem μ -Slide gelöst werden. Dafür wurden die mit polymerisierten Epon gefüllten Wells von oben und von unten an der Grenzfläche zum Plastikrahmen mit einer Rasierklinge umritzt. Die Proben konnten so mit einer Kombizange aus dem μ -Slide gebrochen werden, ohne sie zu beschädigen. Sie wurden im Anschluss mit der PEN-Membran nach oben auf einen Epondummi mit Acrylatkleber „Roti@coll 1“ oder Epon aufgeklebt und durch Trimmen auf den zu untersuchenden Bereich (Abschnitt 2.2.4.1.5) minimiert. Die PEN-Membran wurde durch mehrere Ultradünnschnitte (Abschnitt 2.2.4.1.5) entfernt. Beim Eintritt in die Probe wurde zudem ein 1 μ m dicker Semidünnschnitt angefertigt. Dieser wurde auf einen Objektträger überführt, auf einer Heizplatte getrocknet und mit Toluidinblau angefärbt. Von diesen Schnitten wurden Übersichtsaufnahmen angefertigt. Sie erleichterten die

Orientierung anhand der Zellverteilung im Ultradünnschnitt. Nach dem Semidünnschnitt wurden mehrere Ultradünnschnitte angefertigt, kontrastiert und mit einer dünnen Kohleschicht bedampft (Abschnitt 2.2.4.1.7). Diese konnten im Anschluss mittels Transmissionselektronenmikroskopie (Abschnitt 2.2.4.1) analysiert werden.

2.2.5.2 Korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie

Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Kazimierz Madela am Robert-Koch-Institut etabliert (Madela et al., 2014).

2.2.5.2.1 Probensubstrat: μ Dish

Für die Korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie wurden die Zellen in einer sterilen Petrischale μ Dish Grid500^{high} mit Deckel und einem Durchmesser von 40mm ausplattiert. Das in den Schalenboden eingeprägte Koordinatenmuster und die Zellverteilung ermöglichten die Relokalisation der zu untersuchenden transfizierten Zellen (Abbildung 19). Die spezielle Bodenbeschichtung ibiTreat von ibidi ermöglichte während der Probenpräparation und Mikroskopie eine gute Adhärenz der Zellen. Zudem weist der Schalenboden die gleichen optischen Eigenschaften auf wie ein Glasdeckgläschen.

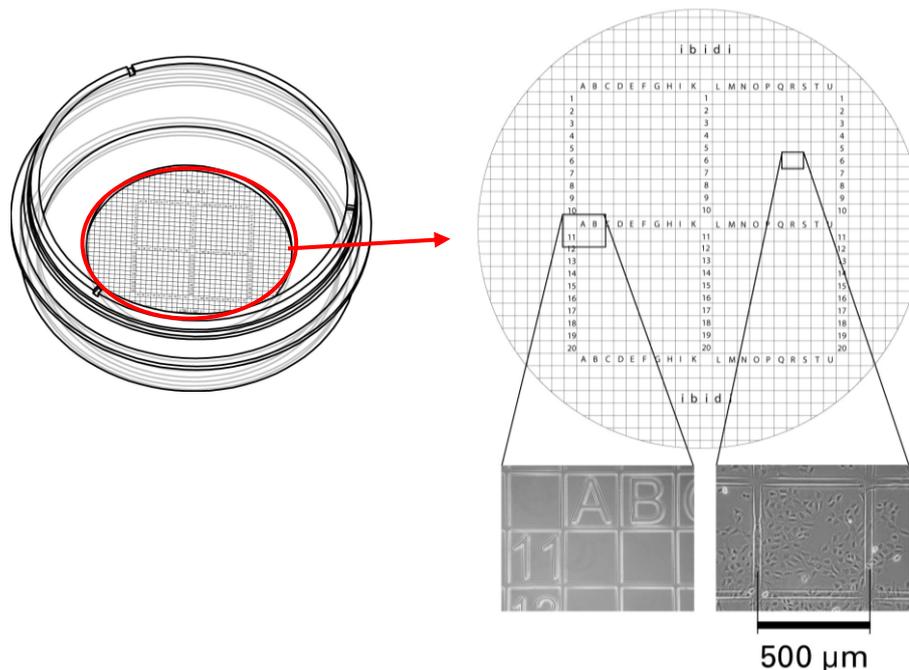


Abbildung 19: μ Dish Grid500^{high} Koordinatenmuster

Das Koordinatenmuster besteht aus vier großen Quadranten, wobei jedes nochmals in zehn mal zehn Quadrate mit einer Kantenlänge von je 500µm unterteilt ist. Diese können durch Buchstaben in der Horizontalen und Zahlen in der Vertikalen eindeutig identifiziert werden. (modifiziert, Quelle: http://www.ibidi.de/products/disposables/D_8X1XX_Dish_Grid500/IN_8XXXX_Grid500.pdf, Zugriff am: 14.04.2011)

2.2.5.2.2 Ausplattieren und Transfektion der Zellen

Für die CLEM wurden die verwendeten Zellen, wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben, in komplementiertem D-MEM (Tabelle 12) resuspendiert und vereinzelt. Je 150.000 HeLaSS6-Zellen oder 250.000 HEK293T-Zellen wurden ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach etwa 30 Stunden wurden die Zellen mittels PolyFect Transfektionsreagenz über Nacht transfiziert (Abschnitt 2.2.2.1.2.1). Ein μ Dish verhielt sich dabei wie ein Well einer 6-Well-Platte. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz abgenommen und komplementiertes Opti-MEM (Tabelle 12) auf die Zellen gegeben und für weitere ein bis zwei Stunden bis zur Lebendzellmikroskopie im Brutschrank inkubiert.

2.2.5.2.3 Lebendzellmikroskopie und Fixierung

Die Lebendzellmikroskopie erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bereits im Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben. Für die Generierung der Bilddaten wurde das 60fache Objektiv (NA 1.40) herangezogen und einige Bereiche der Probe sowohl im Hellfeld als auch im Fluoreszenzkanal aufgenommen. Die mikroskopierten Bereiche wurden in ein Schema des Schalenbodens eingetragen, um eine spätere Relokalisation zu erleichtern. Pro μ Dish wurden etwa zehn Bereiche aufgenommen. Sofort im Anschluss wurden die Zellen mit 2.5%igem Glutaraldehyd in 0.05M Hepes Puffer für 30 Minuten im Brutschrank fixiert und in einer feuchten Kammer bei 4°C bis zur weiteren Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie gelagert.

2.2.5.2.4 Präparation und Rasterelektronenmikroskopie

Der Boden wurde aus dem μ Dish herausgebrochen und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Die Kritische Punkt-Trocknung und das Sputtern erfolgte wie in den Abschnitten 2.2.4.2.1 und 2.2.4.2.2 beschrieben. Auch die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte, wie bereits beschrieben (Abschnitt 2.2.4.2). Anhand der Koordinaten des μ Dish-Bodens konnten die zu untersuchenden Zellen identifiziert werden.

3 Ergebnisse

Komplexe Retroviren assemblieren zu viralen Partikeln im Zytoplasma (A/B-Typ) oder an der Zellmembran (C-Typ) der infizierten Zellen nach der Expression der viralen Struktur- und Funktionsproteine (Nermut und Hockley, 1996; Jouvenet et al., 2006). Hierbei reicht das Polystrukturprotein Gag der Retroviren aus, um virusartige Partikel (virus-like particles, VLPs) zu formen (Swanstrom und Wills, 1997; Larson et al., 2005). Wird jedoch während der Assemblierung auch die virale Protease in die Partikel eingebaut, so erfolgt nach deren Freisetzung die Reifung durch die Prozessierung des Polystrukturproteins Gag in die einzelnen viralen Strukturproteine (Beimforde et al., 2008; George et al., 2011).

HERV-K(HML-2) gehört ebenfalls zu den komplexen Retroviren und wurde im Rahmen dieser Arbeit bezüglich der Assemblierung, des Buddings und der Freisetzung charakterisiert. Zudem sollten funktionelle, fluoreszenzmarkierte, virale Partikel generiert werden, die für weitere lichtmikroskopische Studien von Interesse sind. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Polystrukturprotein Gag und dessen Assemblierung mit dem Hüllprotein Env (Hanke et al., 2009). Für diese Arbeit wurden insbesondere licht- und elektronenmikroskopische, aber auch molekularbiologische Methoden herangezogen.

3.1 Generierung Fluoreszenzprotein-markierter viraler HERV-K(HML-2) Partikel

Bereits aus der Literatur geht hervor, dass für lichtmikroskopische Untersuchungen der HERV-K(HML2) Assemblierung, Freisetzung und Reifung die Notwendigkeit besteht, die zu untersuchenden viralen Proteine und intrazellulären Strukturen mittels verschiedener Fluoreszenzproteine zu markieren (Brandenburg und Zhuang, 2007; Dale et al., 2011). Es hat den Vorteil, dass die markierten Proteine nach ihrer Expression dauerhaft sichtbar sind, ohne sie mittels Immunfluoreszenz anfärben zu müssen. Zudem wird eine lichtmikroskopische Beobachtung im lebenden System ermöglicht (Jouvenet et al., 2008).

3.1.1 Klonierung von oricoGagCherry und oricoGagEGFP

Für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten, lichtmikroskopischen Untersuchungen *in vivo* galt es oricoHERV-K113 Konstrukte zu generieren, die in der Expression Fluoreszenzprotein-markierter, viraler Gag-Proteine resultierten. Dabei diente HERV-K113 als Modelvirus für die HERV-K(HML-2) Familie. Es wurde auf das in der Arbeitsgruppe bereits vorliegende retrovirale Konstrukt CMV_{orico}HERV-K113

zurückgegriffen (Abbildung 20; Bannert et al., 2003; Beimforde et al., 2008). Das Konstrukt beruht auf der gesamten HERV-K113 Sequenz des BAC-Klones RP11-398B1 aus einer BAC-Bibliothek (Turner et al., 2001), das mit weiteren zehn, hochkonservierten, humanen HERV-K(HML-2) Sequenzen verglichen wurde, um daraus die mögliche Wildtypsequenz abzuleiten (Abschnitt 1.3.2, Hanke et al., 2009; George et al., 2011; Chudak et al., 2013). Eine anschließende Codonoptimierung der generierten Wildtypsequenz (oriHERV-K113) verstärkte dessen Proteinexpression. Das daraus resultierende originale (ori) und codonoptimierte (co) Konstrukt CMV_{ori}HERV-K113 wurde in den Vektor pcDNA3 kloniert und besitzt am N-terminalen Ende anstatt der 5'LTR einen "immediately early" Promotor des Cytomegalovirus (CMV_{ie}), der die Expression nochmals verstärkt (Beimforde et al., 2008; Hanke et al., 2009; George et al., 2011). Für das Konstrukt oricoGagHERV-K113 wurde die originale und codonoptimierte Sequenz von *gag* (oricogag) amplifiziert und in den pcDNA3 Vektor kloniert (Abbildung 20).

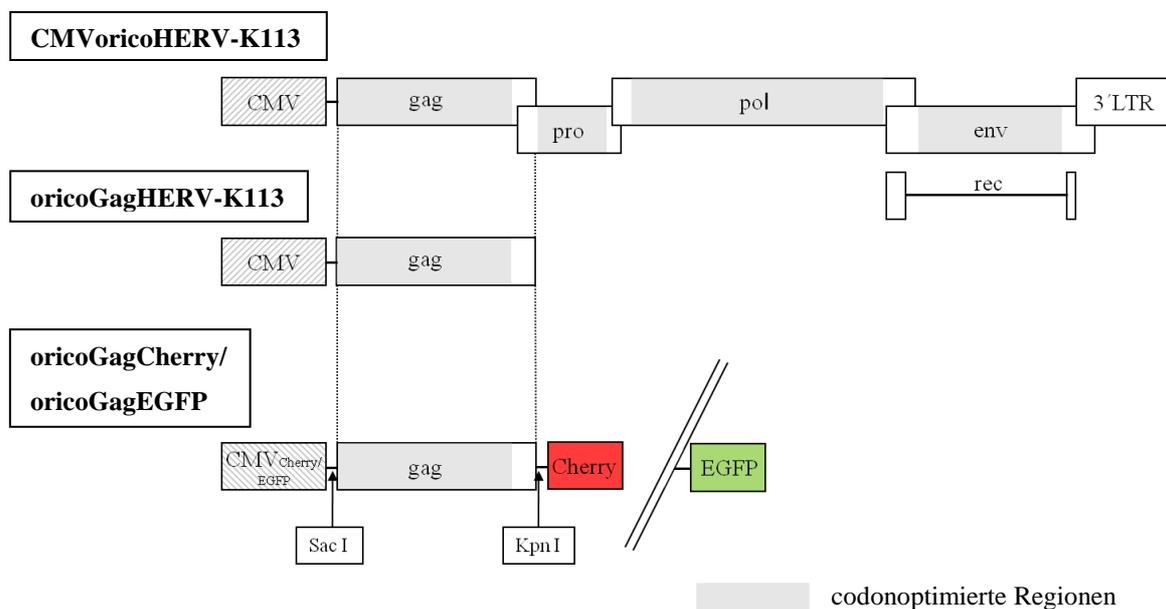


Abbildung 20: Schematische Darstellung der verwendeten oricoGag-Konstrukte

Die Konstrukte oricoGagHERV-K113 und CMV_{ori}HERV-K113 lagen bereits vor Beginn dieser Arbeit vor. Die Konstrukte oricoGagCherry und oricoGagEGFP wurden durch Amplifizierung und Ligation der *gag*-Sequenz in die Fluoreszenzplasmide pmCherry-N1 oder pEGFP-N1 eingefügt. Alle Konstrukte wiesen am 5' Ende den CMV_{ie}Promotor auf.

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurde die amplifizierte Sequenz *oricoGag* in die Fluoreszenzvektoren pmCherry-N1 beziehungsweise pEGFP-N1 inseriert. Daraus resultierten die Konstrukte *oricoGagCherry* und *oricoGagEGFP*, die am N-terminalen Ende ebenfalls einen CMV_{ie} Promotor aufweisen (Abbildung 20). Die Klonierung beider ermöglichte in den kommenden Versuchen eine Flexibilität bezüglich der Mehrfachtransfektion mit weiteren Fluoreszenzprotein-kodierenden Konstrukten. Für alle kommenden Versuche wurde auf diese codonoptimierten HERV-K(HML-2)-Sequenzen zurückgegriffen.

3.1.2 Untersuchung zur Expression, intrazellulären Verteilung und Assemblierung von Fluoreszenzprotein-markiertem Gag

Um mit den in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Konstrukten *in vivo* Untersuchungen bezüglich der HERV-K(HML-2) Assemblierung, Buddings und Freisetzung von viralen Partikeln durchzuführen, mussten diese vorab hinsichtlich ihrer Expression, fluoreszenzmikroskopischen Detektion sowie intrazellulären Verteilung geprüft werden.

3.1.2.1 Expressionskinetik und intrazelluläre Verteilung von Fluoreszenzprotein-markiertem Gag

Im ersten Schritt sollte mittels Lebendzellmikroskopie die Expressionskinetik, die Fähigkeit zur Fluoreszenz sowie die zeitabhängige Verteilung der viralen Fusionsproteine bestimmt werden, um spätere Versuche zeitlich genau zu planen. Die TIRF-Mikroskopie (Interne Totalreflektionsfluoreszenz-Mikroskopie) wurde zudem genutzt, um einen Aufschluss über die räumliche Nähe des Fusionsproteins zur Zellmembran zu geben, da laut Literatur HERV-K113 an der Zellmembran akkumuliert und assembliert (Chudak et al., 2013). Es wurden hierfür HEK293T-Zellen transfiziert und teils *in vivo* mittels Lebendzell- und TIRF-Mikroskopie untersucht.

Das in diesen Versuchen ermittelte Verteilungsmuster galt es in darauffolgenden Untersuchungen mit dem von unmarkierten HERV-K113 Gag zu vergleichen, um zu überprüfen, ob diese übereinstimmen. Es sollte Aufschluss geben, ob die viralen Fusionsproteine für weitere Studien bezüglich HERV-K(HML-2) brauchbar sind. Hierfür wurde die konfokale Laserscanningmikroskopie herangezogen, um die transfizierten und fixierten HEK-293T Zellen zu untersuchen. Zudem wurde unmarkiertes Gag vorab mittels kommerziell erhältlichen, Kapsidprotein-spezifischen Antikörper und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 568 markiert (Abschnitt 2.1.5).

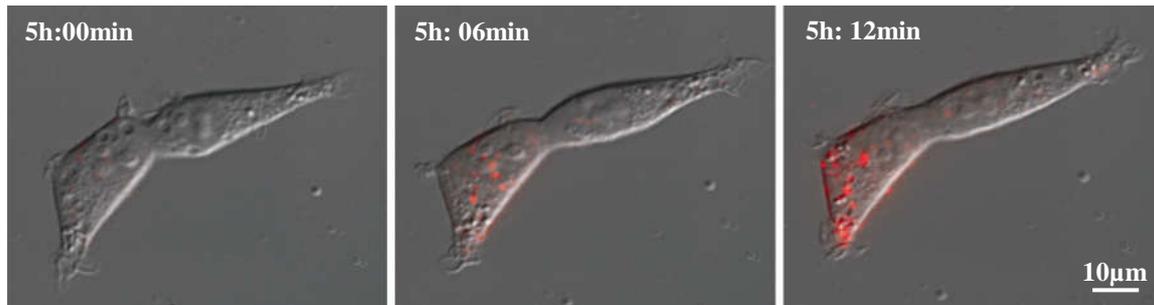


Abbildung 21: Beginnende Expression von GagCherry

Lebendzellmikroskopie von HEK293T-Zellen transfiziert mit oricoGagCherry (n = 5). Nach fünf Stunden (5h:00min) konnte das exprimierte Fluoreszenzprotein GagCherry schwach detektiert werden. Die Fluoreszenz stieg innerhalb von 12 min (5h:12min) schnell an (Film 1).

Wie auch für Fluoreszenzprotein-markiertes HIV-1 Gag beschrieben (Jouvenet et al., 2006, 2008), zeigten einige HEK293T-Zellen nach fünf Stunden, transfiziert mit oricoGagCherry, ein schwaches diffuses Fluoreszenzsignal des viralen Fusionsproteins in der Lebendmikroskopie. Innerhalb von 12 Minuten wies das gesamte Zellplasma einen Anstieg von diffuser Fluoreszenz auf und erste Akkumulationen des GagCherry-Proteins waren zu beobachten (Abbildung 21; Film 1). Diese häuften sich in den darauffolgenden Stunden vermehrt in der Zellperipherie an. Etwa 16 Stunden nach Transfektion konnte eine sehr starke Expression des Fusionsproteins detektiert werden (Film2). Aus Film 2 geht zudem hervor, dass nur noch wenige, aber stark verdichtete GagCherry-Akkumulationen von runder Form im Zytoplasma der Zellen zu finden waren. Eine grobe Einschätzung der räumlichen Lage der Akkumulationen konnte aufgrund der Fokusebene getroffen werden. Die Akkumulationen waren mobil oder stationär, wobei der Mobilitätszustand jederzeit wechseln konnte.

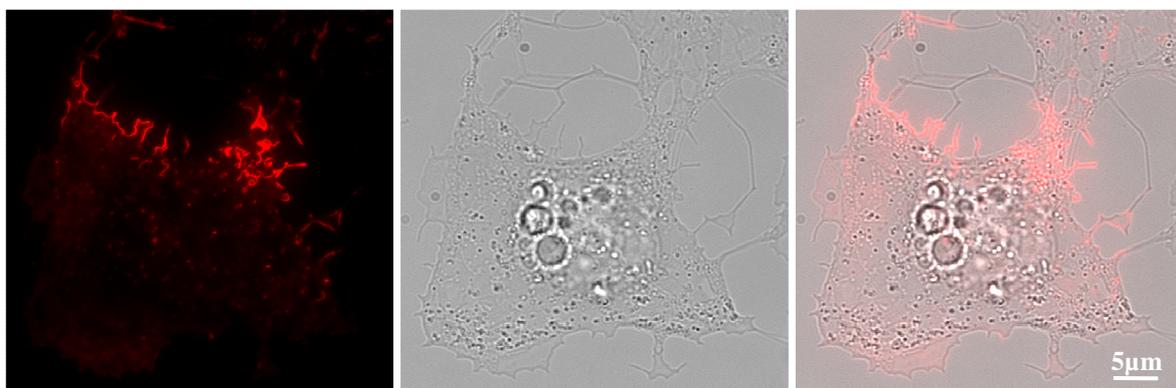


Abbildung 22: Fluoreszenzprotein-markiertes Gag akkumuliert an der Zellperipherie

HUH7-Zellen transfiziert mit oricoGagCherry nach 16 Stunden (n = 3). Mittels TIRF-Mikroskopie bei einem TIRF-Winkel von 85° (optische Schnittdicke: 56nm) konnte die Anhäufung von GagCherry an der Plasmamembran detektiert werden.

Mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie wurde nach 16 Stunden eine verstärkte Anhäufung von GagCherry an der Plasmamembran sichtbar, sowie ein geringes diffuses Signal im Zytoplasma (Abbildung 22). Die transfizierten Zellen zeigten nach 24 Stunden zudem fluoreszierende, fadenförmige Ausläufer auf der Zelloberfläche (Film 3). Das Fusionsprotein wies in den Versuchen eine sehr stabile Fluoreszenz über einen längeren Zeitraum auf und hatte keine toxische Wirkung auf die Zellen.

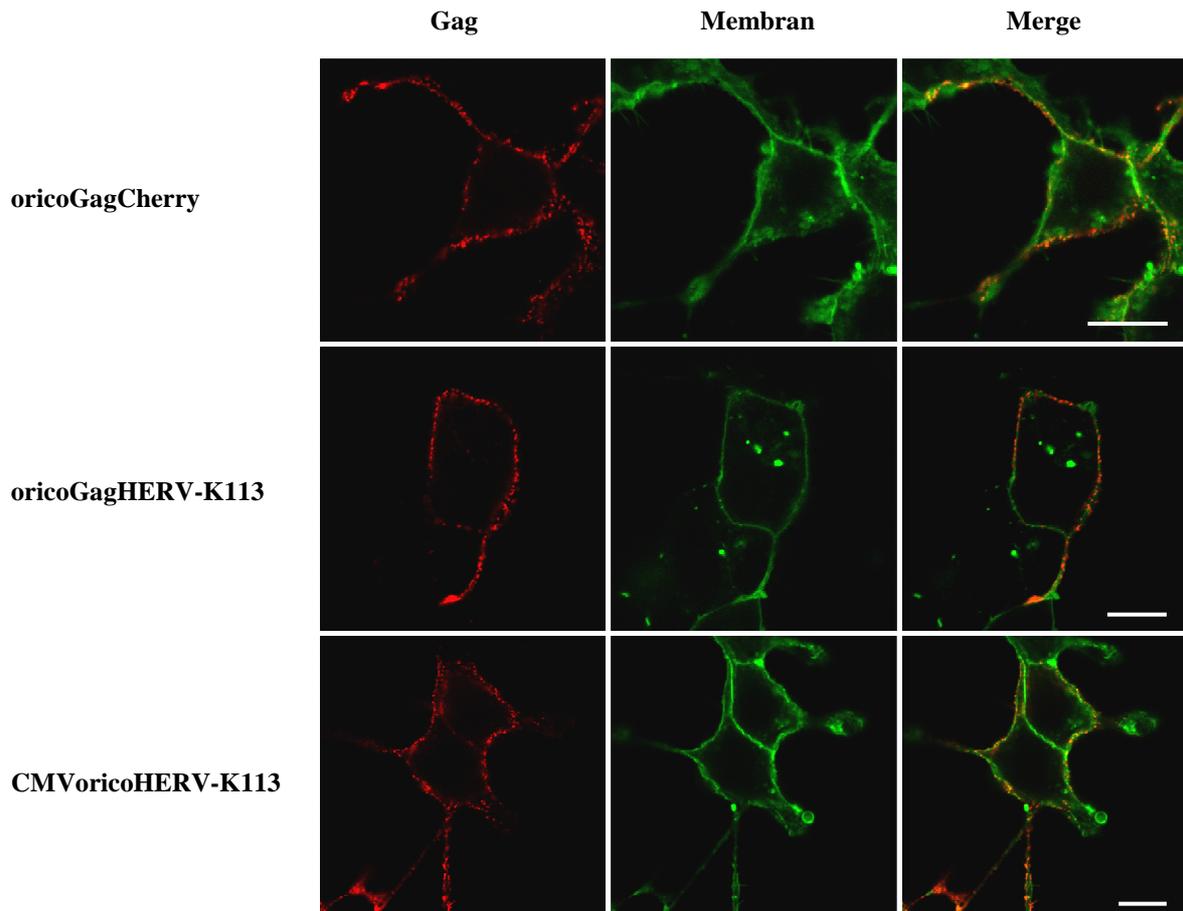


Abbildung 23: Fluoreszenzprotein-markiertes und unmarkiertes Gag akkumuliert an der Zellmembran

HEK293T-Zellen transfiziert mit oricoGagCherry, oricoGagHERV-K113 und CMVoricoHERV-K113 (je $n = 3$) in der konfokalen Laserscanningmikroskopie, 16 Stunden nach Transfektion. Die Lebendfärbung der Zellmembran erfolgte mit DiO. Nach anschließender Fixierung wurde unmarkiertes Gag-Protein mit dem Rattenserum gegen das Kapsidprotein und Alexa568 gegen Ratte nachgewiesen. (Maßstab: 10µm)

Wie bereits aus der TIRF-Mikroskopie ersichtlich (Abbildung 22), konnte auch mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie die Akkumulation von GagCherry an der Plasmamembran transfizierter Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 23, oricoGagCherry). Im Vergleich von markiertem und unmarkiertem Gag wurde kein Unterschied in der intrazellulären Verteilung des viralen Proteins beobachtet. Es

akkumulierte ebenfalls 16 Stunden nach Transfektion homogen an der gesamten Plasmamembran transfizierter Zellen (Abbildung 23). Bei der Gag-Verteilung in Zellen transfiziert mit oricoGagHERV-K113 oder CMVorigoHERV-K113 konnten ebenfalls keine Unterschiede nachgewiesen werden, was auf einen von weiteren viralen Proteinen unabhängigen Transport von Gag zur Zellmembran schließen lässt. Das Protein GagEGFP zeigte in allen Versuchen das gleiche Verteilungsmuster wie GagCherry (Abbildung 21-23, Film 1-3), auch in der Abhängigkeit von der Zeit.

Beide viralen Fluoreszenzfusionsproteine wurden exprimiert und unterschieden sich in ihrer intrazellulären Verteilung nicht von unmarkiertem Gag. Somit konnten die Konstrukte oricoGagCherry und oricoGagEGFP für weitere Untersuchung herangezogen werden.

3.1.2.2 Fluoreszenzprotein-markiertes Gag formiert sich zu tubulären Buddingstrukturen

Aus früheren Studien geht hervor, dass HERV-K113 eine geringe Expressionsrate der viralen Proteine aufweist und somit zur Bildung nur weniger VLPs führt (Beimforde et al. 2008; Boller et al., 2008; Heslin et al., 2009). Die Generierung der Wildtypsequenz und die Codonoptimierung des Konstrukts oricoHERV-K113_GagProPol führen zu einer verstärkten Expression von VLPs (George et al., 2008). Ob jedoch die viralen Gag-Proteine, die aus den in dieser Arbeit verwendeten viralen oricoHERV-K113 Konstrukten hervorgehen, ebenfalls in der Lage sind, vermehrt zu VLPs zu assemblieren, ist unklar. Im folgenden Versuch sollte das mittels elektronenmikroskopischer Verfahren geklärt werden.

Für die Versuche wurden HEK293T-Zellen mit CMVorigoHERV-K113, oricoGagHERV-K113, oricoGagCherry oder oricoGagEGFP transfiziert. Etwa 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen entweder für die Transmissions- (TEM) oder die Rasterelektronenmikroskopie (REM) präpariert (je n = 3).

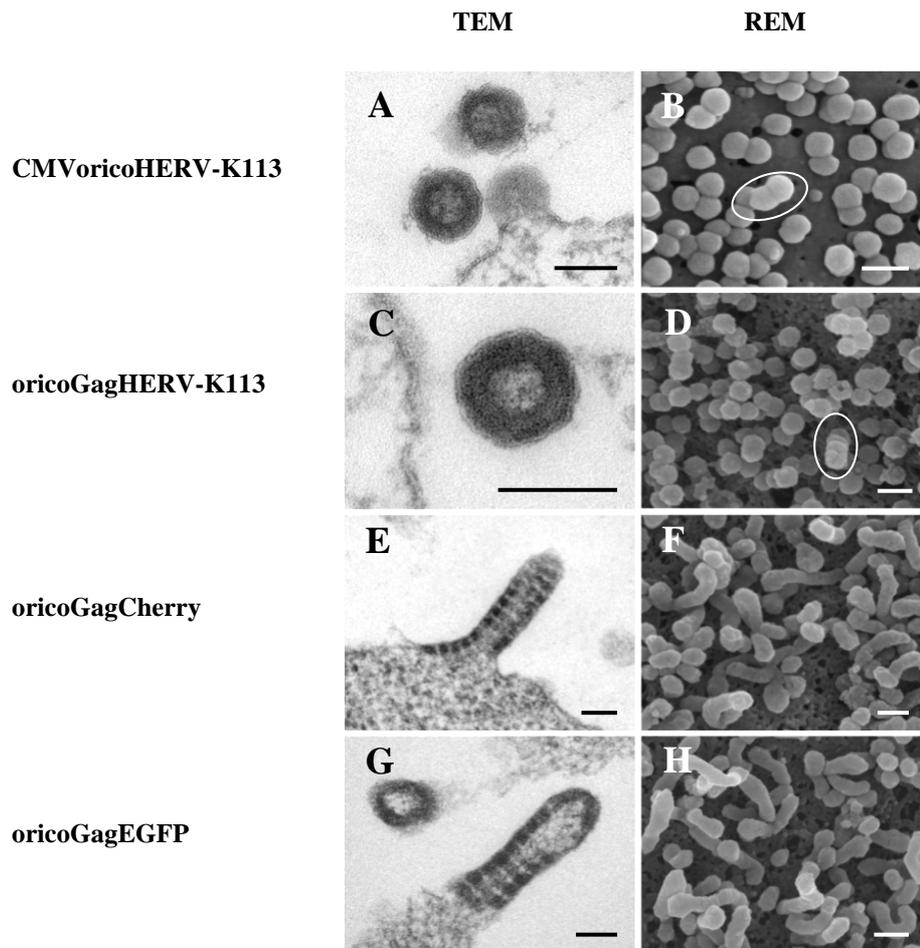


Abbildung 24: Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen

A-D: Virale Partikel und Buddingketten (ovale Kreise) auf der Zelloberfläche von HEK293T-Zellen transfiziert mit CMV_{orico}HERV-K113 oder oricoGagHERV-K113. E-H: Längliche, tubuläre Ausläufer auf der Oberfläche von HEK293T-Zellen, welche mit den Konstrukten oricoGagCherry beziehungsweise oricoGagEGFP transfiziert wurden. (A, C, E, G: TEM-Transmissionselektronenmikroskopie, Maßstab: 100nm; B, D, F, H: REM-Rasterelektronenmikroskopie, Maßstab: 200nm)

Aus der Abbildung 24A bis D geht hervor, dass Zellen, die unmarkiertes Gag exprimieren, nach 48 Stunden VLPs auf der gesamten Zelloberfläche aufwiesen. Diese zeichneten sich durch eine runde Form und einen Durchmesser von knapp 90nm aus (Abbildung 24B und D). Es handelte sich hierbei um unreife VLPs mit einer 20nm dicken, homogenen, elektronendichten Gag-Schicht unter der viralen Hüllmembran (Abbildung 24A und C). Zellen, die mit den Konstrukten oricoGagCherry beziehungsweise oricoGagEGFP transfiziert wurden, wiesen nach 48 Stunden ausschließlich tubuläre Strukturen unterschiedlicher Länge gleichmäßig auf der gesamten Zelloberfläche verteilt auf (Abbildung 24F und H). VLPs konnten jedoch auf der Zelloberfläche nicht beobachtet werden. Der Durchmesser der tubulären Strukturen betrug ebenfalls etwa 90nm und eine Strukturierung der Gag-Schicht unter der Plasmamembran war deutlich sichtbar (Abbildung 24E und G). Diese tubulären Buddingstrukturen korrelierten mit den

fluoreszierenden, fadenförmigen Ausläufern auf der Oberfläche von oricoGagCherry transfizierten Zellen in der konfokalen Lebendzell- und TIRF-Mikroskopie, 24 Stunden nach Transfektion (Abbildung 24F und H, Film 3). Die Daten zeigten, dass die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte zur Ausbildung von viralen Buddingstrukturen führten. Jedoch war Fluoreszenzprotein-markiertes Gag nicht in der Lage zu typischen HERV-K(HML-2) VLPs von runder Form zu assemblieren, wie es bei unmarkierten Gag beobachtet werden konnte.

3.1.2.3 Unmarkiertes als auch markiertes Gag assembliert an der Plasmamembran

Sowohl unmarkiertes als auch Fluoreszenzprotein-markiertes Gag lag nach 48 Stunden assembliert an der Plasmamembran transfizierter Zellen vor. Ob jedoch die Assemblierung zu viralen Partikeln an der Plasmamembran (C-Typ) oder im Zytoplasma (A/B-Typ) stattfindet, war bis dato noch nicht eindeutig geklärt (Nermut und Hockley, 1996). Im folgenden Versuch galt es zu untersuchen, wo unmarkiertes beziehungsweise Fluoreszenzprotein-markiertes Gag von oricoHERV-K113 assembliert.

Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit CMV_{orico}HERV-K113, oricoGagHERV-K113, oricoGagCherry oder oricoGagEGFP transfiziert und nach 24 oder 48 Stunden für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert (je n = 3).

Bereits nach 24 Stunden konnten alle Stufen der Assemblierung mittels Transmissionselektronenmikroskopie beobachtet werden. Die Abbildungen 25A, D, G, K* zeigen die Anlagerung der Gag-Proteine entlang der zytosolischen Seite der Plasmamembran. Sie zeichneten sich durch eine elektronendichte Schicht aus. Die Plasmamembran stülpte sich im nächsten Schritt C-förmig nach außen (Abbildungen 25B, E, H, K**) und es kam zur weiteren Anlagerung von Untereinheiten an die Gag-Schicht. Daraus resultierte die Formierung der viralen Buddingstrukturen (Abbildungen 25C, F, I, K***). Reines Gag assemblierte zu einer homogenen (Abbildungen 25A-F), Fluoreszenzprotein-markiertes Gag zu einer durch Untereinheiten strukturierten Gag-Schicht (Abbildungen 25G-K). Demnach assembliert markiertes und unmarkiertes Gag an der Plasmamembran, wodurch sich HERV-K(HML-2) bei den C-Typ-Retroviren einordnen lässt.

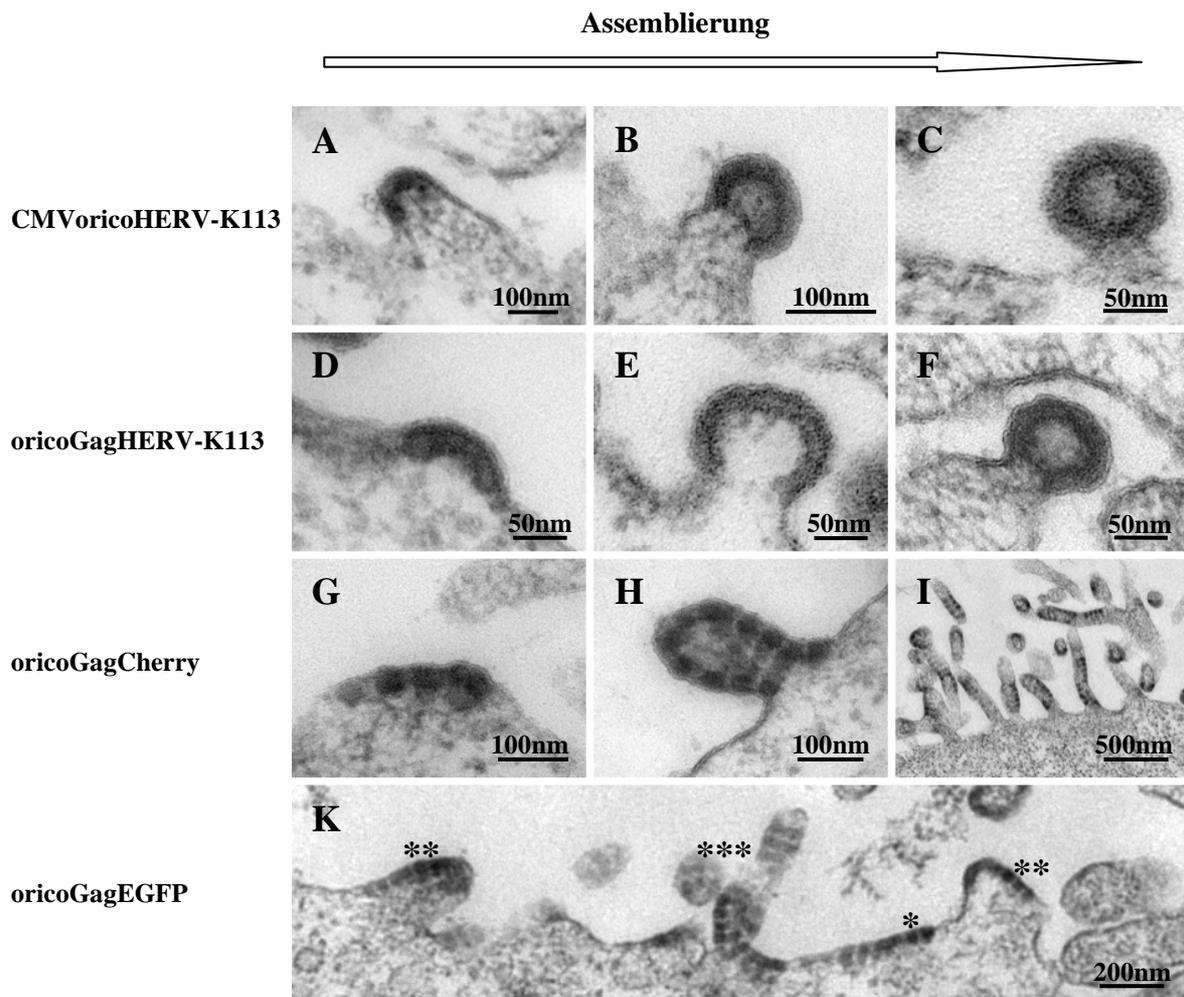


Abbildung 25: Unmarkiertes und markiertes Gag assembliert an der Plasmamembran

Stadien der Gag-Assemblierung an der Plasmamembran von HEK293T-Zellen transfiziert mit CMVoricoHERV-K113, oricoGagHERV-K113, oricoGagCherry oder oricoGagEGFP nach 24 Stunden in der Transmissionselektronenmikroskopie. Unmarkiertes oder markiertes Gag akkumulierte an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran (A, D, G, K*), diese stülpte sich nach außen (B, E, H, K**) und führte zur Formierung von Buddingstrukturen (C, F, I, K***).

Nach 48 Stunden konnten bei vereinzelt, mit CMVoricoHERV-K113 oder oricoGagHERV-K113 transfizierten HEK293T-Zellen neben VLPs auf der Zelloberfläche auch eine Anhäufung von viralen Partikeln ohne Hüllmembran unter der gesamten Zelloberfläche und vereinzelt an vesikulären Strukturen beobachtet werden (Abbildung 26). Diese nicht behüllten, viralen Partikel häuften sich teils mehrschichtig unter der Plasmamembran an (Abbildung 26C). Das Phänomen beruht wahrscheinlich auf der Überexpression des viralen Gag-Proteins, welches im Zytoplasma oder nahe der zellulären Membran zu intrazellulären, viralen A-Typ-Partikeln assembliert. Ob jedoch die intrazellulären A-Typ-VLPs im großen Maße durch Anlagerung und Abschnürung an der Plasmamembran freigesetzt und als für Betaretroviren typische B-Typ-Partikel

klassifiziert werden können, war nicht ersichtlich. Somit konnte bei unmarkierten Gag neben der C-Typ- auch die A/B-Typ-Assemblierung beobachtet werden (Abbildung 10).

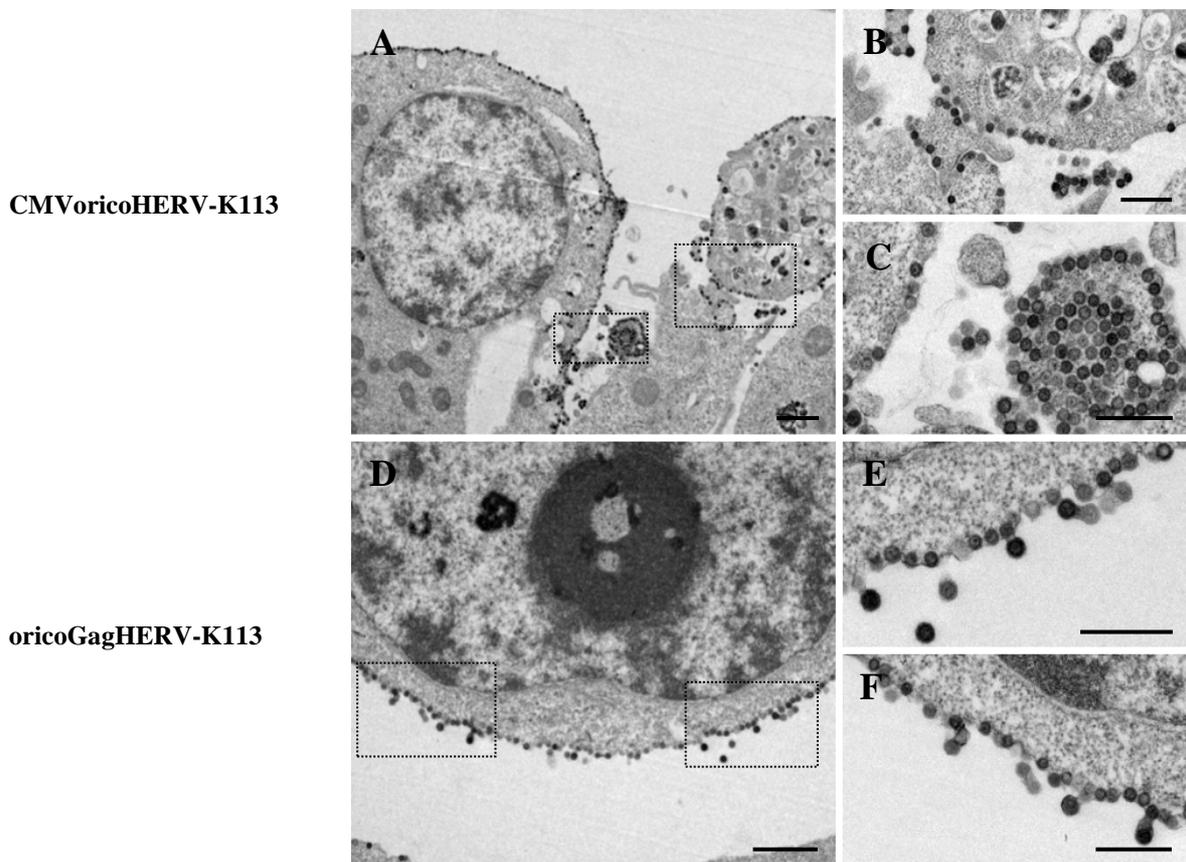


Abbildung 26: Akkumulation von viralen Partikeln unter der Plasmamembran

Nach 48 Stunden konnte in der Transmissionselektronenmikroskopie eine Anhäufung von viralen A/B-Typ-Partikeln bei einigen, mit CMV oricoHERV-K113 oder oricoGagHERV-K113 transfizierten HEK293T-Zellen beobachtet werden. (Maßstab: A, D: 1µm; B,C,E,F: 500nm)

3.1.3 Generierung funktioneller, Fluoreszenzprotein-markierter, viraler Partikel

Aus Abbildung 24 E und G geht hervor, dass reines Fluoreszenzprotein-markiertes Gag sich ausschließlich zu tubulären Buddingstrukturen formiert. Aus Publikationen zu Fluoreszenzprotein-markiertem Gag anderer Retroviren wurde ebenfalls ersichtlich, dass es allein nicht in der Lage ist, natürliche VLPs zu bilden. Jedoch konnte in früheren Arbeiten zu HIV-1 gezeigt werden, dass eine Kotransfektion und die daraus resultierende Koexpression von unmarkiertem und Fluoreszenzprotein-markiertem Gag zu fluoreszenzmarkierten VLPs führt, welche nativen VLPs in Form und Größe gleichen (Larson et al., 2005; Jouvenet et al., 2008). Somit galt es zu prüfen, ob ein Mischungsverhältnis der in dieser Arbeit verwendeten oricoHERV-K113 Konstrukte ebenfalls zur Bildung fluoreszenzmarkierter HERV-K(HML-2) VLPs führt.

3.1.3.1 Mischungsverhältnisse von markiertem und unmarkiertem Gag führen zur Assemblierung von VLPs

Um das Verhältnis von markiertem und unmarkiertem Gag zu ermitteln, das zur Assemblierung von fluoreszenzmarkierten HERV-K(HML-2) VLPs führt, wurden HEK293T-Zellen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen (1:1, 1:5, 1:10) von oricoGagCherry und CMV_{orico}HERV-K113 transfiziert (je n = 4). Die Transfektion der Zellen als auch die Stärke des Fluoreszenzsignals der exprimierten, viralen Fusionsproteine wurde nach 16 Stunden mittels Lebendzellmikroskopie (LZM) geprüft. Weitere Proben wurden nach 48 Stunden für die Elektronenmikroskopie präpariert.

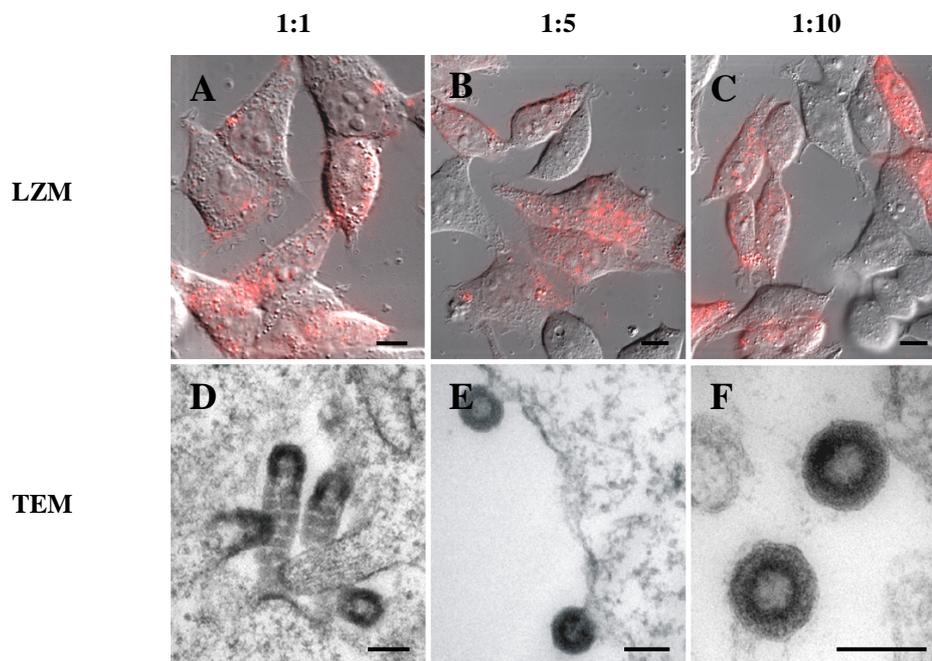


Abbildung 27: Mischungsverhältnisse von unmarkiertem und markiertem Gag führen zu VLPs

HEK293T-Zellen wurden mit den Mischungsverhältnissen 1:1, 1:5 oder 1:10 der Konstrukte oricoGagCherry und CMV_{orico}HERV-K113 transfiziert und nach 16 Stunden in der Lebendzellmikroskopie (LZM) beziehungsweise nach 48 Stunden in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert. (Maßstab: A-C: 10µm; D-F: 100nm)

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass GagCherry bei allen drei Mischungsverhältnissen für eine fluoreszenzbasierende Detektion im ausreichendem Maße exprimiert wurde. Die Mischungsverhältnisse wiesen keine sichtbaren Unterschiede in der Proteinverteilung auf im Vergleich zu Zellen, welche ausschließlich mit oricoGagCherry transfiziert wurden (Abbildung 27A-C).

In der Transmissionselektronenmikroskopie besaßen Zellen des Mischungsverhältnisses 1:1 nur tubuläre Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche (Abbildung 27D). Diese Strukturen wurden bereits bei Zellen beobachtet, die ausschließlich Fluoreszenzprotein-

markiertes Gag exprimierten (Abbildung 24E und G). Die Mischungsverhältnisse 1:5 beziehungsweise 1:10 führten dagegen zur Assemblierung von VLPs auf der Zelloberfläche transfizierter Zellen (Abbildung 27E und F). Diese VLPs unterschieden sich weder durch ihre runde Form noch durch ihren Durchmesser von knapp 90nm von VLPs, die auch bei CMVoricoHERV-K113 transfizierten Zellen beobachtet wurden (Abbildung 24A und C). Jedoch wiesen bei beiden Mischungsverhältnissen auch einige, sehr wenige Zellen tubuläre Buddingstrukturen auf. Das lies darauf schließen, dass bei einer Kotransfektion nicht immer alle Konstrukte im gleichen Maße in eine Zelle eingebracht beziehungsweise exprimiert wurden. Die gleichen Beobachtungen konnten bei HEK293T-Zellen gemacht werden, die an Stelle von oricoGagCherry mit oricoGagEGFP im Mischungsverhältnissen 1:1, 1:5 oder 1:10 transfiziert wurden. Die Daten verdeutlichten, dass auch bei HERV-K(HML-2) eine Koexpression von markierten und unmarkierten Gag zur Assemblierung von VLPs auf der Zelloberfläche führte. Hierbei war jedoch entscheidend, dass unmarkiertes Gag wesentlich stärker exprimiert wird als markiertes Gag. Damit wurde eine natürlich Morphologie der viralen HERV-K(HML-2) Partikel trotz Fluoreszenzprotein-markiertem Gag ermöglicht.

3.1.3.2 Fluoreszierende Zellen weisen VLPs homogen verteilt auf der Zelloberfläche auf

Die Mischungsverhältnisse 1:5 oder 1:10 führten zu einem deutlich detektierbaren Fluoreszenzsignal in der Lichtmikroskopie. Elektronenmikroskopisch konnten bei beiden Ansätzen Zellen mit VLPs auf der Oberfläche beobachtet werden. Ob jedoch die transfizierten Zellen, welche in der Lichtmikroskopie ein deutliches Fluoreszenzsignal aufwiesen, auch die in der Elektronenmikroskopie beobachteten VLP-Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche tragen, war unklar. Auch konnte bis dato keine Aussage getroffen werden, ob das Budding der viralen Partikel an bestimmten Zellregionen oder über die gesamte Zelloberfläche verteilt stattfindet.

Für die kommenden Versuche wurde das Mischungsverhältnis 1:5 gewählt, da hier eine höhere Expression an GagCherry in transfizierten Zellen erwartet werden konnte. Falls die daraus resultierenden fluoreszierenden Zellen VLPs auf ihrer Oberfläche präsentieren, dann kann davon ausgegangen werden, dass auch eine niedrigere Expression von GagCherry in Kombination mit einer höheren Expression an unmarkiertem Gag, wie bei dem Mischungsverhältnis 1:10, ebenfalls zu VLPs auf der Zelloberfläche führt.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei neue Methoden auf dem Gebiet der Korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) entwickelt (Abschnitt 2.2.5) und am Robert Koch-Institut etabliert. Bei diesen korrelativen Methoden wird ein und dieselbe Probe erst mittels Lichtmikroskopie und im Anschluss mittels Transmissions- oder Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die Lichtmikroskopie diente in diesem Fall der Lokalisation von transfizierten Zellen, welche ein Fluoreszenzsignal aufwiesen. Die Elektronenmikroskopie sollte Aufschluss über die Oberflächenstruktur der fluoreszierenden Zellen geben.

Für die CLEM wurden aufgrund ihrer guten Adhärenz HeLaSS6-Zellen in einem 18-Well- μ Slide mit PEN-Membranboden für die TEM ($n = 5$) oder in einem μ Dish Grid500^{high} für die REM ($n = 3$) ausplattiert und mit den Mischungsverhältnissen 1:5 der Konstrukte oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 transfiziert. Als Kontrollen wurden zum einen Zellen herangezogen, welche kein Fluoreszenzsignal aufwiesen und zum anderen wurden HeLaSS6-Zellen mit ausschließlich oricoGagCherry transfiziert (je $n = 2$).

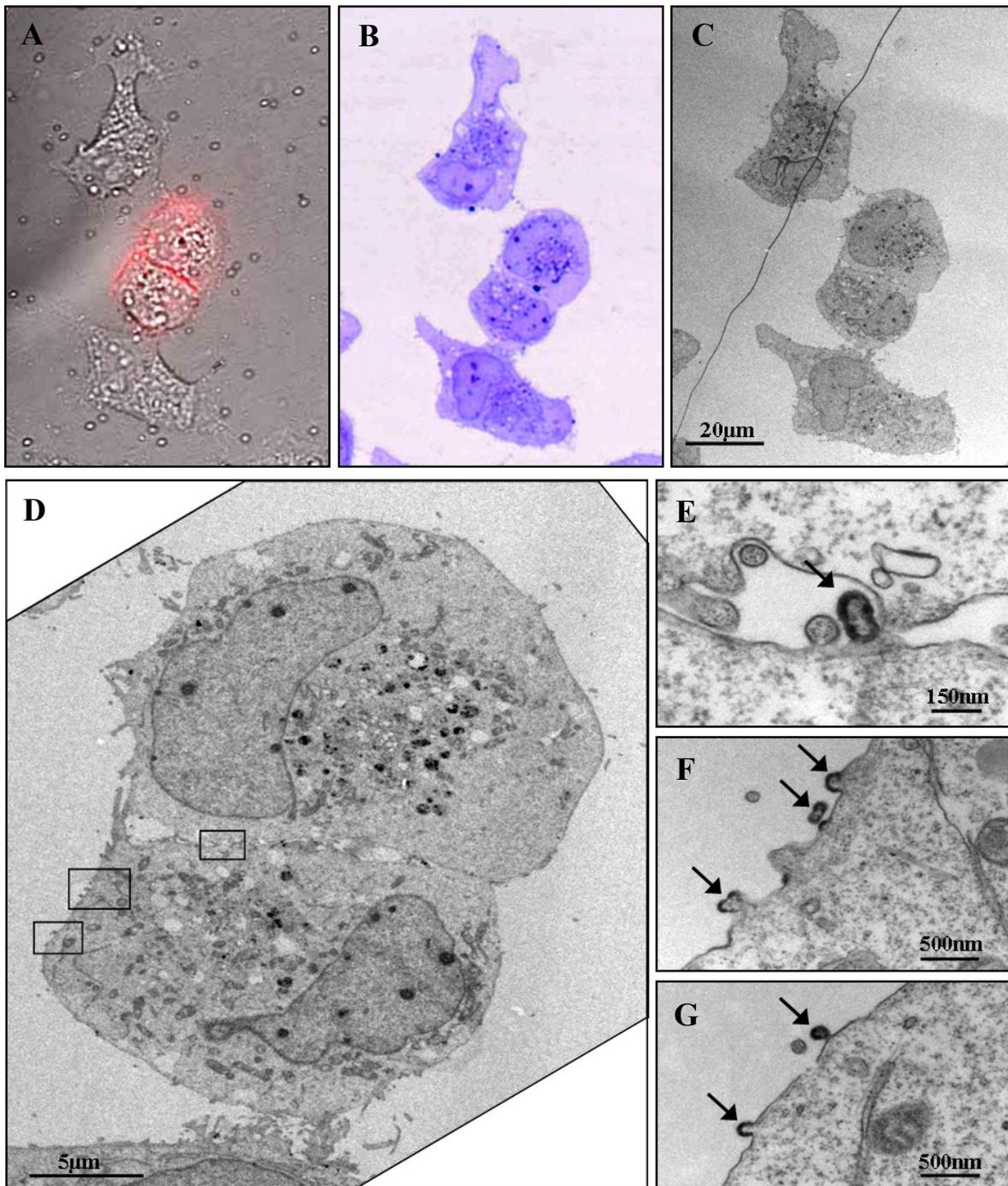


Abbildung 28: Korrelative Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie

HeLaSS6-Zellen transfiziert mit oricoGagCherry und CMV_{orico}HERV-K113 (1:5) 24 Stunden nach Transfektion. A: Lebendzellmikroskopie transfizierter Zellen mit einem deutlichen Fluoreszenzsignal von GagCherry. Semidünnschnitt (B; Schnittdicke 500nm) und Ultradünnschnitt (C; Schnittdicke 70nm) der gleichen Zellen. D-G: Transmissionselektronenmikroskopie der fluoreszierenden Zellen im Ultradünnschnitt. Die in E bis G vergrößerten Ausschnitte mit viralen Buddingstrukturen (Pfeile) sind in D durch schwarze Rahmen hervorgehoben.

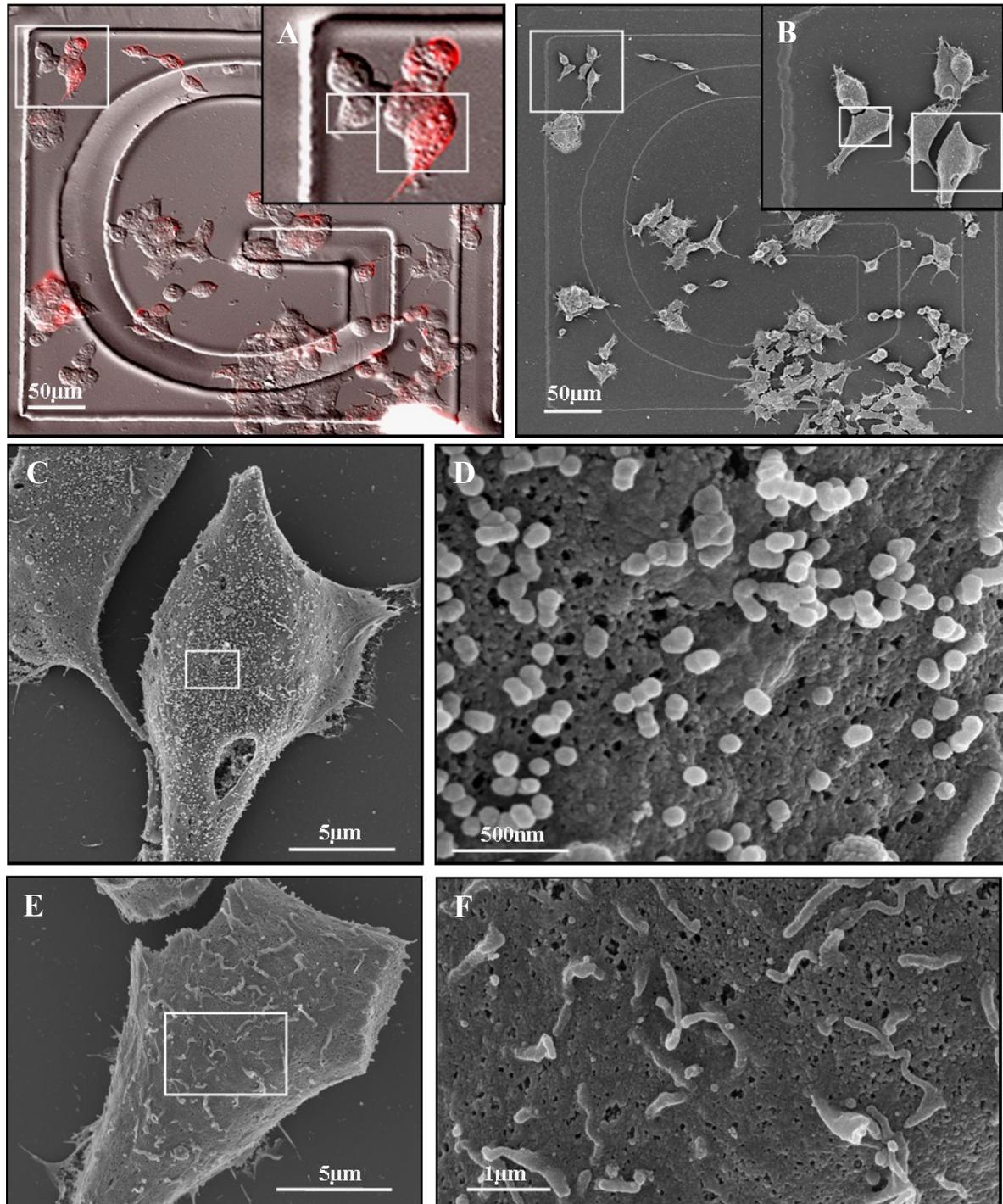


Abbildung 29: Korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie

HeLaSS6-Zellen transfiziert mit oricoGagCherry und CMVoricHERV-K113 (1:5) 48 Stunden nach Transfektion. A: Lebendzellmikroskopie transfizierter Zellen, welche auf dem Koordinatenfeld G des μ Dish-Bodens adhärten. B: Übersicht von Feld G in der Rasterelektronenmikroskopie. Die in C abgebildete transfizierte Zelle wies eine homogen VLP-Verteilung (D) auf der Zelloberfläche auf. Die in E dargestellte Zelle zeigte in der Lebendzellmikroskopie kein Fluoreszenzsignal und auch keine viralen Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche (F). Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Rahmen hervorgehoben.

Sowohl aus der Transmissionselektronenmikroskopie als auch aus der Rasterelektronenmikroskopie der CLEM (Abbildung 28 und 29) gingen die gleichen Ergebnisse hervor. Transfizierte HeLaSS6-Zellen wurden aufgrund ihrer Expression von GagCherry und dem daraus resultierenden Fluoreszenzsignal in der Lebendzellmikroskopie identifiziert (Abbildung 28A und 29A). Um die Relokalisation der transfizierten Zellen in der Transmissionselektronenmikroskopie zu vereinfachen, wurde von jeder in Epon eingebetteten Wellprobe ein Semidünnschnitt zur Übersicht der Zellverteilung angefertigt und mit den Daten der Lichtmikroskopie abgeglichen (Abbildung 28B). Die transfizierten Zellen zeigten im Ultradünnschnitt virale Buddingstrukturen auf ihrer Zelloberfläche, die die typische runde Form mit einem Durchmesser von etwa 90nm und eine elektronendichte Gag-Schicht unter der Zellmembran aufwiesen (Abbildung 28E-G). Aus den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ging hervor, dass die viralen Buddingstrukturen gleichmäßig auf der gesamten Zelloberfläche verteilt auftraten (Abbildung 29C und D). Diese Beobachtungen konnten nicht nur bei HeLaSS6-Zellen, transfiziert mit dem Mischungsverhältnis 1:5 der Konstrukte oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 gemacht werden, sondern auch bei dem Mischungsverhältnis von 1:10. HeLaSS6-Zellen, die kein Fluoreszenzsignal in der Lebendzellmikroskopie aufwiesen, zeigten weder tubuläre noch virusartige Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche. Es waren ausschließlich kleine zelluläre Ausläufer, Filopodien, auf der Zelloberfläche sichtbar (Abbildung 29E und F), die sich in ihrer Anzahl und Größe von tubulären Buddingstrukturen des GagCherry-Fusionsproteins unterschieden.

Die zur Kontrolle mit oricoGagCherry transfizierten HeLaSS6-Zellen zeigten in der Lichtmikroskopie das typische Verteilungsmuster der GagCherry-Akkumulationen und in der Elektronenmikroskopie tubuläre Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche, wie auch in Abbildung 24E und F. Auf der Zelloberfläche waren bei den nicht transfizierten HeLaSS6-Zellen kleine, Filopodien-artige, zelluläre Ausläufer, wie in Abbildung 29E und F, zu finden, die sich durch Länge und Durchmesser deutlich von tubulären Buddingstrukturen unterschieden.

Mittels CLEM wurde nochmals verdeutlicht, dass die Mischungsverhältnisse 1:5 und 1:10 zur Assemblierung von VLPs auf kotransfizierten Zellen führten. Die CLEM mittels Rasterelektronenmikroskopie gab zudem Aufschluss über die homogene Verteilung der viralen Buddingstrukturen über die gesamte Zelloberfläche.

3.1.3.3 Markiertes Gag wird in die VLPs eingebaut und prozessiert

Die Mischungsverhältnisse 1:5 und 1:10 führten zur Assemblierung und zum Budding von unreifen VLPs auf der Oberfläche transfizierter Zellen (Abbildung 27-29). Es galt im nächsten Schritt zu prüfen, ob Fluoreszenzprotein-markiertes Gag wirklich in VLPs eingebaut wurde oder ob es sich um VLPs handelte, die sich ausschließlich aus unmarkiertem Gag zusammensetzen.

Für die Versuche wurde ebenfalls auf das Mischungsverhältnis 1:5 zurückgegriffen, da mit einem stärkeren Einbau von Fluoreszenzprotein-markiertem Gag in VLPs gerechnet werden konnte. Um die Integration von markiertem Gag in VLPs zu untersuchen, wurde eine Immunogoldmarkierung an ultradünnen Lowicrylschnitten von transfizierten HEK293T-Zellen ($n = 3$), sowie zur Kontrolle an mit oricoGagEGFP, CMVoricoHERV-K113 transfizierten oder untransfizierten Zellen (je $n = 4$), vorgenommen (Abschnitte 2.2.4.1.6). Zum Nachweis von Gag wurden Rattenserum verwendet, die gegen das Kapsidprotein (CA) oder das p15-Protein gerichtet waren (George et al., 2011). GagEGFP wurde mittels Primärantikörper gegen GFP 48 Stunden nach Transfektion nachgewiesen. Alle primären Antikörper wurden mit 5nm oder 10nm Immunogoldantikörpern visualisiert (Tabelle 24).

Für diese Versuche wurde auf das Konstrukt oricoGagEGFP zurückgegriffen, da GagEGFP mittels kommerziellen GFP-Antikörpers am Lowicrylschnitt nachgewiesen werden kann. Das trifft für das Fluoreszenzprotein Cherry nicht zu, was Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten.

Alle Proben wiesen einen relativ schlechten Struktur- und Membranerhalt im Vergleich zu den in Epon eingebetteten Proben auf (Abbildung 24). Zurückzuführen war dies auf die vergleichsweise schwache Fixierung mit einem hohen Anteil von 4% Paraformaldehyd und einem sehr geringen Anteil von 0.1% Glutaraldehyd. Das nur im geringen Maße quervernetzende Fixativ erhielt die Antigenität der Probe, resultiert aber in einer schlechten Zell- und Partikelmorphologie. Demzufolge wurde auf eine eindeutige Identifikation der viralen Strukturen mittels Gag-spezifischer Antikörper zurückgegriffen. Bei allen Gag-exprimierenden Proben wurde eine deutliche Immunogoldmarkierung der Buddingstrukturen mittels Rattenserum gegen das Kapsidprotein (Abbildung 30A, D, G) beziehungsweise das p15-Protein (Abbildung 30B, E, H) von Gag beobachtet. Ultradünnschnitte von Zellen transfiziert mit oricoGagEGFP und dem Mischungsverhältnis zeigten unter Verwendung des GFP-Antikörpers eine deutliche Immunogoldmarkierung (Abbildung 30F und I). Erwartungsgemäß konnte keine

anti-GFP-Immungoldmarkierung an VLPs auf der Oberfläche von Zellen, transfiziert mit CMV_{orico}HERV-K113, detektiert werden (Abbildung 30C). Die Negativkontrolle, bestehend aus untransfizierten HEK293T-Zellen, zeigte ebenfalls keine unspezifische Bindung der Rattenseren oder des GFP-Antikörpers. Somit weisen alle verwendeten Antikörper eine hohe Spezifität auf.

Mittels Immunogoldmarkierung gegen EGFP konnte der Einbau des GagEGFP nachgewiesen werden und zeigte, dass es sich um fluoreszenzmarkierte Buddingstrukturen auf der Oberfläche kotransfizierter Zellen handelte.

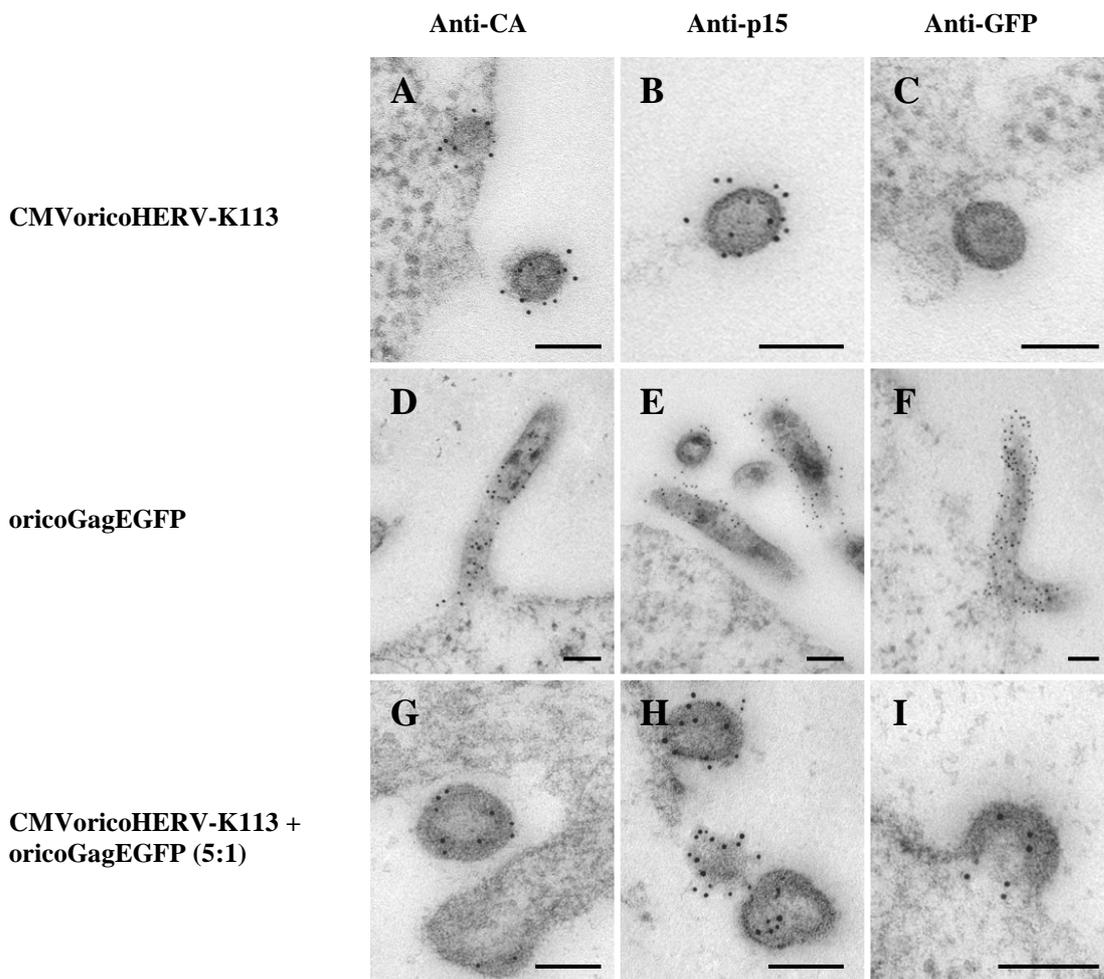


Abbildung 30: Fluoreszenzprotein-markiertes Gag wird in VLPs eingebaut

Immunogold-markierte Ultradünnschnitte von HEK293T-Zellen transfiziert mit den Konstrukten oricoGagEGFP, CMV_{orico}HERV-K113 oder deren Mischungsverhältnis (1:5). In der Immunogoldmarkierung wurden jeweils Antikörper gegen das Kapsidprotein (CA), p15-Protein und Fluoreszenzprotein GFP verwendet. (Maßstab: 100nm)

3.1.3.4 Fluoreszenzprotein-markierte VLPs werden freigesetzt

Fluoreszenzprotein-markiertes Gag führte zusammen mit unmarkiertem Gag zur Assemblierung markierter viraler Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche transfizierter Zellen. Unklar war jedoch, in wieweit diese VLPs in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und reifen. Die transmissionselektronenmikroskopischen Daten aus Abbildung 30 lassen dies vermuten. Es handelt sich hierbei aber nur um einzelne Schnitte viraler Partikel. Somit konnte keine direkte Aussage getroffen werden, ob es sich hierbei um Buddingstrukturen oder freigesetzte VLPs handelte. Zudem stellte sich die Frage, ob die Fluoreszenz dieser viralen Partikel detektierbar ist.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden HEK293T-Zellen mit den Mischungsverhältnissen 1:5 oder 1:10 der Konstrukte oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 transfiziert, sowie zur Kontrolle mit oricoGagCherry oder CMVoricoHERV-K113. Nach 48 Stunden erfolgte die Isolation der VLPs aus dem Kulturüberstand mittels Ultrazentrifugation (UZ-Pellet, Abschnitt 2.2.2.2), die im Anschluss licht- und elektronenmikroskopisch untersucht wurden ($n = 3$).

Mit Ausnahme des UZ-Pellets von CMVoricoHERV-K113 (Abbildung 31A) konnte bei allen anderen UZ-Pellets in der konfokalen Laserscanningmikroskopie ein Fluoreszenzsignal bei 63facher Vergrößerung detektiert werden. Zudem zeigten die UZ-Pellets der Mischungsverhältnisse kleinere homogene Punktstrukturen (Abbildungen 31E und G). Das UZ-Pellet von Zellen transfiziert mit oricoGagCherry wies eher klumpige und unförmige, größere, fluoreszierende Strukturen auf (Abbildung 31C). Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ging hervor, dass sich das UZ-Pellet von CMVoricoHERV-K113 fast ausschließlich aus reifen VLPs, aber auch aus vereinzelt unreifen VLPs und kleinen Zelltrümmern zusammensetzte (Abbildung 31B). Die UZ-Pellets der Mischungsverhältnisse unterschieden sich nicht von CMVoricoHERV-K113, außer durch vereinzelt auftretende, tubuläre Strukturen mit einer deutlichen membranassoziierten Gag-Schicht (Abbildungen 31F und H). Diese wurden gehäuft im UZ-Pellet von oricoGagCherry beobachtet (Abbildung 31D). Im Vergleich zur Anzahl an freigesetzten VLPs bei allen anderen Proben, waren es jedoch nur wenige tubuläre Strukturen im Pellet. Es zeigte aber, dass auch tubuläre Buddingstrukturen, die sich ausschließlich aus Fluoreszenzprotein-markiertem Gag zusammensetzen, im geringen Maße freigesetzt werden.

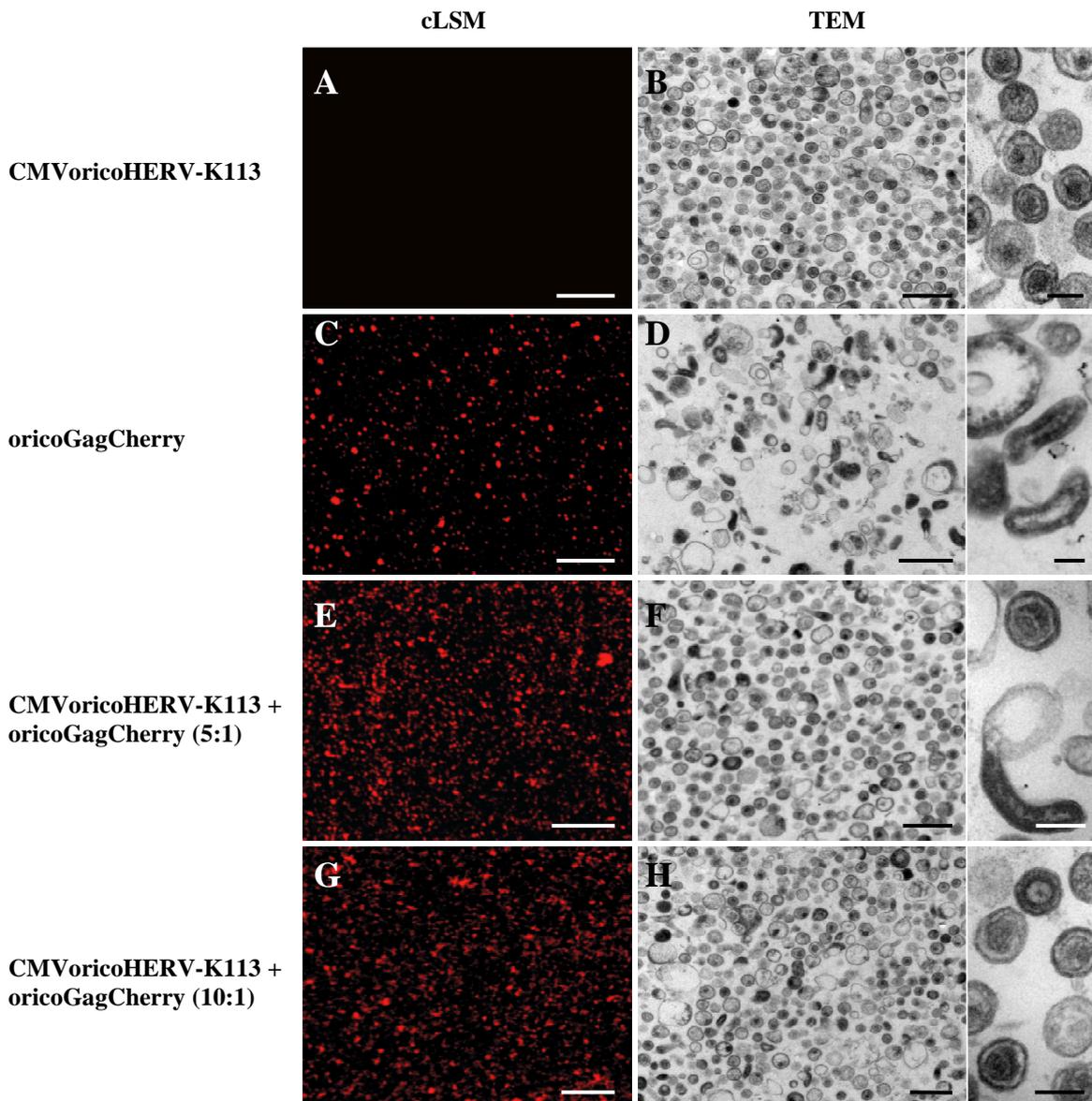


Abbildung 31: UZ-Pellets in der Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie

Ultrazentrifugierte Zellkulturüberstände von mit CMV_{orico}HERV-K113, oricoGagCherry oder deren Mischungsverhältnis (1:5; 1:10) transfizierter HEK293T-Zellen. Die UZ-Pellets wurden nach 48 Stunden zum einen mit konfokaler Laserscanningmikroskopie (cLSM; Maßstab: 10µm) und zum anderen eingebettet in Epon mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM; Maßstab: linke Spalte: 500nm, rechte Spalte: 100nm) untersucht.

Für die Untersuchungen der Mischungsverhältnisse im Western Blot (Abschnitt 2.2.2.4) wurden HEK293T-Zellen mit oricoGagCherry oder CMV_{orico}HERV-K113 und deren Mischungsverhältnissen (1:1; 1:5; 1:10) transfiziert. Als Kontrollen dienten die Leervektoren pmCherry-N1 und pcDNA3. Nach 48 Stunden wurden die UZ-Pellets der Zellkulturüberstände, sowie die Zelllysate generiert (n = 5). Zum einen wurde das Kapsidprotein und zum anderen das Fluoreszenzprotein Cherry mit Hilfe kommerziell erhältlicher Antikörper detektiert (Tabelle 20).

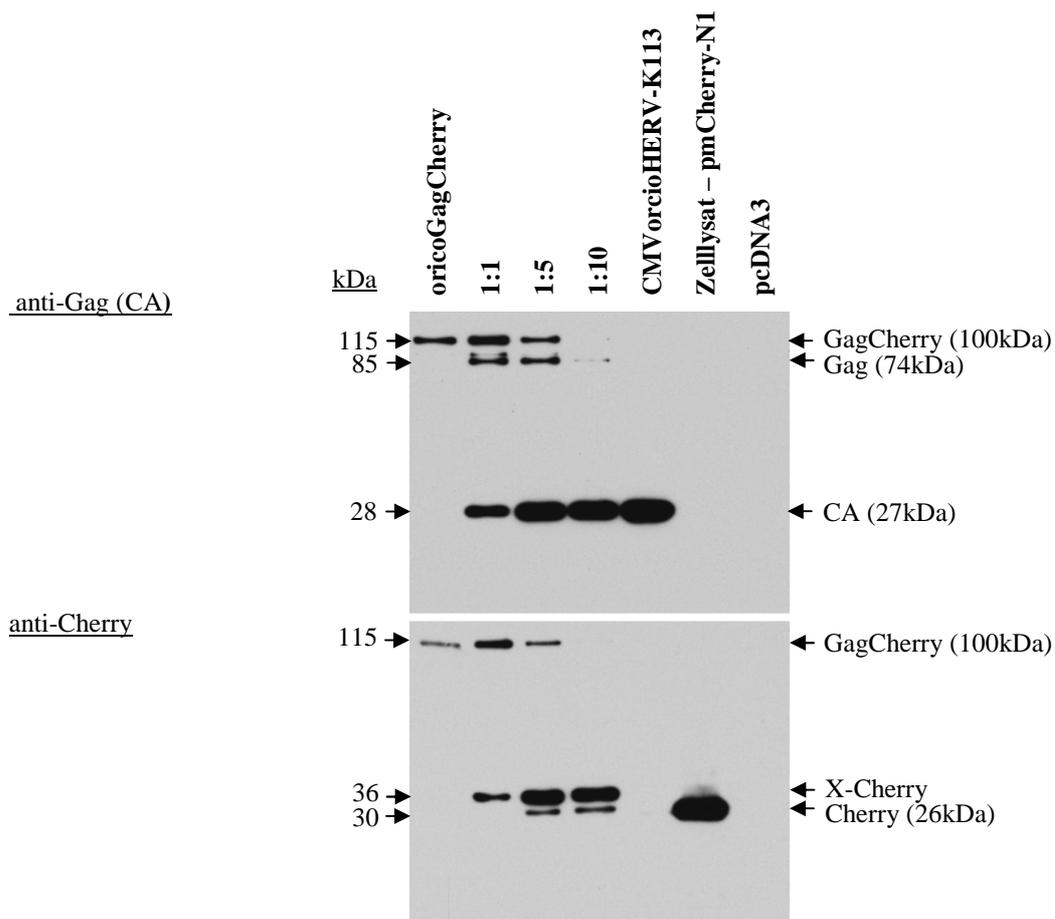


Abbildung 32: GagCherry wird in VLPs eingebaut und prozessiert

Western Blot ultrazentrifugierter Zellkulturüberstände von HEK293T-Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Blots wurden gegen das Gag-Protein (Rattenserum: anti-CA Protein HERV-K113 + Ziege anti-Ratte HRP) oder gegen das Fluoreszenzprotein Cherry (Kaninchen anti-DsRed + Ziege anti-Kaninchen HRP) angefärbt. Die berechneten Molekularmassen der Proteine befinden sich in Klammern. Marker: Page Ruler

Aus den Western Blot-Analysen der aufkonzentrierten Zellkulturüberstände ging hervor, dass Zellen, transfiziert mit den Mischungsverhältnissen, GagCherry in die VLPs proportional zur Plasmidmenge einbauten und prozessierten. Die Prozessierung wurde durch die sehr starke 28kDa Bande des reinen Kapsidproteins deutlich. Unprozessiertes Gag/GagCherry zeigte sich im Gegensatz dazu durch eine sehr schwache 85/115kDa Bande im Western Blot (Abbildung 32, anti-Gag). Bei GagCherry konnte die Prozessierung des Proteins durch starke Banden bei 36kDa und 30kDa nachgewiesen werden (Abbildung 32, anti-Cherry). Die 30kDa Bande zeigte das reine Fluoreszenzprotein Cherry. Die 36kDa Bande verwies auf ein etwas größeres Spaltprodukt (X-Cherry). Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um Cherry mit einem N-terminal gebundenem, noch unbekanntem Protein X handelte. Es würde sich am C-Terminus von Gag befinden und wäre wesentlich kleiner als das Nukleokapsidprotein (10kDa), das bis

dahin am C-Terminus von Gag vermutet wurde. Ein näherer Blick auf das Mischungsverhältnis 1:1 bewies zudem, dass auch hier im geringen Maße reife, markierte Partikel im Zellkulturüberstand zu finden waren. Demnach war die Assemblierung markierter, viraler Partikel vom Gag-Verhältnis markiert zu unmarkiert abhängig. Zudem verweisen die Daten auf die Freisetzung fluoreszenzmarkierter, viraler Partikel. Nach der Freisetzung und Reifung kann auch weiterhin das Fluoreszenzsignal von Cherry detektiert werden und ermöglicht so zukünftige Untersuchungen, wie lichtmikroskopische Infektionsstudien oder Strukturanalysen reifer HERV-K(HML-2) Partikel durch CLEM mittels Elektronentomographie.

3.1.3.5 In VLPs integriertes, markiertes Gag wird durch die virale Protease prozessiert

In einem weiteren Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob Fluoreszenzprotein-markiertes Gag wie unmarkiertes Gag unprozessiert in VLPs eingebaut und erst nach der Freisetzung der unreifen VLPs durch die virale Protease prozessiert wird. Für diese Untersuchungen wurde ein weiteres Konstrukt, CMVoricoProteaseMutHERV-K113 herangezogen. Dem Konstrukt lag CMVoricoHERV-K113 zu Grunde, jedoch wurden drei Aminosäuren des aktiven Zentrums der viralen Protease mutiert (D204A, T205A, G206A) und damit inaktiviert (George et al., 2001).

HEK293T-Zellen wurden mit den Konstrukten CMVoricoProteaseMutHERV-K113 beziehungsweise CMVoricoHERV-K113 und oricoGagCherry, sowie deren Mischungsverhältnis (1:5) transfiziert. Als Kontrollen dienten die Leervektoren pmCherry-N1 und pcDNA3. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände ultrazentrifugiert und Western Blot-Analysen durchgeführt (n = 3).

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass das Vorläuferprotein GagCherry wie zu erwarten unprozessiert in die VLPs eingebaut und im Anschluss durch die virale Protease prozessiert wurde. Den Beweis dafür lieferte das UZ-Pellet resultierend aus dem Mischungsverhältnis 1:5 der Konstrukte oricoGagCherry und CMVoricoProteaseMutHERV-K113 (Abbildung 33). Hier konnte ausschließlich unprozessiertes GagCherry (115kDa Bande) detektiert werden, da bei beiden Ansätzen keine beziehungsweise keine funktionelle virale Protease exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu wies das Mischungsverhältnis 1:5 der Konstrukte oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 neben dem Vorläuferprotein GagCherry (115kDa) auch das Spaltprodukt X-Cherry von etwa 36kDa auf. Diese Prozessierung beruhte auf der

Expression der aktiven, viralen Protease, deren funktionelle Sequenz in CMV_{orico}HERV-K113 vorliegt. Somit konnte bei GagCherry keine Fluoreszenzproteinbedingte Hinderung der Prozessierung des viralen Polystrukturproteins beobachtet werden. Es wird wie Gag in die einzelnen, viralen Strukturproteine gespalten.

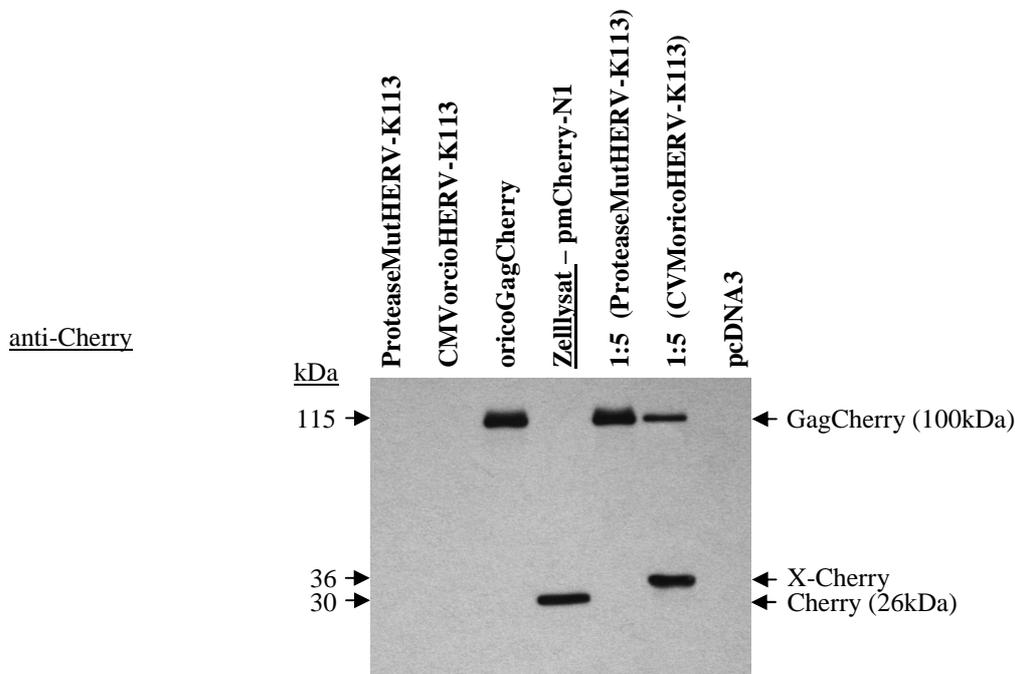


Abbildung 33: GagCherry wird durch die virale Protease prozessiert

Western Blot ultrazentrifugierter Zellkulturüberstände von HEK293T-Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Der Blot wurden gegen das Fluoreszenzprotein Cherry (Kaninchen anti-DsRed + Ziege anti-Kaninchen HRP) angefärbt. Die berechneten Molekularmassen der Proteine befinden sich in Klammern. Marker: Page Ruler

Die Ergebnisse dieses Abschnittes verdeutlichen, dass ein Mischungsverhältnis von GagCherry/EGFP und Gag zur Bildung von reifen, fluoreszenzmarkierten Partikeln führt, welche den Unmarkierten in Bildung, Reifung und Morphologie gleichen. Sie können somit für weiterführende Studien genutzt werden. Im Vergleich dazu, ist reines, Fluoreszenzprotein-markiertes Gag nicht in der Lage zu VLPs zu assemblieren.

3.2 Funktionelle Untersuchungen zu den viralen Proteinen QP1 und QP2

Aus den vorherigen Western Blot-Daten ging hervor, dass GagCherry durch die virale Protease prozessiert wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Spaltprodukt (36kDa) des Vorläuferproteins um etwa 6kDa höher lief als das reine Cherry-Protein bei 30kDa (Abbildung 32 und 33). Ein Vergleich der C-terminalen Gag-Sequenzen von oriHERV-K113 mit MPMV und MMTV (Abbildung 34) zeigte, dass HERV-K113 Gag wahrscheinlich ein kleines, noch unbekanntes, C-terminales Protein aufweist, wie auch MPMV das p4-Protein, das in den Faltungsprozess des Gag-Proteins involviert ist (Henderson et al., 1985; Hong et al., 2001).

Darauffolgende Untersuchungen zu den Schnittstellen der viralen Protease im Polystrukturprotein Gag von HERV-K113 zeigten, dass es sich bei dem vermuteten 5kDa großen, C-terminalen, viralen Protein um zwei Glutamin (Q)- und Prolin (P)-reiche Peptide handelte. Sie wurden deshalb als QP1-Peptid (23 AS; 2.5 kDa) und QP2-Peptid (19 AS; 2.1 kDa) bezeichnet (George et al., 2011). Ihre Funktion ist jedoch ungeklärt und sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden.

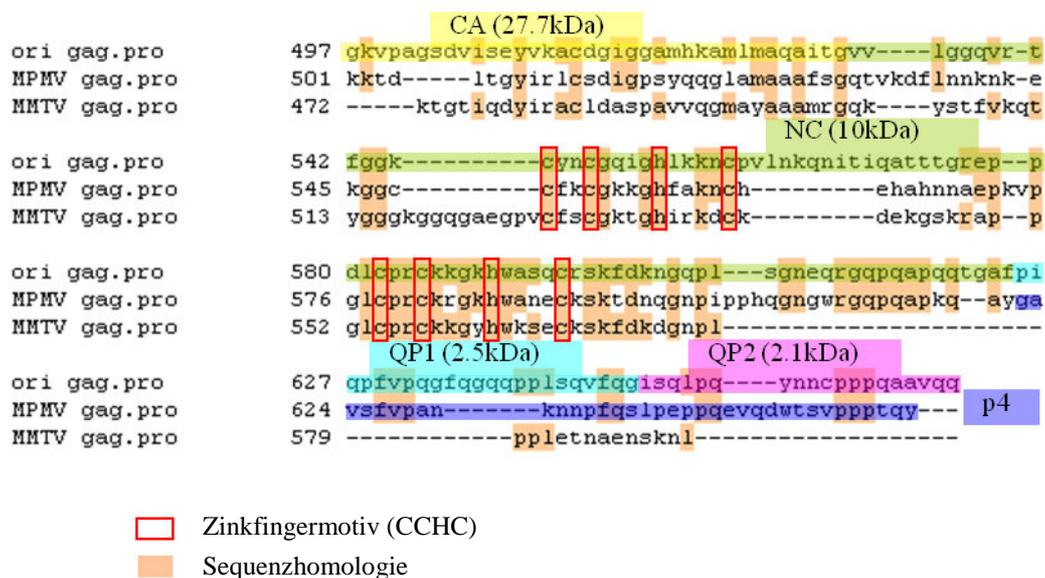


Abbildung 34: C-terminaler Sequenzvergleich der Gag-Proteine von oriHERV-K113, MPMV und MMTV

Vergleich der C-terminalen Gag-Proteinsequenz von oriHERV-K113 mit den zwei nahe verwandten Retroviren MPMV und MMTV. Sequenzen der einzelnen Proteine wurden farbig markiert, sowie die Zinkfinger motive des Nukleokapsidproteins (NC) rot umrahmt. Vom Kapsidprotein (CA) wurde nur ein kleiner, C-terminaler Teil dargestellt. QP: Glutamin- und Prolin-reiches Peptid.

3.2.1 Klonierung der QP1- und QP2-Deletionsmutanten

Durch Sequenzanalysen der QP-Peptide konnte bereits das Vorhandensein von L-Domänen, die eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung viraler Partikel spielen, ausgeschlossen werden (Demirov und Freed, 2004; Chudak et al., 2013). Die Analysen basierten auf der Tatsache, dass Retroviren wie HIV-1 und EIAV je ein kleines, C-terminales Protein mit einer L-Domäne aufweisen (Freed, 2001, 2002). Weitere Untersuchungen bezüglich der Funktion von QP1 und QP2 wurden noch nicht vorgenommen.

Durch die Klonierung von QP-Deletionsmutanten sollte in den folgenden Versuchen deren möglicher Einfluss auf die intrazelluläre Gag-Verteilung, den Transport, die Assemblierung, das Budding und die Reifung viraler Partikel mikroskopisch untersucht werden. Die QP-Deletionsmutanten basierten auf den Konstrukten CMV_{orico}HERV-K113, oricoGagCherry sowie oricoGagHERV-K113 (Abbildung 20) und wurden mittels Mutagenese-PCR (Abschnitt 2.2.1.2) generiert.

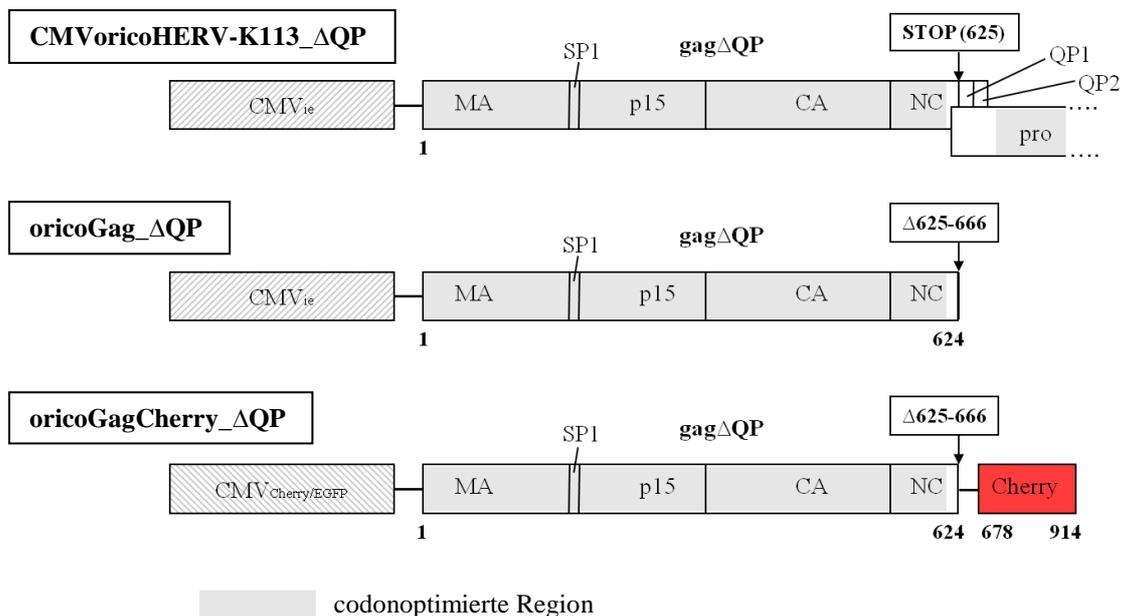


Abbildung 35: QP-Deletionsmutanten der oricoHERV-K113-Konstrukte

Die Konstrukte CMV_{orico}HERV-K113, oricoGagHERV-K113 und oricoGagCherry wurden C-terminal so verändert, dass QP-Deletionsmutanten (CMV_{orico}HERV-K113_ΔQP, oricoGag_ΔQP und oricoGagCherry_ΔQP) daraus hervorgingen.

Die Gag-Sequenz von CMV_{orico}HERV-K113 wurde an der Position 625 (Prolin), im ersten Codon des QP1-Peptides durch Nukleotidaustausche in ein Stopp-Codon umgewandelt. Bei den Konstrukten *oricoGag*HERV-K113 und *oricoGagCherry* wurde die Sequenz des *gag*-Gens C-terminal um 42 Aminosäuren (Δ 625-666) deletiert (Abbildung 35). Die daraus resultierenden Konstrukte CMV_{orico}HERV-K113_ Δ QP, *oricoGag*_ Δ QP und *oricoGagCherry*_ Δ QP führten nach der Transfektion zur Expression der C-terminal verkürzten Gag-Vorläuferproteine Gag Δ QP beziehungsweise GagCherry Δ QP. Diese Konstrukte stellten die Grundlage der folgenden Versuche dar.

3.2.2 Gag Δ QP wird exprimiert und akkumuliert an der Zellmembran

Um den Einfluss der QP-Peptide auf die intrazelluläre Verteilung und die Akkumulation des Vorläuferproteins Gag an der Plasmamembran zu untersuchen, wurde lichtmikroskopisch das intrazelluläre Verteilungsmuster von Gag Δ QP/GagCherry Δ QP mit dem von Gag verglichen.

Dafür wurden HEK293T-Zellen mit den QP-Deletionsmutanten beziehungsweise ihrem Mischungsverhältnis von 1:5 und zur Kontrolle mit den Ursprungsstrukturen transfiziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellmembranen mit dem Lebendfarbstoff DiO angefärbt und für die lichtmikroskopischen Untersuchungen präpariert (je $n = 3$).

Sowohl Fluoreszenzprotein-markiertes als auch unmarkiertes Gag Δ QP wurde innerhalb von 16 Stunden stark exprimiert und deutlich an der Zellmembran transfizierter Zellen detektiert (Abbildung 36). Zudem konnten auch intrazelluläre Gag Δ QP-Akkumulationen beobachtet werden (Abbildung 36), die in der Lebendzellmikroskopie einen mobilen oder stationären Zustand aufwiesen, wie auch die GagCherry-Akkumulationen (Film 2). Somit unterschieden sich die Deletionsmutanten weder in ihrer Expressionsrate noch in ihrer intrazellulären Verteilung von den *orico*HERV-K113 Konstrukten mit QP-Sequenzen (Abbildung 23). Demnach schienen QP1 und QP2 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung, Kinetik und Akkumulation von Gag an der Zellmembran zu haben.

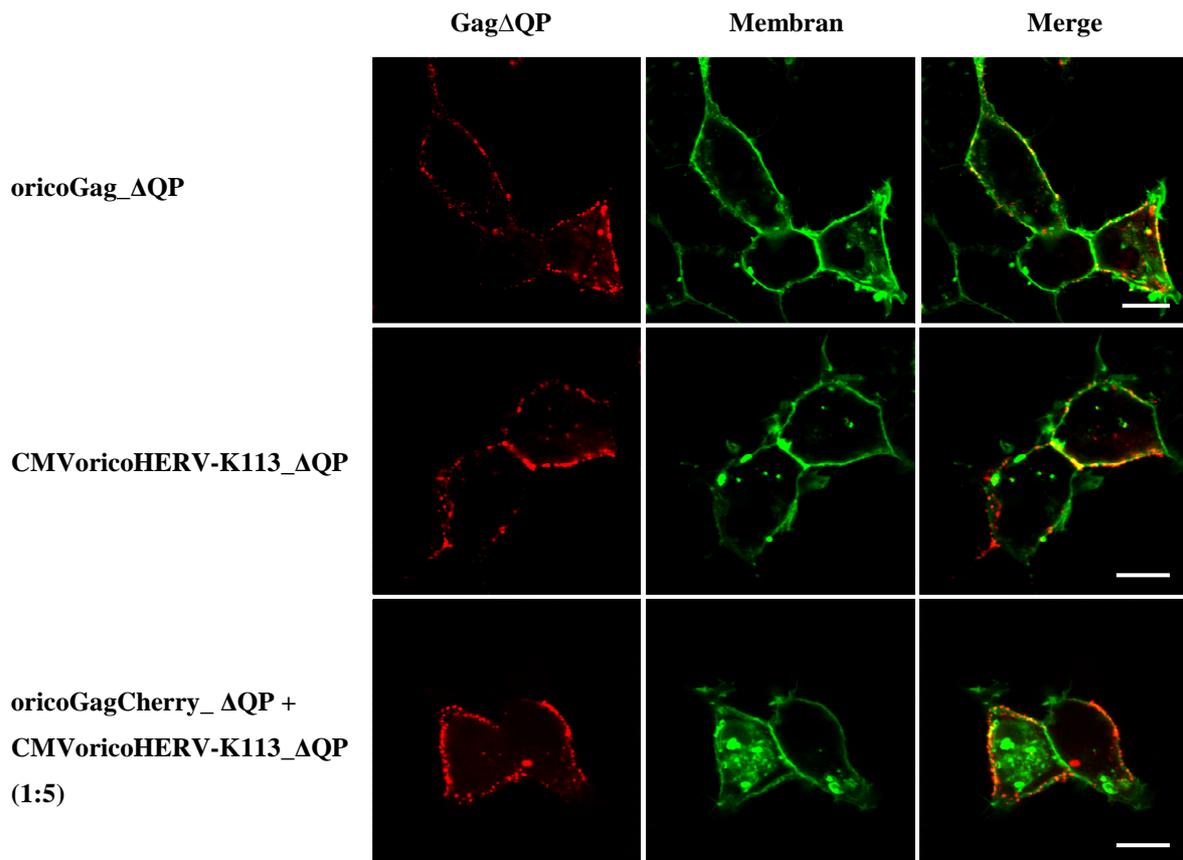


Abbildung 36: Markiertes und unmarkiertes Gag Δ QP akkumuliert an der Zellmembran

HEK293T-Zellen, transfiziert mit den QP-Deletionsmutanten und deren Mischungsverhältnis von 1:5 (je $n = 3$), in der konfokalen Laserscanningmikroskopie 16 Stunden nach Transfektion. Die Lebendzellfärbung der Zellmembran erfolgte mit DiO. Nach anschließender Fixierung wurde unmarkiertes Gag Δ QP mit dem Rattenserum gegen das Kapsidprotein und Alexa 568 gegen Ratte nachgewiesen. (Maßstab: 10 μ m)

3.2.3 Die QP-Peptide haben keinen Einfluss auf die Gag-Assemblierung

In dem folgenden Versuch sollte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie geklärt werden, ob das Fehlen der QP-Peptide die Assemblierung des Gag-Proteins an der Zellmembran (C-Typ) oder die Morphologie der Buddingstrukturen beeinflusst.

Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit den QP-Deletionsmutanten oricoGag_ Δ QP, oricoGagCherry_ Δ QP und CMVoricoHERV-K113_ Δ QP, sowie deren Mischungsverhältnis von 1:5 transfiziert. Als Kontrollen wurden die nicht deletierten oricoHERV-K113 Konstrukte herangezogen. Nach 48 Stunden erfolgte die Präparation der Proben für transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen ($n = 3$).

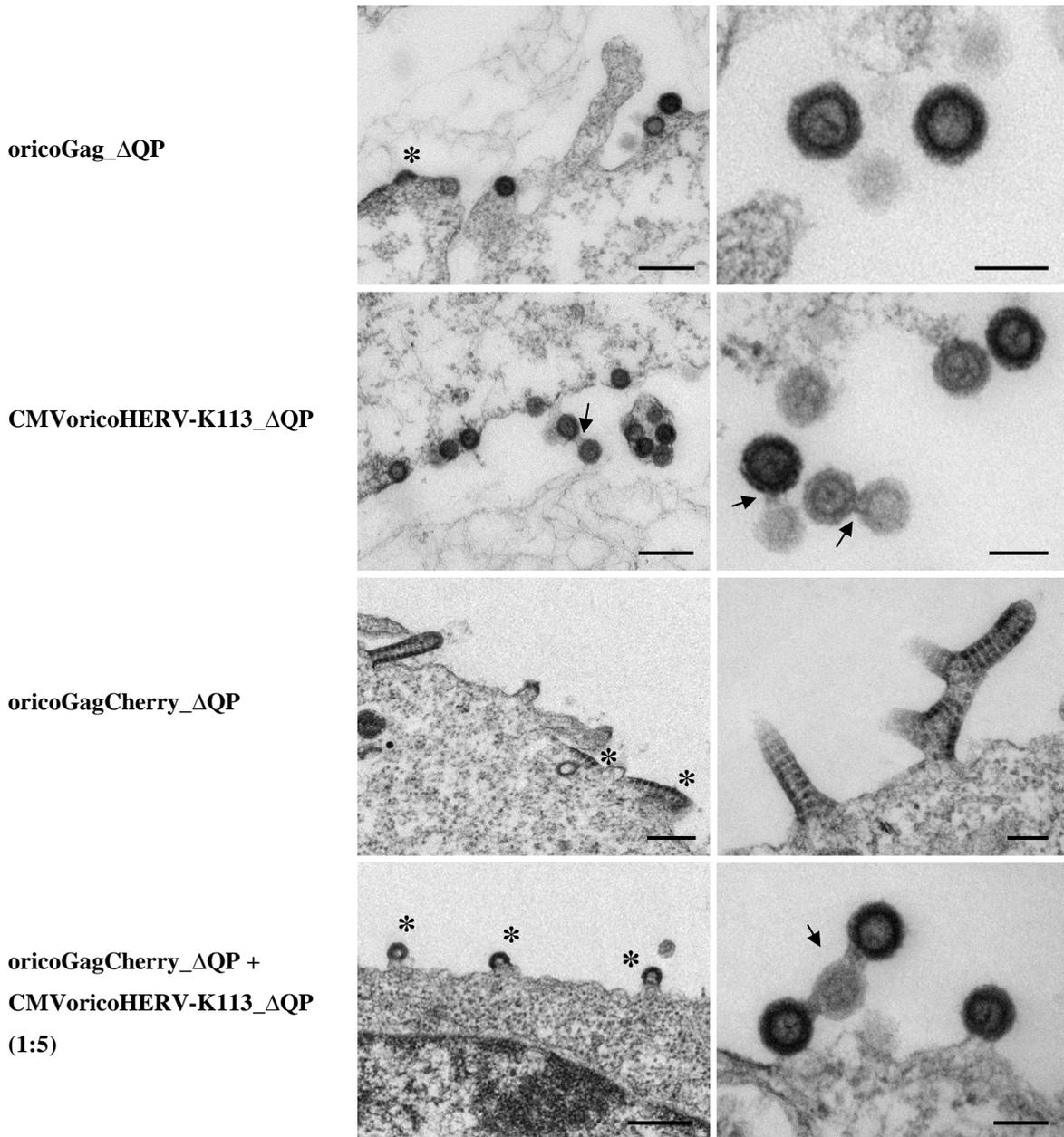


Abbildung 37: Transmissionselektronenmikroskopie der QP-Deletionsmutanten

Die QP-Deletionsmutanten der oricoHERV-K113-Konstrukte zeigten keine Unterschiede in der Assemblierung (Stern) im Vergleich zu Gag beziehungsweise GagCherry (Abbildung 24 und 25). Auch hier konnten Buddingketten (Pfeile), unreife virale Partikel und tubuläre Buddingstrukturen beobachtet werden. (Maßstab: linke Spalte: 300nm; rechte Spalte: 100nm)

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der QP-Deletionsmutanten zeigten, dass auch Gag Δ QP zu virusartigen, viralen Buddingstrukturen und VLPs assemblierte (Abbildung 37). Dabei lagerten sich die Gag Δ QP-Untereinheiten an die Membran an, diese stülpte sich nach außen und es kommt zum Budding unreifer VLPs (Abbildung 37, Sterne). GagCherry Δ QP bildete hingegen tubuläre Buddingstrukturen an der Zelloberfläche. Diese Formen der Assemblierung an der Plasmamembran konnten

auch bei Gag und GagCherry beobachtet werden (Abbildung 25). Somit wiesen die QP-Deletionsmutanten, wie auch die nicht deletierten Konstrukte, eine C-Typ-Assemblierung auf (Nermut und Hockley, 1996). Bei einigen wenigen, Gag Δ QP beziehungsweise das Mischungsverhältnis exprimierenden Zellen konnte zudem eine verstärkte Anhäufung von hüllenlosen, viralen Partikeln unter der Plasmamembran beobachtet werden. Es zeigte, dass auch bei den Deletionsmutanten eine Überexpression des viralen Polystrukturproteins zu einer A/B-Typ-Morphologie führen kann. Die Kontrollen unterschieden sich optisch nicht von den Daten aus Abbildung 24-26 und verdeutlichten, dass sich alle QP-Deletionsmutanten bezüglich Assemblierung und Budding wie die nicht deletierten oricoHERV-K113 Gag-Proteine verhielten. Somit haben QP1 und QP2 keinen Einfluss auf diese Prozesse in der späten Phase des viralen Replikationszykluses.

3.2.4 VLPs der QP-Deletionsmutanten werden freigesetzt und reifen extrazellulär

Das Fehlen der Peptide QP1 und QP2 beeinflusste das intrazelluläre Verteilungsmuster von Gag sowie Assemblierung und Freisetzung der VLPs nicht. Ob diese jedoch Einfluss auf die Partikelreifung haben, galt es im nächsten Schritt zu überprüfen. Für das Cterminale p6-Protein von HIV-1 Gag ist bereits bekannt, dass es an der Prozessierung des Kapsidproteins beteiligt ist und somit Einfluss auf die Reifung hat (Votteler et al., 2011).

Es wurden HEK293T-Zellen mit den QP-Deletionsmutanten oder den nicht deletierten Konstrukten, sowie deren Mischungsverhältnissen (1:5) transfiziert. Die nach 48 Stunden durch Ultrazentrifugation isolierten, viralen Strukturen aus den Zellkulturüberständen (UZ-Pellets) wurden mittels Western Blot und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (n = 4).

Aus den Western Blot-Analysen (Abbildung 38) ging hervor, dass wie erwartet die Vorläuferproteine der QP-Deletionsmutanten eine etwas geringere Proteinmasse besaßen als die Ursprungsstrukturen. Die sehr schwachen bei 85kDa (Gag) und 80kDa (Gag Δ QP) liegenden Banden des anti-Gag Blots zeigten dies deutlich. Zellkulturüberstände von Zellen, transfiziert mit oricoGagHERV-K113 (Gag), oricoGag Δ QP (Gag Δ QP), oricoGagCherry (GagCherry) oder oricoGagCherry Δ QP (GagCherry Δ QP), wiesen in beiden Blots der Abbildung 38 nur unprozessiertes Protein auf, was auf das Fehlen der viralen Protease zurückzuführen war. Einzelne dünne Banden von Spaltprodukten im Bereich 85kDa bis 57kDa konnten bei diesen Proben dennoch beobachtet werden.

Legende:

1. oricoGagHERV-K113
2. oricoGag_ΔQP + oricoGagCherry_ΔQP (5:1)
3. CMVoricoHERV-K113
4. CMVoricoHERV-K113_ ΔQP
5. CMVoricoHERV-K113_ ΔQP + oricoGagCherry_ΔQP (5:1)
6. CMVoricoHERV-K113 + oricoGagCherry (5:1)
7. oricoGagCherry_ΔQP
8. oricoGagCherry

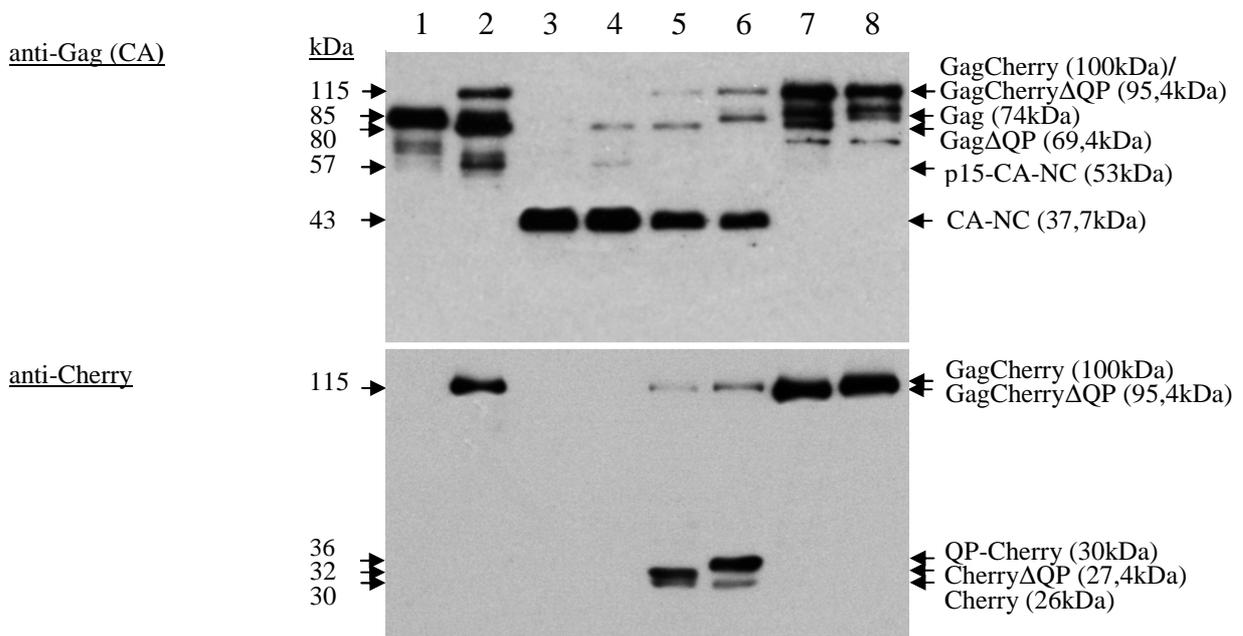


Abbildung 38: GagCherryΔQP wird in VLPs eingebaut und wie GagΔQP prozessiert

Western Blot ultrazentrifugierter Zellkulturüberstände von HEK293T-Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Die Blots wurden gegen das Gag-Protein (Rattenserum: anti-CA Protein HERV-K113 + Ziege anti-Ratte HRP) oder gegen das Fluoreszenzprotein Cherry (Kaninchen anti-DsRed und Ziege anti-Kaninchen HRP) angefärbt. Die berechneten Molekularmassen der Proteine befinden sich in Klammern. Marker: Page Ruler

Durch Anwesenheit der viralen Protease erfolgte die Prozessierung von Gag, GagΔQP (Abbildung 38, anti-Gag Blot: Spur 3-6), GagCherry und GagCherryΔQP (Abbildung 38, anti-Cherry Blot: Spur 5 und 6). Es konnten je eine sehr starke 43kDa-Bande bestehend aus Kapsid- und Nukleokapsidprotein (CA-NC) im anti-Gag Blot und weitere Spaltprodukte bei den Mischungsverhältnissen des anti-Cherry Blots detektiert werden. Hier zeigten sich bei dem Mischungsverhältnis 1:5 der nicht-deletierten Konstrukte eine 36kDa Bande, bestehend aus dem Cherry-Protein mit N-terminal gebundenem QP1 und QP2, und eine 30kDa Bande des reinen Cherry-Proteins. Letztere konnte auch bei dem Mischungsverhältnis der QP-Deletionsmutanten detektiert werden und zudem eine knapp

darüber laufende Bande von 32kDa. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um 12 nicht-kodierende, N-terminale Aminosäuren (1,4kDa), die sich als nicht kodierender Bereich zwischen Gag und dem Fluoreszenzprotein befinden. Die Daten verweist auf eine virale Protease-abhängige Reifung der VLPs, ohne das QP1 sowie QP2 Einfluss darauf nehmen.

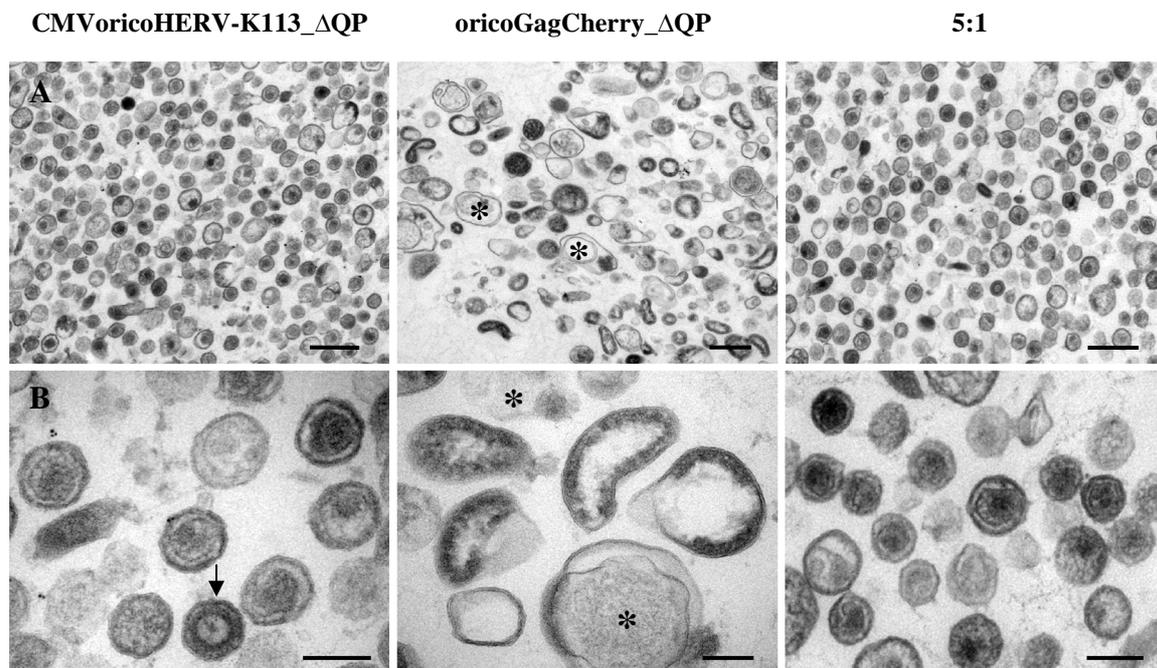


Abbildung 39: UZ-Pellets von Zellkulturüberständen der QP-Deletionsmutanten

UZ-Pellets in der Übersicht (A) und vergrößerte Bereiche (B) 48 Stunden nach Transfektion in der Transmissionselektronenmikroskopie. Die QP-Deletionsmutanten zeigten auch hier keine Unterschiede im Vergleich zu den nicht deletierten Konstrukten (Abbildung 31). Zelltrümmer (Stern), unreifes VLP (Pfeil). (Maßstab: A: 300nm; B: 100nm)

Neben den Western Blot-Analysen wurden die UZ-Pellets der Zellkulturüberstände eingebettet und mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (Abbildung 39). Hier konnten große Pellets reifer VLPs mit dem typischen elektronendichten Kern 48 Stunden nach Transfektion mit CMVoricHERV-K113_ΔQP oder dem Mischungsverhältnis 1:5 beobachtet werden. Es wurden vereinzelt auch unreife VLPs (Abbildung 39, Pfeil), sowie einige tubuläre Strukturen von GagCherryΔQP bei dem UZ-Pellet des Mischungsverhältnisses gefunden. Fast ausschließlich tubuläre Strukturen wies das UZ-Pellet von Zellen, transfiziert mit oricoGagCherry_ΔQP, auf. Sie unterschieden sich optisch nicht von den tubulären Buddingstrukturen der eingebetteten, transfizierten Zellen (Abbildung 39 und 37). Alle UZ-Pellets zeigten auch einen gewissen Anteil an Zelltrümmern, wie zum Beispiel runde zelluläre Membranstrukturen oder

unvollständig freigesetzte virale oder tubuläre Buddingstrukturen (Abbildung 39, Stern). Die Ergebnisse korrelierten mit denen der eingebetteten UZ-Pellets der Zellkulturüberstände von Zellen, transfiziert mit den nicht-deletierten Konstrukten (Abbildung 31). Zudem unterstützen sie die Western Blot-Daten (Abbildung 38) und zeigen nochmals, dass die Peptide QP1 und QP2 keinen Einfluss auf die Bildung, Reifung und Freisetzung von sowohl markierten als auch unmarkierten viralen Partikeln haben.

Die Versuche im Rahmen der QP1- und QP2-Peptide am C-Terminus des viralen Polyproteins Gag konnten deren sichtbaren Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung, die Akkumulation an der Plasmamembran sowie auf die Assemblierung, Budding, Freisetzung und Reifung viraler HERV-K(HML-2) Partikel ausschließen. Demzufolge bleibt ihre Funktion bis dato noch ungeklärt.

3.3 Untersuchung des intrazellulären Transports von Gag

Im Abschnitt 3.1 wurde die Expression sowie die Assemblierung, das Budding und die Reifung der freigesetzten Fluoreszenzprotein-markierten Partikel untersucht. Wie jedoch das virale Polyprotein Gag zur Plasmamembran gelangt ist noch unklar. Bereits aus früheren Studien zu HIV-1 und anderen Retroviren wurde ersichtlich, dass Gag sowohl direkt oder auch mittels endosomalen Stoffwechselweg zur Plasmamembran gelangen kann (Abschnitt 1.2.3.1). Zudem bewegte sich oricoHERV-K113 GagCherry als Akkumulation sehr zügig im Zytoplasma der transfizierten Zelle und der Zustand wechselte zwischen mobileren und stationären Phasen (Abschnitt 3.1.2.1; Film 1 und 2). In den folgenden Versuchen soll durch mikroskopische Methoden ein Einblick in den intrazellulären Transport und die Lokalisation sowie den Zielort der Gag-Akkumulationen gewonnen werden. Ebenso werden auch mögliche Abweichungen durch die Deletion von QP1 und QP2 untersucht.

3.3.1 Gag-Akkumulationen bewegen sich in hoher Geschwindigkeit

Die zytoplasmatischen, mobilen GagCherry-Akkumulationen in transfizierten Zellen wurden im folgenden Versuch auf ihre Kinetik hin untersucht, um Aufschluss über deren intrazellulären Transport zu bekommen. Anhand der Bewegungsgeschwindigkeit und des Bewegungsschemas können möglicherweise erste Rückschlüsse auf den Transportweg geschlossen werden (Lasek et al., 1984; Brown et al., 2003; Kaasik et al., 2007; Jouvent et al., 2008; Rogers et al., 2010; Flores-Rodriguez et al., 2011).

Die in Echtzeit gut wahrnehmbaren, schnellen Bewegungen der Akkumulationen im Zytoplasma der Zellen sollten mittels Lebendzellmikroskopie (Nikon) schnellstmöglich detektiert und im Anschluss mittels Tracking-Modul der NIS-Software ausgewertet werden. Das Tracking-Modul ermöglichte die Datenauswertung jedoch nur in den Dimensionen X und Y, aber nicht in Z. Um trotzdem ein bestmögliches Ergebnis bezüglich der Kinetik zu erzielen, wurde der Bewegungsradius der GagCherry-Akkumulationen in der Z-Dimension durch Nutzung der sehr flachen HUH7-Zellen eingeschränkt. In der Zellperipherie umfasst deren Z-Dimension im adherenten Zustand etwa 5µm, die von HEK293T-Zellen etwa 12µm. Für das Tracking wurden Filmabschnitte ausgewählt, die mobile Akkumulationen in einer Fokusebene über einen längeren Zeitraum zeigten.

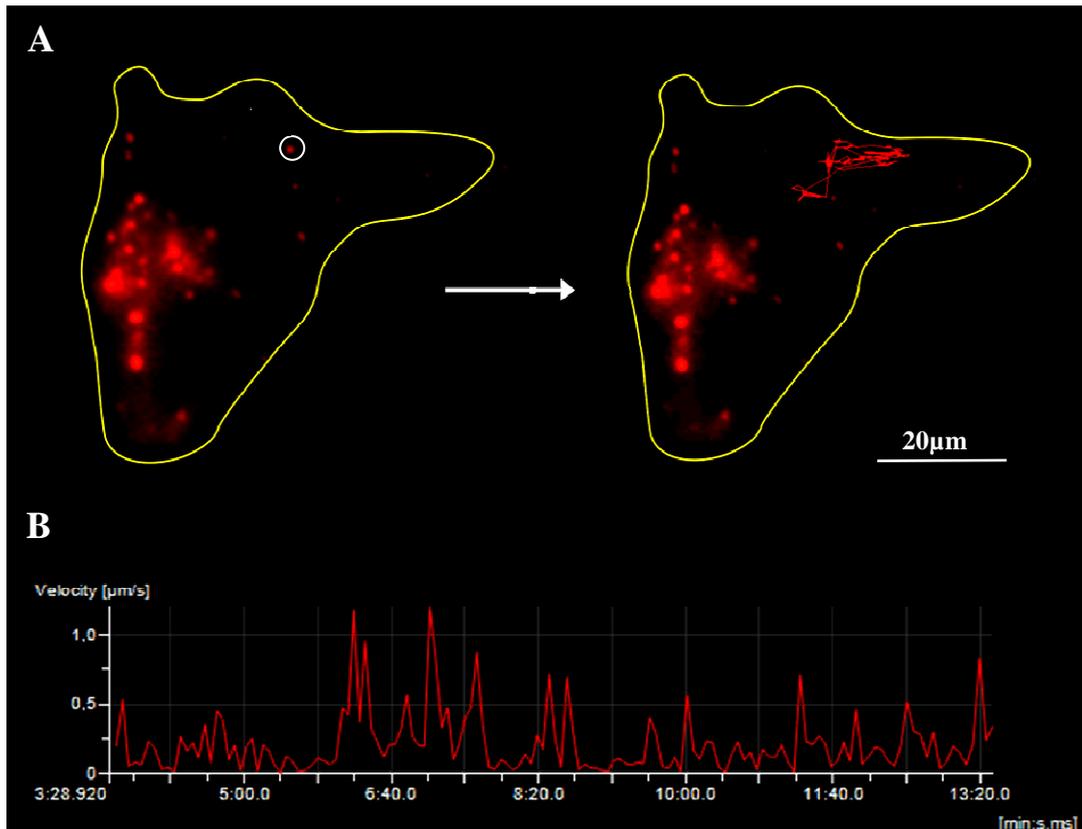


Abbildung 40: Tracking einer mobilen GagCherry-Akkumulation

A: HUH7-Zelle, transfiziert mit oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 im Mischungsverhältnis 1:5 nach 24 Stunden ($n = 5$). Die runden GagCherry-Akkumulationen im Zytoplasma der Zelle waren deutlich sichtbar. Die Zellgrenze ist durch eine gelbe Linie visualisiert. Der von der Akkumulation (Kreis) in zehn Minuten zurück gelegte Weg in X- und Y-Dimension wurde durch die rote Linienführung dargestellt. **B:** Im Diagramm wurde die Geschwindigkeit der GagCherry-Akkumulation im Bezug zur Zeit aufgetragen. Die Kinetik der GagCherry-Akkumulation wurde nochmals im Film 4 verdeutlicht.

Am Beispiel der in Abbildung 40A und Film 4 untersuchten, mobilen GagCherry-Akkumulation geht hervor, dass sich diese in einem bestimmten Zytoplasmabereich der transfizierten Zelle von etwa $20\mu\text{m}$ mal $20\mu\text{m}$ bewegte und einen Gesamtweg von etwa $135\mu\text{m}$ zurücklegte. Zudem wurde eine inhomogene Geschwindigkeit der GagCherry-Akkumulation gemessen (Abbildung 40B). Die Geschwindigkeit variierte nicht nur innerhalb, sondern auch zwischen den Akkumulationen stark und konnte in drei Bereiche untergliedert werden (Film 4). Oft bewegten sie sich in einem Geschwindigkeitsfenster von $0-0,4\mu\text{m/s}$. Häufig wurde auch eine Geschwindigkeit im Bereich von $0,4-1\mu\text{m/s}$ detektiert. Eher selten traten Geschwindigkeiten im Bereich von $1-2\mu\text{m/s}$ auf. Dieses Muster in der Geschwindigkeitsverteilung konnte bei insgesamt 10 GagCherry-Akkumulationen beobachtet werden. Die Akkumulation in Abbildung 40 zeigte eine maximale Geschwindigkeit von $1,1\mu\text{m/s}$, sowie eine Durchschnittsgeschwindigkeit von $0,4\mu\text{m/s}$. Da die Z-Dimension nicht mit in die Messungen einbezogen werden konnte,

kann von einer höheren Durchschnittsgeschwindigkeit ausgegangen werden. Auch wechselten GagCherry-Akkumulationen zwischen einem mobilen und stationären Zustand.

Da sich das Vorläuferprotein GagCherry als Akkumulation in einer recht hohen Geschwindigkeit durch die Zelle bewegte, kann von einem aktiven Transport durch zelluläre Kompartimente ausgegangen werden. In den folgenden Versuchen sollten diese identifiziert werden, um Rückschlüsse auf den Zielort der Gag-Akkumulationen zu ziehen. Denn bereits für den HIV-1 Gag-Transport nach Expression wurde neben dem direkten Weg zur Plasmamembran auch der endosomale Weg beschrieben (Ono, 2009; Abbildung 9). Eine Diffusion im Zytoplasma der Zelle kann aufgrund der Größe der Gag-Akkumulationen ausgeschlossen werden.

3.3.2 Gag und Mikrotubuli befinden sich nur selten in räumlicher Nähe zueinander

Um für das Vorläuferprotein Gag das Transportmittel der Wahl zu identifizieren, wurde als erstes ein Augenmerk auf den Transport mittels Mikrotubuli gelegt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Mikrotubuli bei Adenoviren, Vakziniaviren oder Herpes-Simplex-Viren für den zytoplasmatischen Transport der Partikel von oder zur Plasmamembran verantwortlich sein können (Hollinshead et al., 2001; Dinh et al., 2005; Lee et al., 2006). Aber auch der antero- und retrograde sowie der endosomale Transport erfolgt mittels Mikrotubuli (Anitei et al., 2010).

Für diese Untersuchungen wurden HEK293T-Zellen mit YFP-Tubulin und oricoGagCherry oder oricoGagCherry_ΔQP im Verhältnis 1:8 transfiziert und nach 16 Stunden für die konfokale Laserscanningmikroskopie präpariert (n = 10).

Aus der Abbildung 41 wird ersichtlich, dass vereinzelt eine räumliche Nähe von GagCherry als auch GagCherryΔQP zum Mikrotubuli-bildenden Fusionsprotein YFP-Tubulin in der Zellperipherie auszumachen war. Durch die Analyse vieler Proben stellte sich heraus, dass es sich dabei um nur seltene, spontane Ereignisse der räumlichen Nähe beider Proteine zueinander handelte. Es zeigte, dass die Gag-Akkumulationen nicht direkt mittels Mikrotubuli transportiert werden, sondern wahrscheinlich indirekt über vesikuläre Kompartimente. Dies galt es in den nächsten Schritten zu prüfen.

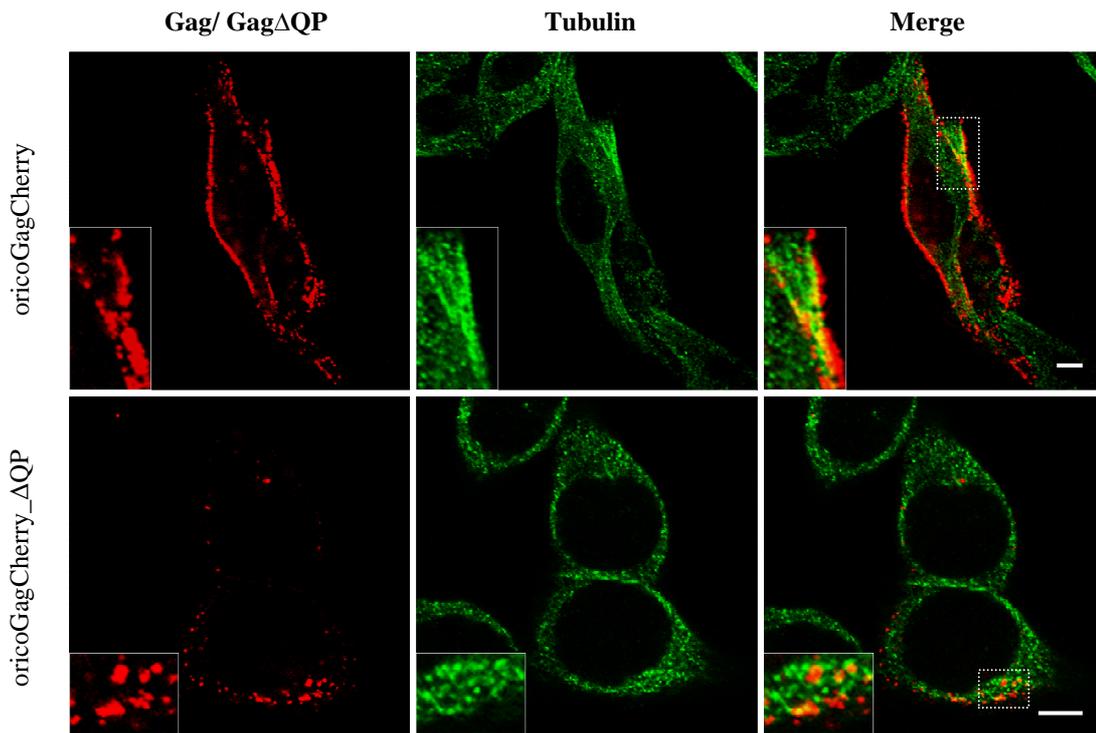


Abbildung 41: GagCherry kolokalisiert sehr selten mit Mikrotubuli

Expression von YFP-Tubulin und GagCherry oder GagCherry Δ QP in HEK293T-Zellen 16 Stunden nach Transfektion in der konfokalen Laserscanningmikroskopie. Gleiche Beobachtungen wurden auch bei den Konstrukten CMV_{orico}HERV-K113 und deren QP-Deletionsmutante gemacht. (Maßstab: 5 μ m)

3.3.3 Gag ist an oder in vesikulären Zellkompartimente lokalisiert

Bei einigen vorherigen Versuchsansätzen konnte eine enge räumliche Nähe beziehungsweise eine Inkorporation von GagCherry oder VLPs in vesikulären Kompartimenten beobachtet werden. Die konfokale Laserscanningmikroskopie zeigte, dass GagCherry bei einigen transfizierten Zellen an intrazellulären, vesikulären Membranen lokalisiert war (Abbildung 42A und B). Dafür wurde für einen Versuch das Zytoplasma transfizierter Zellen mittels EGFP-Leervektor fluoreszenzmarkiert, um vesikuläre Kompartimente zu visualisieren (Abbildung 42A). Sie zeigten sich als unmarkierte, runde Strukturen in der Zelle. Ein Z-Stack der in Abbildung 42B dargestellten Zelle verdeutlichte die intrazelluläre Lage der mit GagCherry „kolokolisierenden“ Membranen, die mittels DiO-Membranfarbstoff dargestellt wurden. Es handelte sich nicht um Oberflächeneinstülpungen der Plasmamembran, sondern eher um intrazelluläre, in sich geschlossene, vesikuläre Strukturen (Film 5). Zudem zeigten einige transfizierte Zellen in der Transmissionselektronenmikroskopie eine Anhäufung von viralen Partikeln an der zytoplasmatischen Seite intrazellulärer Membranen oder an beziehungsweise in vesikulären Strukturen (Abbildung 42C-F). Dabei handelte es sich fast

ausschließlich um unreife, virale A/B-Typ-Partikel ohne Hüllmembran, wahrscheinlich zurückzuführen auf eine Überexpression von Gag. Es konnten aber auch im Lumen der Vesikel einige reife VLPs beobachtet werden, die sich von extrazellulären, reifen VLPs nicht unterscheiden (Abbildung 42C und D, Pfeil).

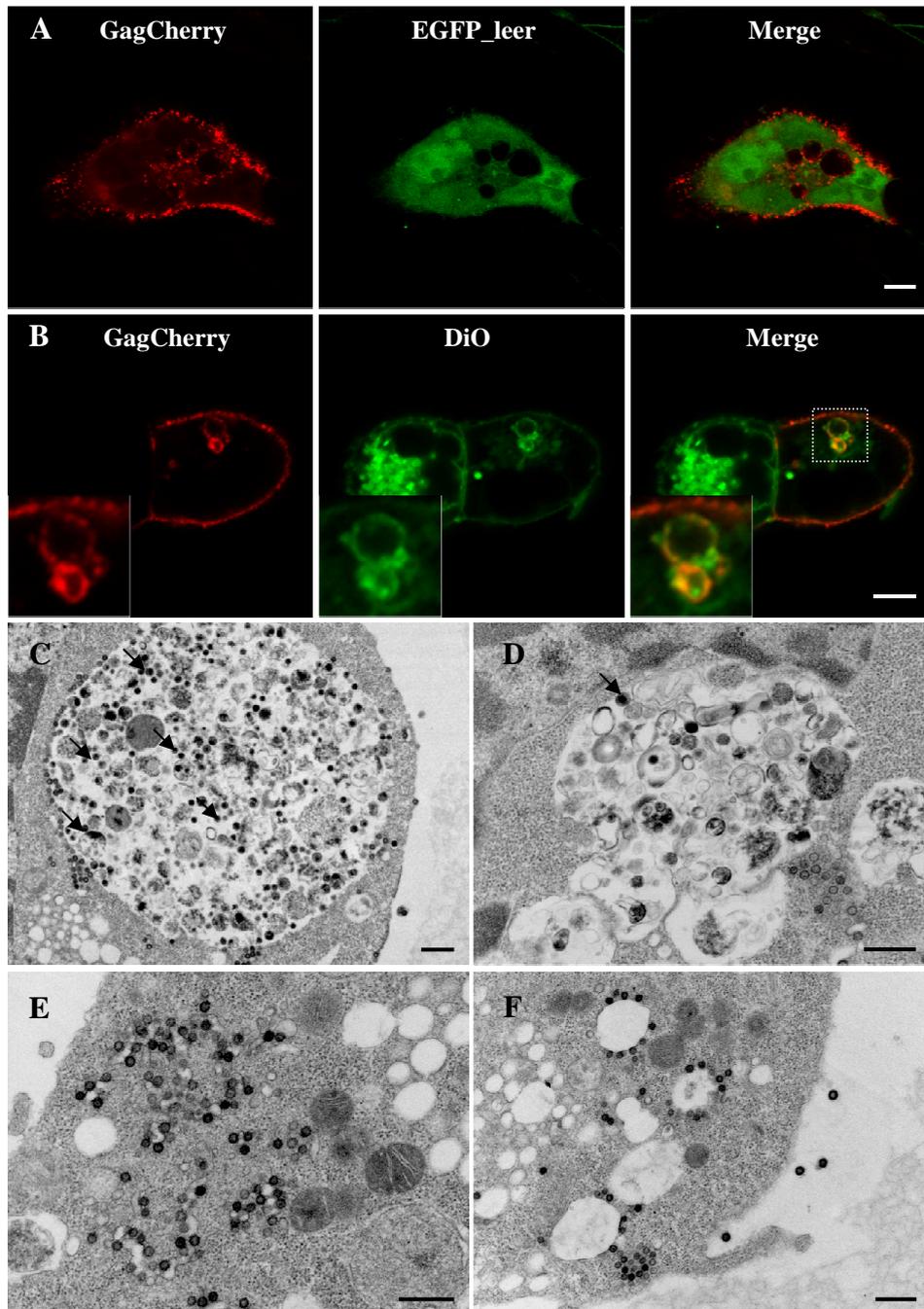


Abbildung 42: Intrazelluläre Lokalisation von HERV-K113 GagCherry und viralen Partikeln

A: HEK293T-Zelle 24 Stunden nach Transfektion im Verhältnis 8:1 mit den Plasmiden oricoGagCherry und EGFP-Leervektor zur Identifizierung vesikulärer Kompartimente. B: HEK293T-Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit CMVoricohERV-K113 und oricoGagCherry (5:1) sowie einer Membranfärbung mit DiO. Z-Stack siehe Film 5 C-F: HEK293T-Zellen transfiziert mit CMVoricohERV-K113 nach 48 Stunden. Intrazelluläre Lokalisation von VLPs im Zytoplasma und an oder in vesikulären Strukturen. (A-D: konfokale Laserscanningmikroskopie, Maßstab: 5µm; C-F Transmissionselektronenmikroskopie, Maßstab: 500nm)

Die Literatur bekräftigte diese Beobachtungen, da das Endomembransystem bei HIV-1 in die Assemblierung und Freisetzung von viralen Partikeln involviert zu sein scheint (Jouvenet et al., 2006). Auch verweisen Publikationen bezüglich des intrazellulären Transports von endozytotischen Vesikeln und Lysosomen auf deren maximale Transportgeschwindigkeit von 1-3µm/s (Brown, 2003). Mikrotubuli bilden dabei den molekularen Motor, um diese Membrankompartimente durch das Zytoplasma an ihren Bestimmungsort zu transportieren (Soldati und Schliwa, 2006).

In den folgenden Versuchen sollte nun geklärt werden, mit welchen intrazellulären Membrankompartimenten Gag interagiert, um Aufschluss über den möglichen Transportweg und Zielort des viralen Proteins beziehungsweise der intravesikulären VLPs zu erhalten.

3.3.3.1 Gag-Akkumulationen sind teils an Lysosomen lokalisiert

Bereits für die Retroviren HIV-1 und MLV wurde die Lokalisation des Vorläuferproteins Gag an lysosomalen Membranen beschrieben (Sherer et al., 2003; Jouvenet et al., 2006). Demnach wurden im folgenden Versuch transfizierte Zellen auf die Kolo-kalisation von viralem Gag-Protein mit Lysosomen überprüft, was auf den Abbau von Gag schließen ließe. Zur Identifikation lysosomaler Kompartimente wurde das Lysosomen-assoziierte Membranprotein-1 (Lamp1, CD107a) als Markerprotein gewählt. Lamp1 liegt vorwiegend in der Lysosomen/Endosomen-Membran metabolisch aktiver Zellen vor und kann geringfügig (1-2%) an der Plasmamembran detektiert werden (Fukuda, 1991; Furuta et al., 1999; Chang et al., 2002).

Für die konfokale Laserscanningmikroskopie wurden HEK293T-Zellen mit CMVoricoHERV-K113 oder CMVoricoHERV-K113_ΔQP und Lamp1-RFP (8:1) transfiziert, nach etwa 16 Stunden fixiert und Gag mittels Immunfluoreszenzfärbung markiert (je n = 4). Für lebendzellmikroskopische Untersuchungen (Film 6) wurden HUH7-Zellen mit oricoGagEGFP und CMVoricoHERV-K113 (1:5) transfiziert und Lysosomen durch den Lebendfarbstoff LysoTracker® Red DND-99 (Abschnitt 2.2.2.6.2) angefärbt. Der Farbstoff bildet seine Fluoreszenz nur im sauren Milieu aus.

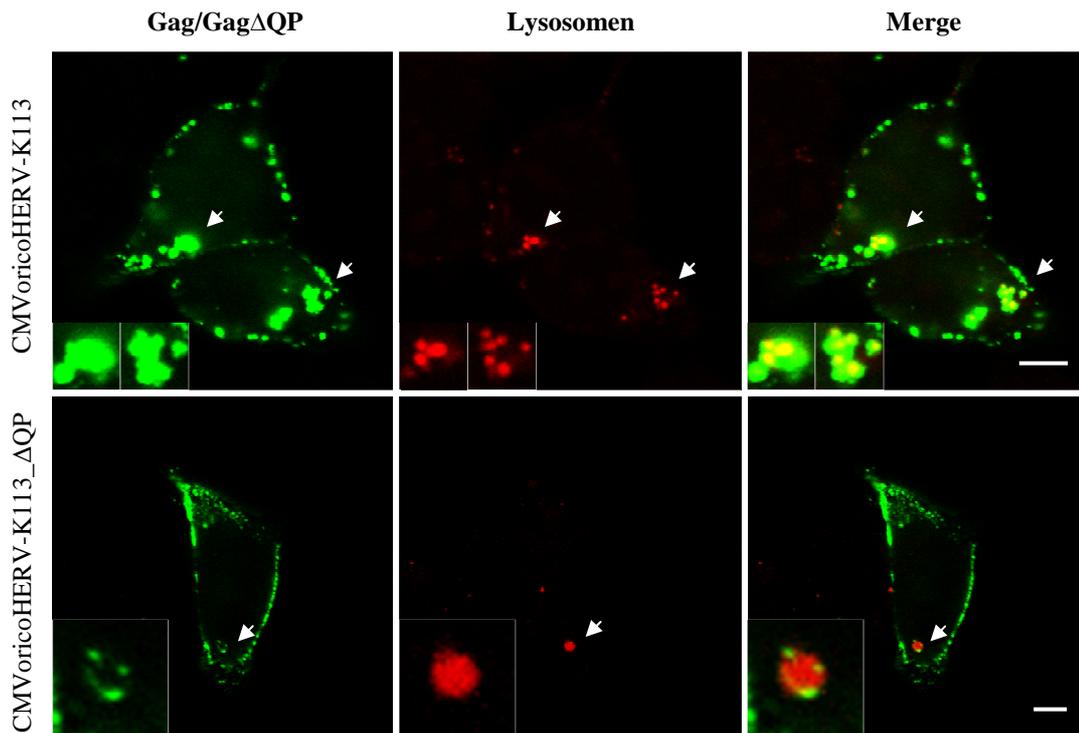


Abbildung 43: Gag ist an Lysosomen lokalisiert

Konfokale Laserscanningmikroskopie von Akkumulationen des Vorläuferproteins Gag als auch seiner QP-Deletionsmutante, welche bei einigen transfizierten HEK293T-Zellen an Lamp1-RFP-markierten Lysosomen lokalisiert waren (Pfeile). Gag als auch Gag Δ QP wurde mit Rattenserum anti-CA und anti-Ratte Alexa488 gegengefärbt. Die räumliche Nähe von intrazellulären Gag-Akkumulationen und Lysosomen konnte auch in Zeitserien festgehalten werden (Film 6). (Maßstab: 5 μ m)

Untersuchungen mittels konfokalen Laserscanningmikroskopie an fixierten Zellen deckten Akkumulationen von Gag als auch Gag Δ QP an der zytoplasmatischen Seite lysosomaler Membranen einiger transfizierter Zellen auf (Abbildung 43). Wenn dies der Fall war, dann an mehreren Lysosomen einer Zelle. Aus der Lebendzellmikroskopie ging hervor, dass Lysosomen mit Gag-Akkumulationen auf ihrer Oberfläche in einem bestimmten Gebiet und nicht durch das gesamte Zytoplasma wanderten (Film 6). Dieses räumlich begrenzte Bewegungsmuster wurde bereits bei kinetischen Untersuchungen beobachtet (Abschnitt 3.3.1). Zudem schloss die Lebendzellmikroskopie aus, dass es sich bei der detektierten, starken, räumliche Nähe von Gag-Akkumulationen zu Lysosomen in der konfokalen Laserscanningmikroskopie um Fixierungsartefakte handelte. Somit wird wahrscheinlich ein gewisser Anteil der Gag-Akkumulationen durch den lysosomalen Abbau recycelt und die daraus resultierenden Monomere dem Zellstoffwechsel wieder zuführt.

3.3.3.2 Gag häuft sich im Lumen später Endosomen an

Bereits in zahlreichen Veröffentlichungen wurde für Retroviren wie MLV, HIV-1 oder HTLV-1 die Akkumulation von Gag an späten Endosomen (Marker: rab7) beschrieben (Basyuk et al., 2003; Sherer et al., 2003; Blot et al., 2004). Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob HERV-K(HML-2) Gag ebenfalls an späten Endosomen auftritt.

Hierfür wurden HEK293T-Zellen für die konfokale Laserscanningmikroskopie und HUH7-Zellen für die Lebendzellmikroskopie mit CMV_{orico}HERV-K113 oder CMV_{orico}HERV-K113_ΔQP beziehungsweise oricoGagCherry und CMV_{orico}HERV-K113 (1:5) sowie EGFP-rab7wt transfiziert (je n = 4).

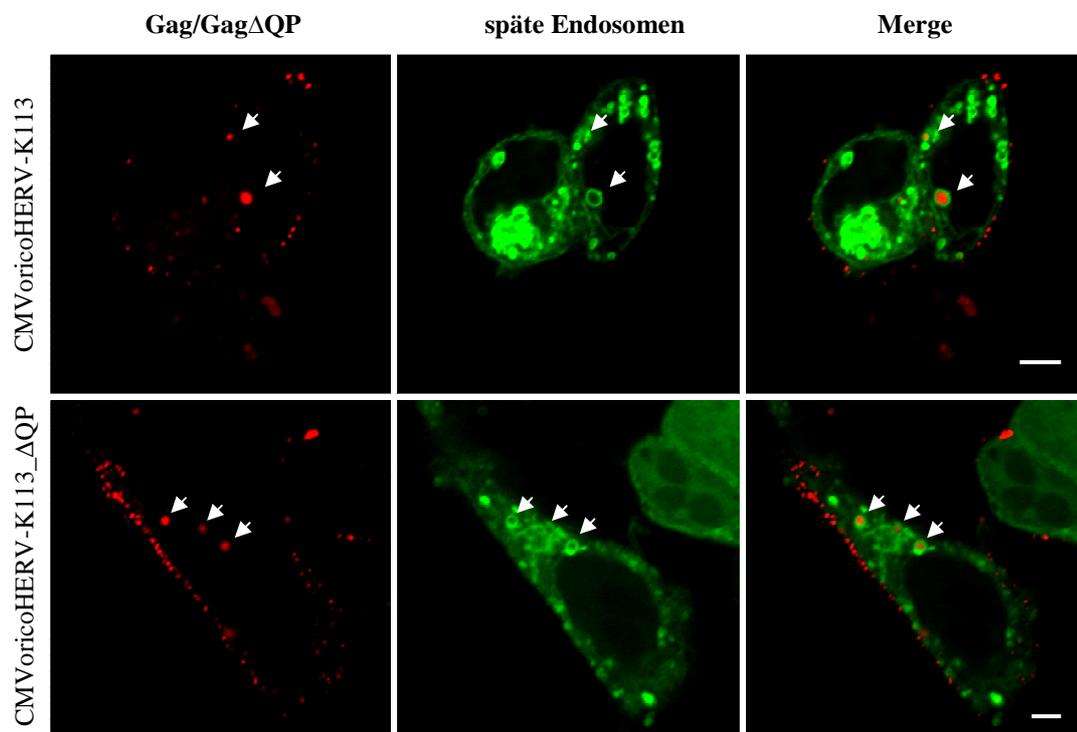


Abbildung 44: Gag ist im Lumen von späten Endosomen angereichert

Bei einigen transfizierten HEK293T-Zellen kam es nach 16 Stunden zu einer Anreicherung von Gag als auch GagΔQP, angefärbt mit Rattenserum anti-CA und anti-Ratte Alexa568, in späten Endosomen (EGFP-rab7wt). Die Daten konnten durch Zeitserien bestätigt werden (Film 7). (Maßstab: 5µm)

Aus Abbildung 44 wurde ersichtlich, dass Gag beziehungsweise GagΔQP in späten Endosomen einiger transfizierter Zellen gehäuft auftritt. Dabei füllte das virale Protein das gesamte Lumen homogen aus. Es konnten mehrere Gag-gefüllte, späte Endosomen in einer Zelle detektiert werden, die sich, wie aus der Lebendzellmikroskopie ersichtlich, in einem bestimmten Zytoplasmabereich bewegten (Film 7). Somit nahmen die Bewegungen nie das gesamte Zytoplasma der Zelle ein, was für die Gag-Akkumulationen auch beim Tracking nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.3.1). Diese Beobachtungen wurden

auch bei Zellen transfiziert mit dem Mischungsverhältnis 1:5 von oricoGagCherry und CMV_{orico}HERV-K113 (1:5) gemacht. Späte Endosomen spielten somit eine entscheidende Rolle beim intrazellulären Transport von Gag-Akkumulationen. Die QP-Peptide haben darauf keinen Einfluss.

3.3.3.3 Gag nur sehr selten in räumlicher Nähe zu Recycling-Endosomen

Eine Kollokalisierung von MLV oder HIV-1 Gag mit Recycling-Endosomen konnte bis heute nicht nachgewiesen werden (Sherer et al., 2003). Da jedoch eine Anhäufung von Gag in diesen Kompartimenten aufgrund von Überexpression des viralen Proteins nicht ausgeschlossen werden kann, wurden diesbezüglich mit dem Markerprotein rab11 für Recycling-Endosomen und oricoHERV-K113 Gag Kontrollversuche durchgeführt (Sonnichsen et al., 2000).

Hierfür wurden ebenfalls HEK293T-Zellen für die konfokale Laserscanningmikroskopie (n = 3) und HUH7-Zellen für die Lebendzellmikroskopie (n = 4) mit CMV_{orico}HERV-K113 oder CMV_{orico}HERV-K113_ΔQP beziehungsweise oricoGagEGFP und CMV_{orico}HERV-K113 (1:5) sowie DsRed-rab11wt transfiziert.

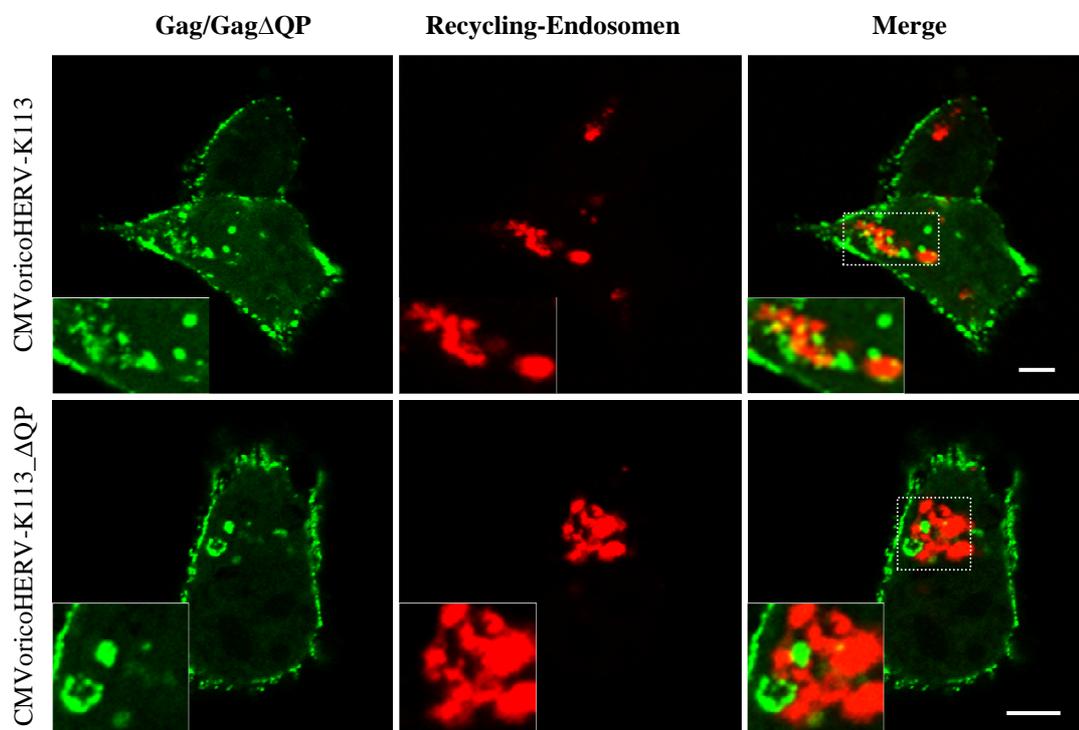


Abbildung 45: Gag befindet sich nur selten in räumlicher Nähe zu Recycling-Endosomen

Die konfokale Laserscanningmikroskopie 16 Stunden nach Transfektion detektierte Gag und Gag Δ QP, angefärbt mit Rattenserum anti-CA und anti-Ratte Alexa488, bei einigen sehr wenigen Zellen in enger räumlicher Nähe zu den Recycling-Endosomen (DsRed-rab11wt). Ein räumlicher Bezug von Gag oder Gag Δ QP zu Recycling-Endosomen konnte in der Lebendzellmikroskopie nicht hergestellt werden (Film 8). (Maßstab: 5 μ m)

Aus Abbildung 45 ging eine nur sehr selten auftretende, räumliche Nähe von Gag als auch Gag Δ QP zu Recycling-Endosomen hervor. Zudem bewiesen die lichtmikroskopischen Untersuchungen mittels Lebendzellmikroskopie, dass es sich dabei um eine zeitlich begrenzte, unspezifische, räumliche Nähe zueinander handelte, die während einer Zeitreihe auftrat und wieder verschwand (Film8). Die gleichen Beobachtungen konnten auch bei Zellen transfiziert mit oricoGagEGFP und CMVoricoHERV-K113 (1:5) sowie DsRed-rab11wt gemacht werden. Demnach kann kein Zusammenhang zwischen den intrazellulär mobilen der Gag-Akkumulationen und den Recycling-Endosomen hergestellt werden.

In diesem Abschnitte deckten kinetische Untersuchung auf, dass in den Transport der intrazellulären HERV-K(HML-2) Gag-Akkumulationen endosomale Zellkompartimente involviert zu sein scheinen. Weitere Untersuchungen zeigten die Lokalisation der Gag-Akkumulationen an lysosomalen Membranen und eine starke Anhäufung im Lumen später Endosomen. Ersteres lässt auf den Abbau des virale Proteins schließen, zweiteres auf dessen Transport zur Plasmamembran.

3.4 Untersuchungen zur Assemblierung von Env und Gag

Die vorherigen Versuche zeigten, dass HERV-K(HML-2) an der Plasmamembran assembliert (C-Typ), aber auch intrazelluläre, hüllenlose, virale Partikel im Zytoplasma transfizierter Zellen auftreten (A/B-Typ). Bis jetzt ist es noch nicht geklärt, wo genau HERV-K(HML-2) Env und Gag mit einander assemblieren. Wahrscheinlich findet dies an der Plasmamembran statt. Aber auch intrazelluläre Membranen können nicht ausgeschlossen werden (Ono und Freed, 2005; Saad et al., 2006). Zudem geht aus Publikationen hervor, dass oricoEnv, welches im Konstrukt CMVoricoHERV-K113 kodiert vorliegt, nur im geringen Maße exprimiert wird (Hanke et al., 2009). Die Zugabe eines HERV-K113 oricoEnv Konstrukts zum Transfektionsansatz soll die Expression des viralen Hüllproteins verstärken, um dessen Inkorporation in virale Partikel zu erhöhen. Ob das möglich ist, werden die kommenden Versuche zeigen.

3.4.1 Klonierung von oricoEnvTC für die Lebendzellmikroskopie

Für die Lebendzellmikroskopie wurde eine Markierung benötigt, die Env in seinem Verhalten und seiner Funktionalität nicht behindert. Aus früheren Untersuchungen ging hervor, dass HERV-K Env durch eine C- oder N-terminale Fluoreszenzprotein-Markierung seine Funktionalität verlor. Somit sollte für diese Untersuchungen auf eine Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoff *in vivo* zurückgegriffen werden. Hierfür wurde die oricoEnv-Sequenz direkt C-terminal mit einem sechs Aminosäure langem Tetracystein (TC)-Tag von 585Da versehen. Binden am TC-Tag die Bi-Arsenfarbstoffe FAsH oder ReAsH, so bilden sie ihre Fluoreszenz aus und können im lebenden System detektiert werden (Abschnitt 2.2.2.6.4). Dieses flexible Färbesystem wurde auch schon für *in vivo* Untersuchungen von HIV-1 Gag genutzt und hat sich dabei als funktionell erwiesen (Rudner et al., 2005; Perlman und Resh, 2006).

Für die Generierung von TC-markierten oricoEnv (oricoEnvTC) wurde das Konstrukt oricoEnv mit C-terminalem V5-Tag (oricoEnv-V5) herangezogen (Hanke et al., 2009). Direkt am 3'Ende der *env*-Sequenz wurde es durch die Mutagenese-PCR (Abschnitt 2.2.1.2) mit einem TC-Tag (CCPGCC) versehen, gefolgt von einem Stopp-Codon (Abbildung 46). Somit wurden der V5-Tag (14 AS) und die, zwischen ihm und der *env*-Sequenz befindlichen, vier nicht-kodierenden Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 2kDa entfernt.

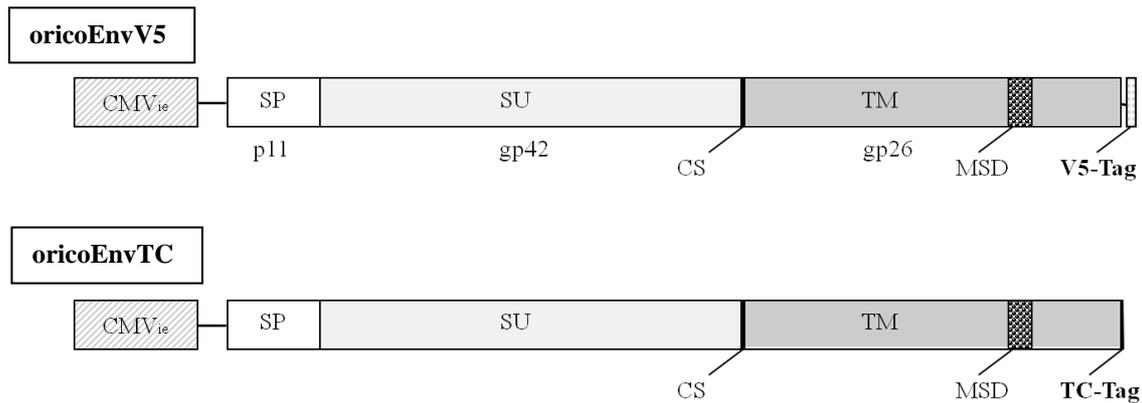


Abbildung 46: Verwendete Konstrukte von HERV-K113 oricoEnv

Verwendete Env-Konstrukte von oricoHERV-K113 mit Signalpeptid (SP), Oberflächenprotein (SU), Schnittstelle (CS) und Transmembranprotein (TM) mit Membran-durchspannender Domäne (MSD). C-terminal befanden sich ein V5-Tag (14AS) oder ein TC-Tag (6AS).

3.4.1.1 EnvTC ist intrazellulär und an der Plasmamembran lokalisiert

Die Funktionalität von oricoEnvV5 und dessen Einbau in virale Partikel ist bereits publiziert (Hanke et al., 2009). In den nächsten Versuchen galt es die Expression und intrazelluläre Lokalisation von oricoEnvTC zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Lokalisation von EnvTC an der Plasmamembran, die für die C-Typ-Assemblierung essentiell ist. Zudem galt es zu prüfen, ob der TC-Tag mittels FAsH-Färbung fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar ist. Damit wäre auch Env für lebendzellmikroskopische Untersuchungen detektierbar.

Hierfür wurden die HEK293T-Zellen mit oricoEnvV5 oder oricoEnvTC (Abbildung 46) und pcDNA3 im Verhältnis 1:8 transfiziert ($n = 4$). Nach etwa 20 Stunden wurden die zellulären Membranen *in vivo* mit DiO angefärbt und Env nach der Probenfixierung durch Immunfluoreszenz oder FAsH visualisiert (Abschnitt 2.2.2.6.1 und 2.2.2.6.4).

Sowohl EnvV5 als auch EnvTC konnte durch die Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Dabei wurden beide nahe des Zellkerns, im Zytoplasma als auch vereinzelt an der Plasmamembran detektiert und zeigten keine sichtbaren Unterschiede in der intrazellulären Verteilung (Abbildung 47). Meist wiesen die transfizierten Zellen eine abgekugelte Morphologie auf und lösten sich teils vom Deckglas ab, was auf eine Env-Überexpression hinwies. War Env in der Plasmamembran lokalisiert, so konnte eine verminderte DiO-Markierung dieser Membranabschnitte beobachtet werden (Abbildung 47B, Pfeile). Die in Abbildung 47C gezeigte Gegenfärbung mit FAsH-Farbstoff wies eine intensive Färbung der Bereiche nahe des Zellkerns auf, aber eine sehr schwache Färbung

des Plasmamembran-ständigen Env. Demnach konnten nur vereinzelt Kollokalisierungen von Immunfluoreszenz- und FIASH-Färbung an der Plasmamembran beobachtet werden (Abbildung 47C, Pfeile). Damit eignete sich das Konstrukt oricoEnvTC in Kombination mit der *in vivo* Färbemethode mehr für intrazelluläre Untersuchungen, im speziellen für die Lebendzellmikroskopie. Grundsätzlich zeigte der Versuch aber, dass EnvTC exprimiert wird und sich an der Plasmamembran, dem Ort der Gag-Assemblierung (C-Typ), anlagert.

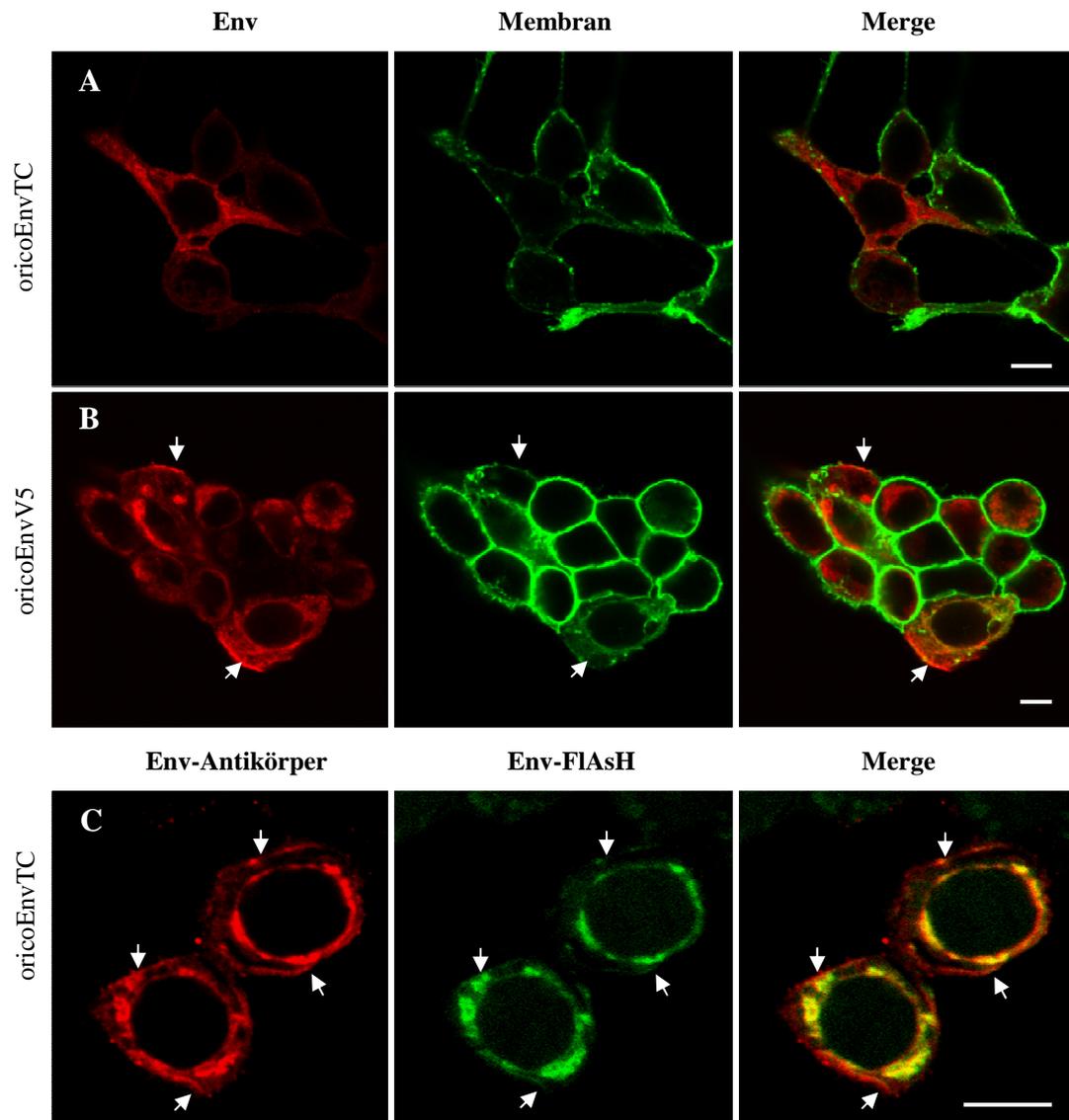


Abbildung 47: Lichtmikroskopischer Vergleich der Konstrukte oricoEnv-V5 mit oricoEnvTC

Mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie detektiertes Env-Protein, intrazellulär und an der Plasmamembran (Pfeile). A-C: EnvV5 oder EnvTC angefärbt mit anti-Env HERV-K113 und anti-Mause Alexa568. C: FIASH-Färbung von EnvTC. (Maßstab: 10µm)

3.4.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von EnvTC

Publikationen zu HERV-K(HML-2) belegen die Lokalisation des Hüllproteins Env am Endoplasmatische Retikulum (ER). Env durchspannt hier mit seiner Transmembran-Domäne die ER-Membran, wobei sich das Signalpeptid im Lumen des ERs befindet (Doms et al., 1993; Molinari, 2002; Ruggieri et al., 2009). Zum Beispiel wird HIV-1 Env dann über den Trans Golgi Apparat und den endosomalen Stoffwechselweg zur Plasmamembran transportiert (Checkerly et al., 2011). OricoEnvTC sollte im Folgenden auf seine Lokalisation am ER und an intrazellulären, endosomalen Membranstrukturen untersucht werden, die bereits mit HERV-K(HML-2) Gag in Zusammenhang gebracht wurden (Abschnitt 3.3). Es sollten Transportwege zur Plasmamembran als auch mögliche intrazelluläre Kompartimente identifiziert werden, an welchen Env bereits auf Gag treffen und assemblieren könnte.

Für die Versuche wurden HEK293T-Zellen mit oricoEnvTC und CMVoricoHERV-K113 im Verhältnis 1:8 transfiziert. Diesem Transfektionsansatz wurden für einige Untersuchungen die Plasmide EGFP-rab7wt (Späte Endosomen) oder DsRed-rab11wt (Recycling-Endosomen) zugesetzt. Bei weiteren Proben erfolgte nach etwa 16 Stunden die Gegenfärbung von Lysosomen mit LysoTracker® Red DND-99 oder des endoplasmatische Retikulum (ER) mit ER-Tracker™ Red *in vivo*. EnvTC wurde teilweise mittels FAsH *in vivo* markiert. Nach der Probenfixierung wurde noch unmarkiertes EnvTC durch die Immunfluoreszenzfärbung visualisiert (je n =3-4).

Es konnte bei allen mit oricoEnvTC transfizierten Zellen eine deutliche Kolo-kalisation von EnvTC mit dem ER detektiert werden (Abbildung 48A). Hingegen wiesen Lysosomen keine Kolo-kalisation mit EnvTC auf (Abbildung 48B). Eine schwache, räumliche Nähe der späten Endosomenmembran zu EnvTC war bei einigen Zellen allerdings sichtbar (Abbildung 48C). Als weitere Komponente des endosomalen Transportweges wurden die Recycling-Endosomen näher betrachtet. Hier konnte bei einigen, wenigen Zellen eine räumliche Nähe der Kompartimentmembran zum Hüllprotein beobachtet werden (Abbildung 48D). Die Versuche zeigten, dass Env nur im geringen Maße mit den endosomalen Kompartimenten interagiert, welche mit Gag in Zusammenhang gebracht wurden. Demnach kann eine mögliche Gag-Env-Assemblierung im großen Umfang an endosomalen Kompartimenten ausgeschlossen werden.

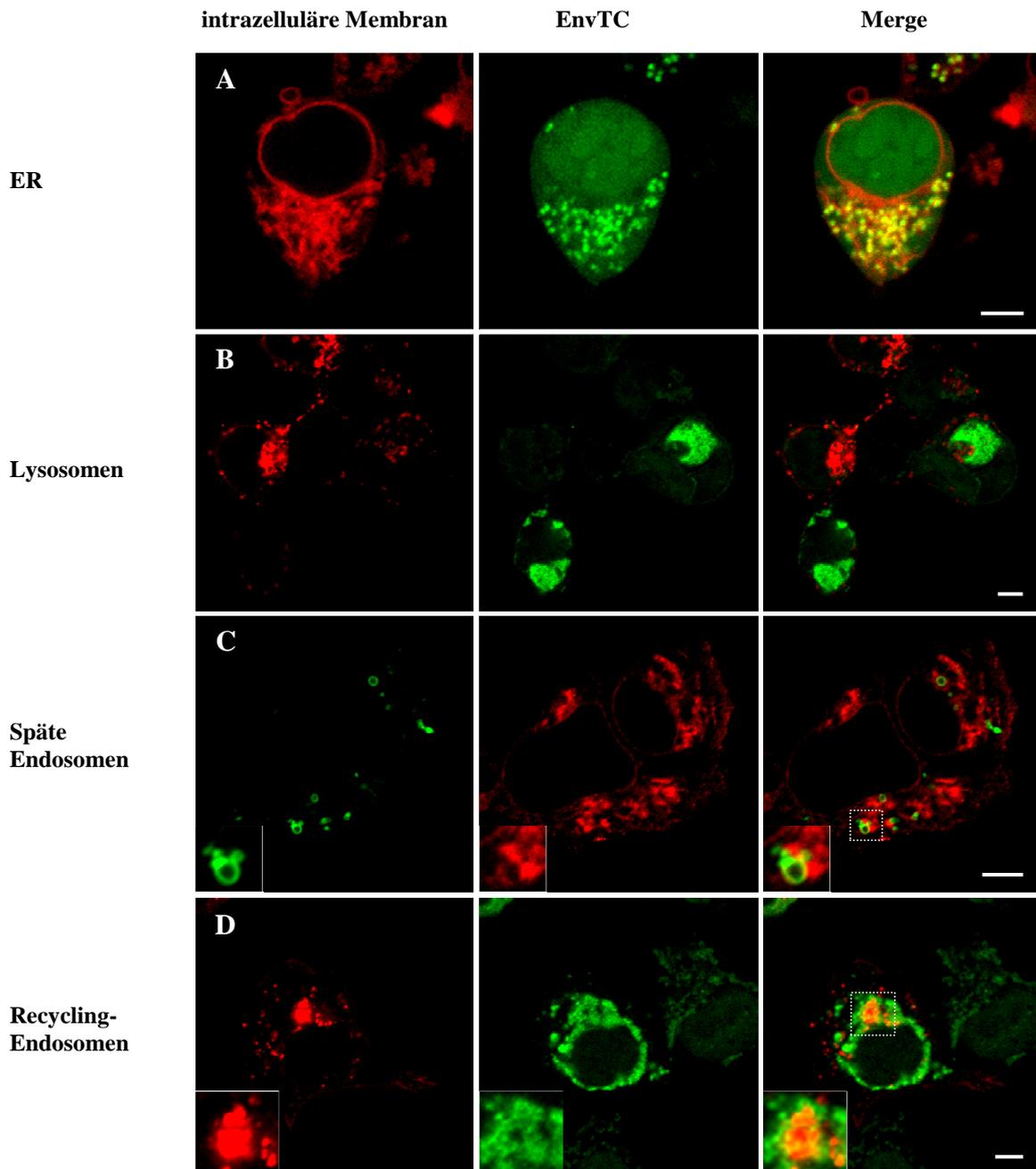


Abbildung 48: Lokalisation von EnvTC an intrazellulären Membranstrukturen

A und B: EnvTC visualisiert durch FIASH sowie Lebendfärbung des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder der Lysosomen. C: EnvTC angefärbt mit anti-Env HERV-K113 und anti-Mause Alexa568 in EGFP-rab7wt transfizierten Zellen. D: EnvTC mit FIASH in DsRed-rab11wt transfizierten Zellen. (Maßstab: 5µm)

3.4.2 Untersuchen zum Einbau von Env in virale Partikel

3.4.2.1 Gag assembliert mit Env an der Plasmamembran

Aus den vorherigen Versuchen war ersichtlich, dass Env in der Plasmamembran verstärkt auftrat (Abbildung 47). Auch Gag akkumuliert an dieser (Abbildung 22 und 23). Einer

möglichen Kollokalisierung von HERV-K(HML-2) Gag und Env an der Plasmamembran transfizierter Zellen sollte im folgendem Versuch nachgegangen werden.

Es wurden HEK293T-Zellen mit CMVoricoHERV-K113 und oricoEnvV5 oder oricoEnvTC im Verhältnis 8:1 transfiziert und nach etwa 16 Stunden für die konfokale Laserscanningmikroskopie präpariert (je n = 4).

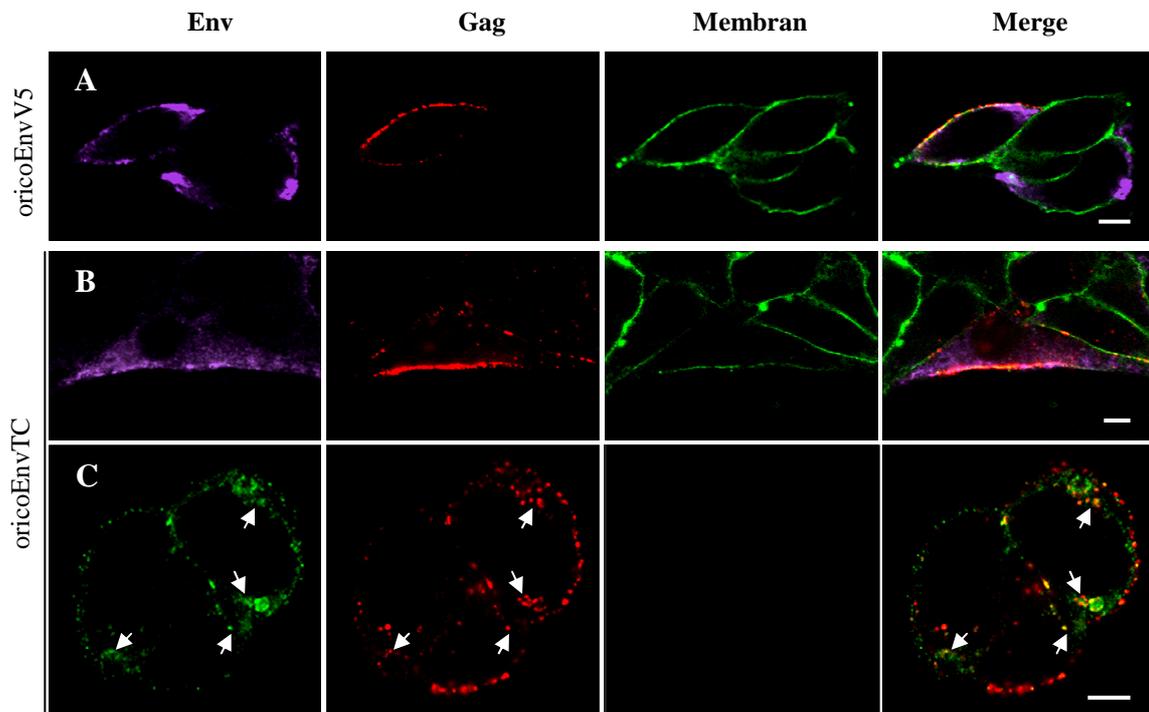


Abbildung 49: Gag und Env assemblieren an der Plasmamembran und vereinzelt intrazellulär

A-C: EnvV5 und EnvTC, gefärbt mit anti-Env HERV-K113 und anti-Mause Alexa647/Alexa488, kollokalisiert mit Gag (anti-Gag HERV-K113 und anti-Mause Alexa568) an der Plasmamembran und teils intrazellulär (C, Pfeile). Im Versuch C wurde keine Membranfärbung durchgeführt. Z-Stack von C im Film 9 dargestellt. (Maßstab: 5µm)

In der konfokalen Laserscanningmikroskopie ließ sich eine deutliche Kollokalisierung von Gag und Env an der Plasmamembran beobachten. Dabei waren keine Unterschiede zwischen EnvV5 oder EnvTC sichtbar (Abbildung 49A und B). Neben der großflächigen Kollokalisierung beider viralen Proteine konnten bei einigen Zellen auch punktförmige Akkumulationen von Env und Gag an der Plasmamembran oder im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 49C, Pfeile). Von den in Abbildung 49C dargestellten Zellen wurden ein Z-Stack aufgenommen (Film 9). Daraus ging eine deutliche, intrazelluläre Kollokalisierung beider viralen Proteine hervor.

Wurde EnvTC mit FIAsh gegengefärbt, so konnten die typischen, starken Lokalisationen von EnvTC um den Zellkern beobachtet werden, die in kleinen Bereichen mit intrazellulären Gag-Akkumulationen kollokalisieren (Abbildung 50A, Pfeile). Weitere

Kolokalisationen wurden auch an der Zelloberfläche (Abbildung 50A und B, Pfeile), sowie in peripheren Bereichen und in den Zellausläufern der Zellen detektiert (Abbildung 50B, Pfeile).

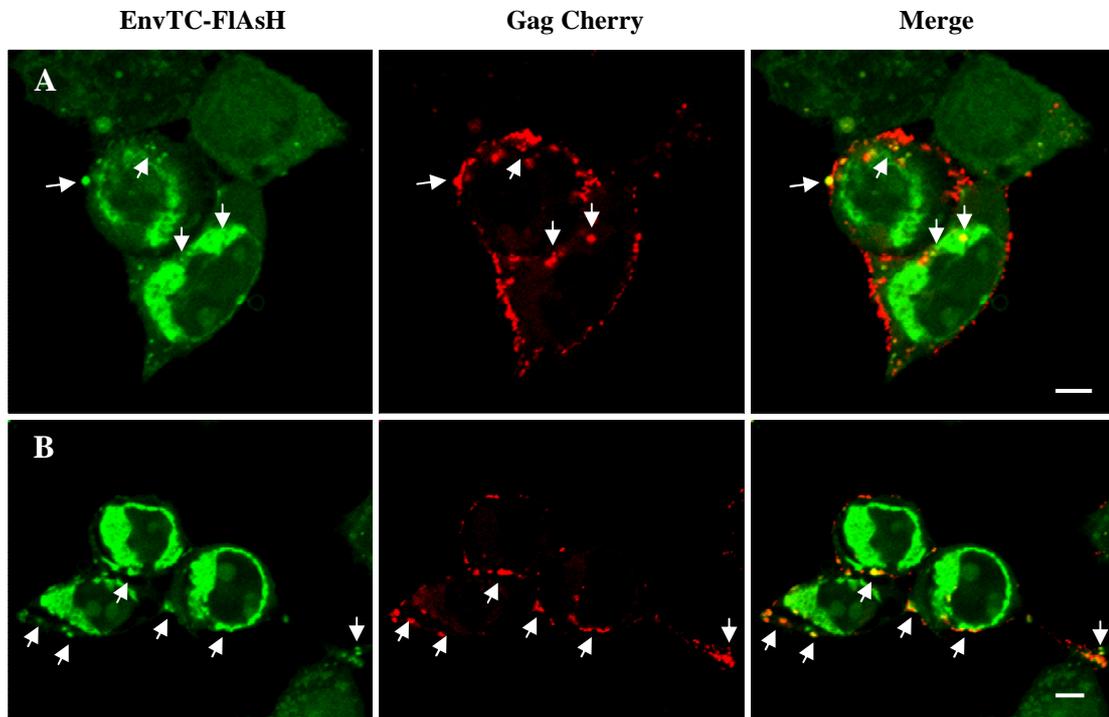


Abbildung 50: Kolokalisation von Gag und FIAsh-markiertem Env

A und B: Gag angefärbt mit anti-Gag HERV-K113 und anti-Mause Alexa568 sowie FIAsh markiertes Env kolokalisieren an der Plasmamembran und intrazellulär (Pfeile). (Maßstab: 5µm)

Sowohl mittels Antikörperfärbung als auch FIAsh-Färbung lässt sich Env nur im geringen Maße intrazellulär mit Gag in Zusammenhang bringen. Jedoch konnte eine starke Kolokalisation beider viralen Proteine an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Es ließ einen starken Einbau von Env via Hüllmembran in virale HERV-K(HML-2) Partikel vermuten.

3.4.2.2 EnvTC wird in VLPs eingebaut

Um in späteren *in vivo* Studien mit zweifach, fluoreszenzmarkierten, viralen Partikeln arbeiten zu können, muss neben GagCherry oder GagEGFP auch EnvTC in die viralen Partikel eingebaut werden. Der Einbau von EnvTC sollte im folgenden durch Western Blot-Analysen der Zellkulturüberstände nach Ultrazentrifugation, aber auch optisch mittels Elektronenmikroskopie eindeutig geprüft werden. Als Vergleich wurde auch hier oricoEnvV5 herangezogen.

Es wurden HEK293T-Zellen für die Western Blot-Untersuchungen mit oricoGagHERV-K113 oder CMVoricoHERV-K113 und teils mit oricoEnvV5 oder oricoEnvTC transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Kulturüberstände ultrazentrifugiert (je n = 4).

Für die Elektronenmikroskopie wurden HEK293T-Zellen mit oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 (1:5), sowie teils mit oricoEnvV5 oder oricoEnvTC transfiziert. Die Zellpellets für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden nach 48 Stunden fixiert und eingebettet (je n = 3). Für die korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie wurden die in μ Dish Grid500^{high} Petrischalen ausgesäten und transfizierten Zellen nach 24 Stunden fixiert und präpariert (je n = 2).

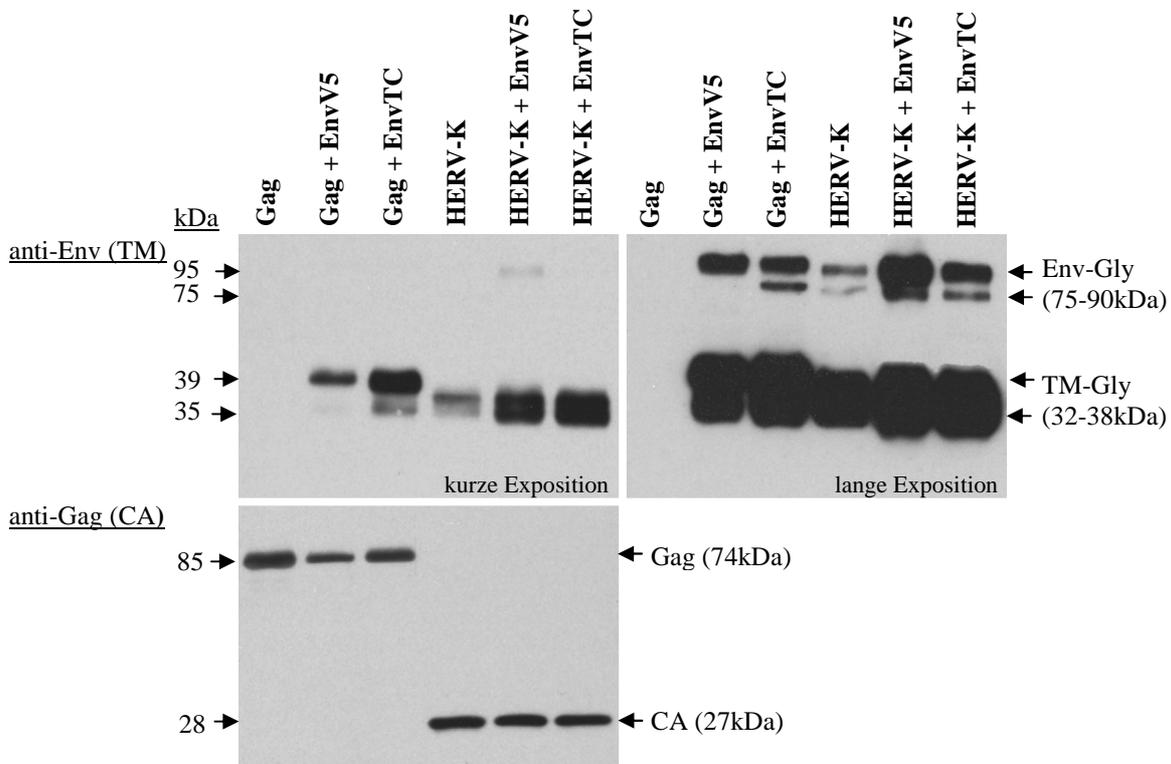


Abbildung 51: EnvV5 und EnvTC wird in virale Partikel eingebaut

UZ-Pellets der Zellkulturüberstände von HEK293T-Zellen transfiziert mit oricoGagHERV-K113 (Gag) oder CMVoricoHERV-K113 (HERV-K) und kotransfiziert mit oricoEnvV5 oder oricoEnvTC im Verhältnis 40:1. Das Transmembranprotein (TM) von Env wurde durch den anti-Env HERV-K113 Antikörper oder Gag mittels Rattenserum gegen das Kapsidprotein (CA) detektiert. Die berechneten Molekularmassen der Proteine befinden sich in Klammern. Marker: Page Ruler

Die Western Blot-Untersuchungen der UZ-Pellets wiesen durch die Detektion des Transmembranproteins (TM) den Einbau von EnvV5 und EnvTC nach. Das Transmembranprotein wurden teils in stark (39kDa) oder gering glykosilierter Form (35kDa) in die Hüllmembran der viralen Partikeln eingebaut (Abbildung 51, anti-Env Blot). Zudem konnte auch die Expression von Env des Konstrukts CMV_{orico}HERV-K113 durch dessen Inkorporation in die Virushülle nachgewiesen werden (Abbildung 51, HERV-K). Sie war jedoch geringer, als bei der Kotransfektion mit *oricoEnvV5* oder *oricoEnvTC*. Nicht prozessiertes, stark glykosiliertes Env war durch eine 95kDa Bande, schwach glykosiliertes als 75kDa Bande sichtbar (Abbildung 51, anti-Env Blot). Es wurde zudem mehr prozessiertes als unprozessiertes Env nachgewiesen. Die Detektion des Kapsidproteins (CA) in den UZ-Pellets zeigte deutlich, dass das EnvV5 und EnvTC, sowohl in der Hüllmembran von unreifen als auch von reifen Partikeln integrierte. Unreife Partikel wurden durch eine 85kDa Bande des Vorläuferproteins Gag und reife Partikel durch eine 28kDa Bande des Kapsidproteins visualisiert, das aus der Prozessierung von Gag durch die virale Protease hervorgeht.

In der Transmissionselektronenmikroskopie konnten bei Zellen, kotransfiziert mit *oricoEnv-V5* oder *oricoEnvTC*, vereinzelte, unreife oder reife, virale Partikel mit Env auf der Oberfläche beobachtet werden (Abbildung 52A, schwarze Pfeile). Bei Zellen, die keine Kotransfektion mit einem Env-Konstrukt erfuhren, war dies nicht der Fall (Abbildung 52A, Ohne). Für die korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie (CLEM) wurden ausschließlich die Zelloberflächen von Zellen abgerastert, die in der Lichtmikroskopie eine deutliche Expression von GagCherry aufwiesen. Wurde bei der Transfektion keines der Env-Konstrukte kotransfiziert, so konnten ausschließlich virale Partikel mit einer vergleichsweise glatten Oberfläche beobachtet werden (Abbildung 52C, Ohne). Versetzte man jedoch den Transfektionsansatz mit einem der beiden Env-Konstrukte, so zeigten die viralen Partikel eine raue, strukturierte Oberfläche (Abbildung 52C, weiße Pfeile). Zudem wiesen virale Partikel mit einer glatten Hüllmembran ein homogenes Verteilungsmuster auf der Zelloberfläche auf. Raue Partikel klusterten hingegen auf der Zellenoberfläche (Abbildung 52B). Diese elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterstützten die Western Blot-Daten aus Abbildung 51 und bewiesen den verstärkten Einbau von EnvTC in HERV-K(HML-2) Partikel.

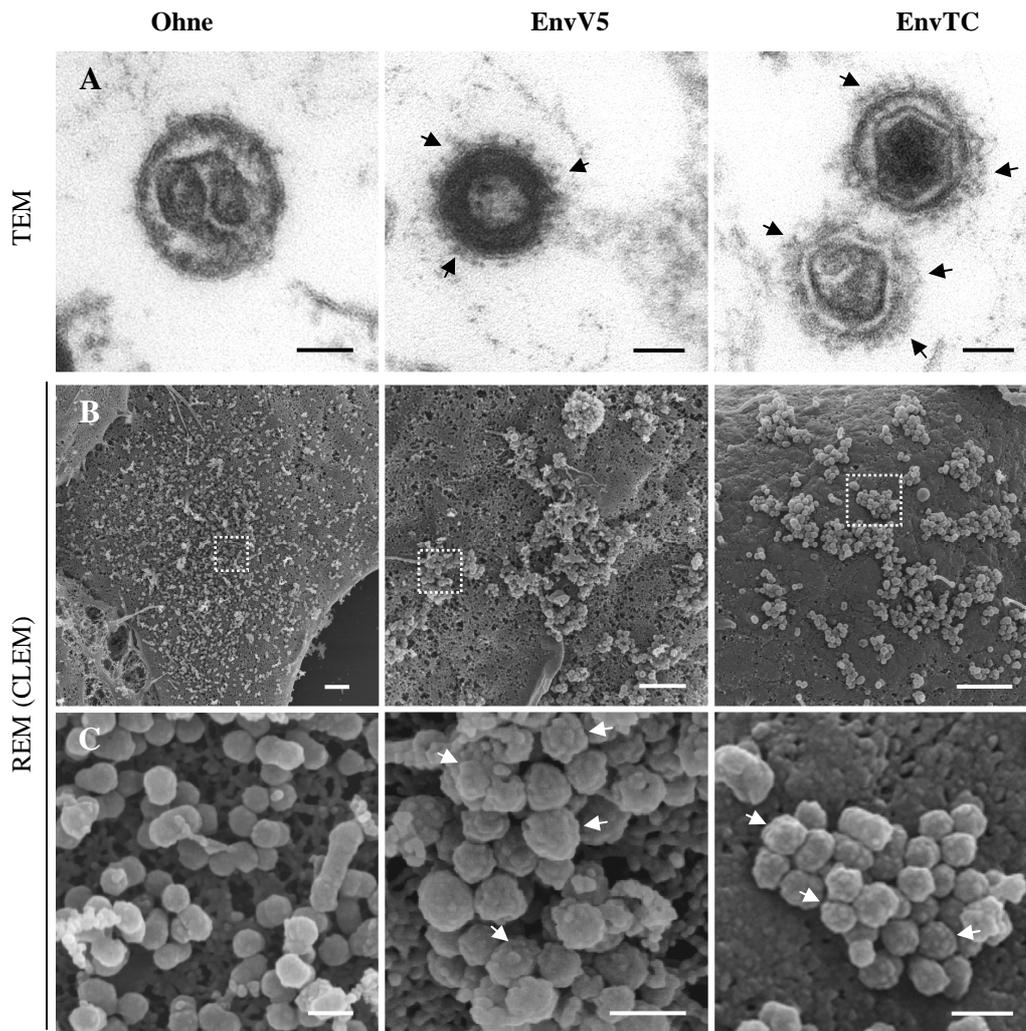


Abbildung 52: Env auf der Oberfläche viraler Partikel

A: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Zellpellets. Unreife als auch reife Partikel tragen vereinzelt EnvV5 oder EnvTC auf der Oberfläche (schwarze Pfeile). B, C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) der korrelativen Licht- und Rasterelektronenmikroskopie (CLEM). Dargestellt sind ausschließlich Zellen, die in der Lichtmikroskopie ein Fluoreszenzsignal von GagCherry aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Diese besitzen virale Buddingstrukturen, welche das Hüllprotein Env auf der Oberfläche tragen (weiße Pfeile). Die in C dargestellten Bereiche sind vergrößerte Bereiche aus B, markiert durch Rechtecke. (Maßstab: A: 50nm; B: 1µm; C: 200nm)

In diesem Abschnitt konnte die Assemblierung von HERV-K(HML-2) Env und Gag an der Plasmamembran transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Durch die Zugabe eines reinem Env-Konstrukts zum Transfektionsansatz wurde der Einbau des Hüllproteins in virale Partikel gesteigert, was zukünftige Infektionsversuche erleichtern sollte. Die Doppelmarkierung von Gag und Env ermöglicht zudem fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur frühen Replikationsphase nach Infektion der Wirtszelle.

4 Diskussion

Frühere Studien zeigen, dass die Wildtypsequenz von HERV-K113 aufgrund von Mutationen eine sehr schwache Expression der viralen Proteine aufweist, was in einer Freisetzung nur weniger, nicht funktioneller, viraler Partikel resultiert (Beimforde et al., 2007; Boller et al., 2008). Die Generierung der Konsensussequenz von HERV-K(HML-2) zeigte, dass die daraus resultierenden viralen Proteine zu virusartigen Partikeln assemblierten (Dewannieux et al., 2006; Lee und Bieniasz, 2007; Kraus et al., 2011). Durch die Generierung einer codonoptimierten möglichen Wildtypsequenz von HERV-K113 (oricoHERV-K113) konnte die Expression der viralen Proteine als auch die Freisetzung viraler Partikel enorm gesteigert werden (Beimforde et al., 2007; Hanke et al., 2009; George et al., 2011, Chudak et al., 2013). Somit bildete diese Sequenz eine hervorragende Grundlage für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der späten Phase der HERV-K(HML-2) Replikation, insbesondere auf dem intrazellulären Transport des Gag- und Env-Proteins sowie auf der Partikelassemblierung von HERV-K113. Für diese Untersuchungen standen neben licht- und elektronenmikroskopischen auch molekularbiologische Methoden im Mittelpunkt.

4.1 Generierung Fluoreszenzprotein-markierter HERV-K(HML-2) Partikel

4.1.1 Fluoreszenzprotein-markiertes HERV-K(HML-2) Gag

Das Vorläuferprotein Gag spielt bei der Assemblierung und Freisetzung von Retroviren eine entscheidende Rolle. Ohne dieses Polystrukturprotein ist die Bildung viraler Partikel nicht möglich. Im Gegensatz dazu ist Gag eigenständig, ohne weitere virale Proteine in der Lage *in vivo* zu virusartigen Partikeln, VLPs, zu assemblieren (Gheysen et al., 1989; Larson et al., 2005; Jouvenet et al., 2009). Diese sind aufgrund des Fehlens der viralen Protease nicht replikationskompetent und verbleiben im unreifen Zustand. Selbst *in vitro* konnte durch die Zugabe von Nukleinsäuren eine spontane Assemblierung von HIV-1 Gag zu VLPs beobachtet werden. Beide, auf unterschiedlichem Wege generierten VLPs unterschieden sich weder in ihrer Größe noch in ihrer Morphologie (Campbell et al., 2001). Das Polystrukturprotein Gag macht zudem den Großteil des Proteinanteils viraler Partikel aus und bietet somit einen hervorragenden Ansatz für die Generation fluoreszenzmarkierter, viraler Partikel (Coffin et al., 1997). Fluoreszenzmarkiertes Gag kann somit in einem für die Detektion ausreichendem Maße in die Partikel eingebracht werden, ohne die Funktion des Polystrukturproteins zu beeinträchtigen (Jouvenet et al., 2008).

Für die lichtmikroskopische Markierung wurde in dieser Arbeit auf Fluoreszenzproteine zurückgegriffen. Sie ermöglichen im Gegensatz zu zahlreichen anderen Markierungsmethoden, dass das zu untersuchende Protein nach seiner Expression direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* detektiert und nativ verfolgt werden kann (Brandenburg und Zhuang, 2007; Hübner et al., 2007). Somit eignen sich Fluoreszenzproteine auch hervorragend für kinetische Analysen (Jouvenet et al., 2008; Dale et al., 2011). Bereits bei retroviralen Vertretern wie HIV-1, MLV oder RSV wurden somit Einblicke in späte, retrovirale Replikationsprozesse wie Transport, Assemblierung und Freisetzung von viralen Partikeln gewonnen (Sherer et al., 2003; Jouvenet et al., 2009; Chan et al., 2012). Es gilt jedoch zu beachten, dass nicht alle Fluoreszenzproteine für Untersuchungen geeignet sind. Sie können zum einen toxisch auf die Zelle wirken, eine geringe Fotostabilität aufweisen, das markierte Protein an seiner natürlichen Faltung hindern oder auch zur Oligomerisierung des Fusionsproteins führen und somit die Daten verfälschen (Wiedenmann et al., 2009). Die in hier verwendeten Fluoreszenzproteine Cherry und EGFP wirken nicht toxisch auf biologische Systeme und zeichnen sich durch eine hohe Fotostabilität und starke Emission aus. Laut Literatur weist Cherry im Vergleich zu EGFP nur eine halb so starke relative Helligkeit auf. Beide neigen zudem nicht zur Oligomerisierung (Shaner et al., 2008; Wiedenmann et al., 2009).

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Konstrukte oricoGagCherry und oricoGagEGFP führen nach Transfektion zur Expression von C-terminal Fluoreszenzprotein-markiertem, viralen Gag (Abbildung 20 und 21). Bereits in früheren Studien bezüglich HIV-1, RSV, MLV oder HTLV wurde gezeigt, dass eine C-terminale Fluoreszenzproteinmarkierung das Polystrukturprotein Gag in seiner Funktion nicht beeinflusst (Sherer et al., 2003; Larson et al., 2005; Jouvenet et al., 2006; Chan et al., 2011; Fogarty et al., 2011; Haraguchi et al., 2012). Auch die Insertion von GFP C-terminal des Matrixproteins wurde bereits erfolgreich für Assemblierungsstudien genutzt (Müller et al., 2004; Lampe et al., 2006; Hübner et al., 2007; Scholz et al., 2008; Dale et al., 2011). Jedoch erweist sich die Klonierung des Konstrukts als wesentlich komplizierter. Im Gegensatz dazu kann die Insertion in die Sequenz eines für die Assemblierung essenziellen Proteins dieses in seiner Funktion behindern. Für HIV-1 Gag konnte mit diversen Insertionen im Nukleokapsid gezeigt werden, dass sie die Akkumulation von Gag an der Plasmamembran der transfizierten Zelle stark beeinträchtigen können (Sandefur et al., 1998, 2000). Auch hätte eine N-terminale Fluoreszenzproteinmarkierung die Bindung des Polystrukturproteins an

der Plasmamembran mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit behindert, da das sich hier befindliche Matrixprotein über seine Myristoylierung und elektrostatische Wechselwirkung mit sauren Phospholipiden kovalente an die Plasmamembran bindet (Blenis und Resh, 1993; Resh, 1994; Hamard-Peron und Mutiaux, 2011).

Demnach erwies sich die C-terminale Fluoreszenzproteinmarkierung von oricoHERV-K113 Gag als der schnellste und einfachste Weg, um das virale Polypeptidprotein in lebenden Zellen lichtmikroskopisch zu visualisieren.

4.1.2 Expression und Lokalisation von Fluoreszenzprotein-markierten HERV-K(HML-2) Gag

In vielen früheren, retroviralen Untersuchungen wurden Gag-exprimierende Zellen viele Stunden oder Tage nach Transfektion untersucht. Für die Untersuchung des intrazellulären Transports als auch der Assemblierung sind die ersten Stunden nach transienter Transfektion ausschlaggebend, ebenso wie für kinetische Untersuchungen. Andernfalls erweist sich die Detektion einzelner Fluoreszenzsignale als unmöglich (Jouvenet et al., 2006, 2008). Für Fluoreszenzprotein-markiertes HIV-1 Gag und das anderer C-Typ Retroviren können erste Fluoreszenzsignale bereits fünf bis sechs Stunden nach Transfektion diffus im Zytoplasma detektiert werden. In der darauffolgenden Stunde bilden sich die ersten Gag-Akkumulationen an der Plasmamembran. Ein Anstieg der Akkumulationen ist nach einigen Stunden zu verzeichnen, welche auch mit fortschreitender Zeit gehäuft intrazellulär auftreten. Im Gegensatz dazu sinkt das diffuse Signal im Zytoplasma stetig (Jouvenet et al., 2006; Hübner et al., 2007; Jouvenet et al., 2008; Helma et al., 2012). Diese temporäre Verteilung konnte im Rahmen dieser Arbeit auch bei oricoHERV-K113 Gag mittels Lebendzellmikroskopie beobachtet werden (Abbildung 21, Film 1 und 2). Es lässt vermuten, dass oricoHERV-K113 Gag nach Expression an zytosolischen Ribosomen oder Polysomen diffus verteilt im Zytoplasma vorliegt (Tritel und Resh, 2000). Gag kann jedoch nicht direkt nach der Expression detektiert werden, da alle Fluoreszenzproteine, darunter Cherry wie auch EGFP, einen von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel Sauerstoff, abhängigen Reifungsprozess durchlaufen (Shaner et al., 2005; Pédelacq et al., 2006; Regmi et al., 2013). Nach kotranslatationaler Myristoylierung und anschließender Multimerisierung im Zytoplasma bindet und assembliert Gag an der Plasmamembran, wie es bei C-Typ Retroviren beobachtet werden kann (Gelderblom et al., 1985; Göttinger et al., 1998; Bryant und Ratner, 1990; Larson et al., 2003; Hamard-Peron und Murieux, 2011). Dabei assoziiert Gag von HIV-1 und anderen behüllten Retroviren mit cholesterolreichen Lipid Rafts und

Tetraspanin angereicherten Mikrodomänen (Nguyen und Hildreth, 2000; Lindwasser und Resh, 2001; Ono und Freed, 2001, 2005; Gomez und Hope, 2006). Hierbei handelt es sich um eigenständige Mikrodomänen, die in der Gegenwart von membrangebundenem Gag aufgrund der lateralen, fluiden Membranbewegung klustern. Somit liegen Gag-Monomere von HIV-1 und RSV nach der Bindung an der Plasmamembran inhomogen verteilt an bestimmten Lipid Raft- und tetraspaninreichen, großflächigen Membranbereichen der Zelloberfläche vor. An diesen Bereichen assembliert HIV-1 und RSV Gag. Die daraus resultierenden VLPs budden individuell, ohne Klusterbildung und mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (Larson et al., 2005; Invanchenko et al., 2009). Dabei weisen die Buddingstrukturen beide Plasmamembran-Mikrodomänen in stark erhöhter Konzentration auf (Hogue et al., 2011). Das Budden von individuellen Bereichen der Plasmamembran wurde ebenfalls für das γ -Retrovirus MLV beschrieben (Gladnikoff und Rousso, 2008). Die inhomogene Verteilung der Gag-Akkumulationen an der Plasmamembran transfizierter Zellen konnte auch bei unmarkierten und Fluoreszenzprotein-markierten Gag von oricoHERV-K113 beobachtet werden (Abbildung 22 und 23). Transmissionselektronenmikroskopisch ließen sich diese Bereiche durch elektronendichte Ansammlungen entlang der zytosolischen Plasmamembran identifizieren (Abbildung 25). Dieses, für C-Typ Retroviren typische Assemblierungsverhalten wurde bereits im Rahmen der Untersuchungen zur Phönix-Sequenz von HERV-K113 als auch bei der Konsensussequenz von HERV-K(HML-2) beobachtet (Tönjes et al., 1997; Dewannieux et al., 2006; Lee und Bieniasz, 2007). Unmarkiertes oricoHERV-K113 Gag bildete dabei eine homogene Schicht, wohingegen Fluoreszenzprotein-markiertes Gag sich in elektronendichten Einheiten unterhalb der Plasmamembran formierte (Abbildung 25D, G, K). Ob es sich dabei um einzelne Monomere von markiertem Gag handelt oder um Aggregate ist jedoch unklar. Es wird jedoch deutlich, dass die aus den in dieser Arbeit klonierten oricoHERV-K113 Sequenzen hervorgehenden, viralen Fusionsproteine durch das C-terminal gebundene Fluoreszenzprotein in ihrer Membranbindefähigkeit nicht behindert werden (Jouvenet et al., 2008, 2009; Ivanchenko et al., 2009).

4.1.3 HERV-K(HML-2) Gag assembliert an der Plasmamembran zu VLPs

Betrachtet man die Buddingstrukturen, so zeigten sich bei reinem oricoHERV-K113 Gag rundliche Membranausstülpungen in die in unreifen VLPs resultieren und auf der Zelloberfläche hafteten (Abbildung 25A-F). Sie wiesen eine homogene, runde Form und Größe auf. Unreife VLPs zeichneten sich zudem durch einen hellen Kern und eine

elektronendichte, dunkle Gag-Schicht zwischen Kern und viraler Hülle aus (Abbildung 24A und C; Tönjes et al., 1997; Bieda et al., 2001; Boller et al., 2008). Auch unterschieden sie sich weder optisch noch durch ihren Durchmesser von etwa 90nm von VLPs, welche aus der Phönix- oder Konsensussequenz von HERV-K hervorgehen (Boller et al., 1983; Bieda et al., 2001; Dewannieux et al., 2006; Lee und Bieniasz, 2007; Boller et al., 2008). Teilweise konnten auch sogenannte VLP-Buddingketten beobachtet werden (Abbildung 24B und D; 26E). Diese hafteten an der Zellmembran und bestanden aus VLPs, die aufgrund einer unvollständigen Abschnürung noch aneinander geketteten. Viele vorausgegangene Studien zeigen, dass in der späten Buddingphase sowohl die L-Domänen, die basischen Reste der Nukleokapside als auch Komponenten des ESCRT/Vps wie Tsg101 bei der Abschnürung von retroviralen Partikeln eine entscheidende Rolle spielen. Mutationen in diesen Bereichen führen verstärkt zur Ausbildung von Buddingketten, da die VLPs nicht in der Lage sind, sich von der Plasmamembran zu lösen (Garrus et al., 2001; Strack et al., 2003; Dussupt et al., 2011; Bello et al., 2012). Zudem verweisen diese Buddingketten auf das mehrfache Budden von VLPs an ein- und demselben Membranbereichen (Gladnikoff und Rousso, 2008).

Neben der C-Typ Morphologie wurde auch bei einigen Zellen eine Anhäufung intrazellulärer, hüllmembranloser A-Typ Partikel an der zytosolischen Seite von Plasmamembran und vesikulären Strukturen beobachtet (Abbildung 26; 42C-F). Ob sie in der Lage sind, die Zelle als B-Typ Partikel zu verlassen, wie dies bei MMTV und MPMV der Fall ist, war jedoch unklar (Fine und Schochetman, 1978; Gelderblom, 1996). Untersuchungen zu oriHERV-K113 zeigten, dass eine geringere Proteinexpression diesen Phenotyp verhindert. Auch eine verstärkte Expression des wirtseigenen Proteins Staufens-1 und des viralen rec-Proteins steigerten zwar die virale Proteinexpression von oriHERV-K113, führten aber nicht zur A-Typ Partikelbildung (Hanke et al., 2013). Hierfür könnte die noch immer geringere Proteinexpression, im Vergleich zu oricoHERV-K113, ausschlaggebend sein. Somit lässt sich wahrscheinlich der Wandel zur A-Typ Morphologie auf die durch die Codonoptimierung drastisch gesteigerte Proteinexpression zurückführen (Hohn et al., 2014).

Im Gegensatz zu unmarkiertem oricoHERV-K113 Gag formierte sich reines Fluoreszenzprotein-markiertes Gag zu tubulären Buddingstrukturen (Abbildung 24E-H; 25H-K). Bereits in der TIRF-Mikroskopie konnten diese als fluoreszierende, feine, fadenförmige Ausläufer beobachtet werden (Film 3). Fluoreszenzprotein-markiertes HIV-1 Gag bildet VLP-artige Strukturen, welche Unregelmäßigkeiten in der Gag-Schicht

aufweisen (Pornillos et al., 2003). Sie ähneln stark den elektronendichten Untereinheiten der Gag-Schicht, die auch bei den Buddingstrukturen von Fluoreszenzprotein-markierten oricoHERV-K113 Gag beobachtet wurden (Abbildung 24E und G; 25G-K). Bei SIV und EIAV führt der Austausch der basischen Reste des Nukleokapsids gegen Alanin ebenfalls zu tubulären Buddingstrukturen auf der Zelloberfläche. Es lässt eine Einschränkung der membranbindenden Funktion des Nukleokapsid vermuten (Bello et al., 2012). Zellen transfiziert mit RSV Gag-Mutanten, bei denen entweder das Nukleokapsid deletiert oder die Dimerisationsdomäne des Nukleokapsids um fünf Aminosäuren C-terminal versetzt wurde, zeigten ebenfalls tubuläre, virale Strukturen (Johnson et al., 2002; Baluyot et al., 2012). Zudem führte Fluoreszenzprotein-markiertes Gag von RSV zu wabenartigen Formationen auf der Zelloberfläche (Larson et al., 2008). Es zeigt, dass sowohl die Hinderung der Nukleokapsid-Bindung durch C-terminale Fluoreszenzprotein-Tags als auch die Mutation oder der Verlust des Nukleokapsids zu tubulären, viralen Buddingstrukturen führen kann.

Eine strukturelle Veränderung der Tertiärstruktur des Nukleokapsids durch das C-terminal gebundene Fluoreszenzprotein kann jedoch ausgeschlossen werden, insbesondere bezüglich der auf dem Zink-Finger-Motiv basierenden RNA-Bindedomäne (Summers et al., 1992; De Guzman et al., 1998). Wäre die RNA-Bindfähigkeit des Nukleokapsids beeinträchtigt, so würde die Multimierisierung von Fluoreszenzprotein-markierten Gag im Zytosol ausbleiben und somit auch die Bindung und Akkumulation des Fusionsproteins an der Plasmamembran der transfizierten Zelle (Rein, 1994; D'Souza und Summers, 2005; Jouvenet et al., 2009; Ott et al., 2009; Jouvenet et al., 2011).

4.1.4 Assemblierung fluoreszenzmarkierter HERV-K(HML-2) Partikel

Bereits bei einigen retroviralen Vertretern wie HIV-1, MLV als auch RSV werden Mischungsverhältnisse von Fluoreszenzprotein-markierten und nativen Gag beziehungsweise Gag-Pol herangezogen, um native, fluoreszenzmarkierte, virale Partikel zu generieren. Hierbei wurden bisher verschiedene Mischungsverhältnisse von 1:1 bis hin zu 1:10 verwendet (Sherer et al., 2003; Larson et al., 2005; Jouvenet et al., 2008; Lee und Bieniasz, 2007). Sie verdeutlichen einzig und allein, dass ausreichend natives, unmarkiertes Gag in virale Partikel eingebaut werden muss, um einen optimalen Ringschluss dieser zu ermöglichen und Buddingdefekte zu vermeiden (Larson et al., 2005).

Bei zahlreichen HIV-1 Studien wurde auf ein äquimolares Mischungsverhältnis von EGFP-markiertem Gag und dem Wildtyp-Konstrukt zurückgegriffen. Demnach kommen im Idealfall etwa 1200 Fluorophore auf einen HIV-1 Partikel, bestehend aus 2400 Gag-Proteinen (Chojnacki und Müller, 2013). Die hieraus resultierenden, hoch fluoreszenten VLPs unterscheiden sich in Morphologie und Infektiösität nicht vom Wildtyp (Larson et al., 2005; Lampe et al., 2007; Jouvenet et al., 2008). Im Gegensatz dazu führte ein äquimolares Mischungsverhältnis der in dieser Arbeit verwendeten oricoHERV-K113 Konstrukte zu ausschließlich tubulären Buddingstrukturen (Abbildung 27D). Die vermehrte Expression von reinem oricoHERV-K113 Gag bei den Mischungsverhältnissen 1:5 und 1:10 resultierte hingegen in der Assemblierung und Expression viraler Partikel (Abbildung 27E und F). Es zeigte, dass im Gegensatz zu HIV-1 eine höhere Konzentration an unmarkierten Gag in virale Partikel eingebaut werden muss, um den Ringschluss der Buddingstrukturen zu ermöglichen. Die daraus resultierenden VLPs glichen in Struktur und Größe nativen, viralen Partikeln (Boller et al., 1983; Bieda et al., 2001; Dewannieux et al., 2006; Lee und Bieniasz, 2007; Boller et al., 2008). Frühere Studien zu MLV konnten hingegen nachweisen, dass bei vermehrtem Einbau von Gag-GFP in virale Partikel die Infektiösität dieser sinkt. Der Gehalt an markiertem Gag sollte demnach nicht mehr als 25% des gesamten Gag-Gehaltes eines VLPs überschreiten. Das entspricht einem Mischungsverhältnis von 1:4. Daraus resultieren im Idealfall bei MLV etwa 400 Gag-GFP Fusionsproteine pro VLP, welche für eine starke Fluoreszenzmarkierung ausreichend sind (Sherer et al., 2003). Somit wurde in dieser Arbeit für alle weiteren Untersuchungen auf die Mischungsverhältnisse 1:5 oder 1:10 zurückgegriffen, die sich auch für lichtmikroskopische Analysen als funktionell erwiesen (Abbildung 27B und C). Hierdurch wurde eine ausreichende Inkorporation von nativem Gag in VLPs sichergestellt. Zudem deckten Western Blot Analysen auf, dass markiertes Gag proportional zu seiner im Mischungsverhältnis verwendeten Plasmidmenge eingebaut wird (Abbildung 32).

Zellen, transfiziert mit den Mischungsverhältnissen, exprimieren beide Konstrukte, da sie sowohl eine deutliche Fluoreszenz und als auch VLPs auf der Zelloberfläche in der Korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) aufweisen (Abbildung 28 und 29). Diese Methode dient der Vorabidentifikation der zu untersuchenden Strukturen und der Detektion von dynamischen Prozessen mit anschließender Analyse durch hochauflösende elektronenmikroskopische Verfahren. Ju und Kollegen konnten damit die Eintrittsregionen von HIV-1 an der Zelle bei Infektion identifizieren, um im Anschluss

mittels Kryoelektronentomographie die Entpackung der viralen RNA zu untersuchen (Ju et al., 2011). Anderenfalls wäre es nicht möglich, diese sehr kleinen Bereiche zu lokalisieren. Zudem liegt die Größe eines HIV-1 Partikels mit etwa 140nm unterhalb der Auflösungsgrenze von konventioneller Lichtmikroskopie. Im Gegensatz dazu liegt die Auflösungsgrenze der elektronenmikroskopischen Methoden bei etwa 2nm, aber eine temporale, dynamische gar funktionelle Untersuchung der Probe ist nicht möglich (Chojnacki und Müller, 2013). Derzeit ermöglicht keine der bekannten mikroskopischen Methoden, sowohl den intrazellulären Transport einzelner viraler Untereinheiten, die Dynamik der Assemblierung als auch die strukturellen Aspekte festzuhalten. Somit sind mehrere methodische Ansätze notwendig, um ein komplettes Bild der viralen Assemblierung und Freisetzung zu erarbeiten. Das wurde auch deutlich durch die CLEM mittels Transmissionselektronenmikroskopie oder Rasterelektronenmikroskopie. Während die Transmissionselektronenmikroskopie die Morphologie von VLPs auf der Zelloberfläche transfizierter, fluoreszierender Zellen visualisierte, ermöglichte die Rasterelektronenmikroskopie einen Überblick über die VLP-Verteilung auf der Zelloberfläche (Abbildung 28 und 29). VLPs traten hier nicht in Klustern auf, sondern unregelmäßig auf der gesamten Zelloberfläche verteilt, wobei periphere Zellbereiche nur wenige VLPs aufwiesen. Bei MLV, HIV-1 und RSV wurde dieses Verteilungsmuster bereits in früheren Studien beobachtet (Larson et al., 2005; Gladnikoff und Rouso, 2008; Ivanchenko et al., 2009). Auffallend in Abbildung 28 ist, dass Zellen, bei denen ein starkes Fluoreszenzsignal detektiert wurde, nur wenige Buddingstrukturen in der Transmissionselektronenmikroskopie aufwiesen. Das Fluoreszenzsignal, welches aus der gesamten Z-Dimension der Probe von etwa 10µm detektiert wurde, lässt eine hohe Dichte an intrazellulären Gag und an Buddingstrukturen, relativ homogen verteilt an der Plasmamembran, vermuten. Diese kann jedoch in der Transmissionselektronenmikroskopie mit einem 70nm Ultradünnschnitt nicht abgebildet werden.

Die CLEM gab jedoch keinen Aufschluss, ob Fluoreszenzprotein-markiertes Gag auch wirklich in VLPs inkorporiert wurde oder ob bei den Mischungsverhältnissen ausschließlich unmarkiertes Gag zu VLPs assemblierte. Den Einbau von markiertem Gag in VLPs bestätigte die Immunogoldmarkierung des Fluoreszenzproteins in Ultradünnschnitten transfizierter Zellen. Es konnte eine eindeutige Markierung der viralen Buddingstrukturen durch die Bindung eines gegen GFP gerichteten Antikörpers dokumentiert werden (Abbildung 30). Als Kontrolle wurden die Buddingstrukturen

ebenfalls mittels Gag-spezifischer Antikörper (Abbildung 30, anti-CA und anti-p15) nachgewiesen. Bereits in früheren Studien zu HERV-K(HML-29) wurden diverse Gag-spezifische Antikörper für die Immunogoldmarkierung von VLPs verwendet. Diese markierten die gleichen zellulären Oberflächenstrukturen, welche sich in Form und Größe nicht von denen in dieser Arbeit nachgewiesenen Strukturen unterschieden (Boller et al., 1997; Tönjes et al., 1997; Morgan und Brodsky, 2004; Boller et al., 2008). Bestärkt wurden die Daten durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der VLP-Pellets von Kulturüberständen (Abbildung 31). Die in der Lichtmikroskopie detektierten, fluoreszierenden, sehr kleinen Strukturen konnten mittels TEM als meist reife VLPs, vereinzelt als tubuläre Strukturen und kleine Zelltrümmer identifiziert werden. Dass es sich hierbei um VLPs handelte, die ausschließlich durch tote, lysierte Zellen freigesetzt wurden, kann jedoch ausgeschlossen werden, da der Kulturüberstand andernfalls viel mehr Zelltrümmer beinhalten würde. Larson als auch Jouvent und Kollegen zeigten, dass es einzelne fluoreszenzmarkierte VLPs mittels lichtmikroskopischer Verfahren detektiert werden können. Jedoch reicht dies nicht für eine eindeutige Identifikation von VLPs aus (Larson et al., 2005; Jouvenet et al., 2008).

4.1.5 Fluoreszenzmarkierte HERV-K113 Partikel reifen extrazellulär

Die Tatsache, dass bei der Transmissionselektronenmikroskopie von transfizierten Zellen fast ausschließlich unreife VLPs auf der Zelloberfläche auftreten, die Zellkulturüberstände aber fast nur reife VLPs aufweisen, legt die These der extrazellulären Reifung nahe (Abbildung 27 und 31). Dies ist bereits für zahlreiche Retroviren beschrieben (Gelderblom, 1996; Kurth und Bannert, 2010). Western Blot Analysen der Kulturüberstände bestätigten die Prozessierung des Polystrukturproteins Gag nach der Freisetzung der VLPs durch die virale Protease (Abbildung 32 und 33; Beimforde et al., 2007; George et al., 2011). Auffällig ist jedoch, dass neben den Spaltprodukten auch meist eine Bande des Vorläuferproteins detektiert werden kann (Abbildung 32 und 33). Es lässt auf erst kurz vor der Probennahme freigesetzte VLPs im Kulturüberstand schließen. Zelltrümmer, die mit Gag assoziiert sind, können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, insbesondere bei den Mischungsverhältnis 1:1. Bei Untersuchungen zu MLV wurde Gag-GFP und Gag-Pol im gleichen Mischungsverhältnis verwendet. Jedoch ausschließlich die Freisetzung von nativen Gag und Gag-GFP wurde nachgewiesen, nicht aber die Reifung der Partikel. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass es sich bei den im Western Blot detektierten Vorläuferproteinen ausschließlich um Zelltrümmer handelt, wie es auch in

dieser Arbeit für reines GagCherry gezeigt wurde (Sherer et al., 2003; Abbildung 31 und 32). Die Western Blot Daten bestätigten zudem den Einbau in virale Partikel als auch die Funktionalität von Fluoreszenzprotein-markiertem Gag als Strukturprotein bei den Mischungsverhältnissen 1:5 und 1:10.

Durch die Rekombination des viralen Erbgutes oder die Pseudotypisierung konnte die wieder erlangte Fähigkeit der Infektion von Wirtszellen durch HERV-K(HML-2) Partikel bereits demonstriert werden. Die Replikationskompetenz des endogenen Virus blieb jedoch aus (Bieda et al., 2001; Dewannieux et al., 2006; Boller et al., 2008; Hanke et al., 2009). Somit eignen sich die in diesen Versuchen generierten, einfach fluoreszenzmarkierten viralen Partikel höchstwahrscheinlich nur für Infektionsstudien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für zukünftige Studien darauf zu achten ist, dass ausreichend unmarkiertes Gag in VLPs inkorporiert wird, um die Funktionalität als auch den Ringschluss viraler Partikel zu gewährleisten. Es sollte ebenfalls genügend Fluoreszenzprotein-markiertes Gag eingebaut werden, um ein starkes und stabiles Fluoreszenzsignal zu generieren, das problemlos über einen längeren Zeitraum detektiert werden kann. Die in dieser Arbeit klonierten Konstrukte eignen sich zudem für weiterführende Studien bezüglich einzelner Phasen des Replikationszykluses von HERV-K(HML-2) mittels mikroskopischer, aber auch molekularbiologischer Methoden. Es könnte die Oligomerisierung beziehungsweise Assemblierung näher untersucht werden. Bereits Jouvenet und Kollegen haben GFP- und Cherry-markiertes HIV-1 Gag als FRET-Paar genutzt um kinetische Einblicke in die Assemblierung von HIV-1 mittels TIRF-Mikroskopie zu erhalten (Jouvenet et al., 2008). Hübner und Kollegen nutzten die Methode des Förster Resonanz Elektronen Transfers (FRET), um bei HIV-1 nähere Einblicke in die Oligomerisierung zu bekommen (Hübner et al., 2007). Jedoch kann sich die langsame Reifung der Fluoreszenzproteine als Nachteil auswirken, falls Gag schneller oligomerisiert als die Fluoreszenzproteine reifen (Reid und Flynn, 1997; Tritel und Resh, 2000; Shaner et al., 2005; Larson et al., 2005; Jouvenet et al., 2008). Außerdem können bei einer Überexpression des Fusionsproteins einzelne FRET-Signale aufgrund der sich gegenseitig überstrahlenden Fluoreszenzsignale nicht mehr eindeutig detektiert und lokalisiert werden. Hierfür eignen sich andere Methoden wie die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Bei der BiFC wird die Interaktion zweier Proteine visualisiert, indem sie mit zwei verschiedenen Fragmenten eines Fluoreszenzproteins markiert werden. Interagieren diese Proteine, so wird das Fluoreszenzprotein

komplementiert und bildet seine Fähigkeit zur Fluoreszenz aus (Kerppola, 2008; Milev et al., 2010). Zeitlich limitiert wird die Detektion des Fluoreszenzsignals durch die Fluorophorformierung und die Stabilisierung des Komplexes (Kerppola, 2009). Von Vorteil wäre jedoch, dass nur interagierendes Gag fluoreszenzmikroskopisch detektierbar ist. Somit wären im Fall der Oligomerisierung und Assemblierung nur zu untersuchende, einzelne Ereignisse sichtbar.

4.2 Die Peptide QP1 und QP2 von HERV-K113

Bei den Western Blot Untersuchungen der Zellkulturüberstände transfizierter Zellen trat neben den zu erwartenden Spaltprodukten auch noch ein weiteres kleines Cherry-markiertes Fragment, X-Cherry, auf (Abbildung 32 und 33, anti-Cherry Blot). Die Vermutung lag nahe, dass es sich um ein kleines, am C-Terminus von Gag befindenes Protein handelt, welches C-terminal an das Nukleokapsid anschließt wie das p4-Peptid von MPMV (Abbildung 34; Henderson et al., 1985). George und Kollegen konnten in weiterführenden Studien mittels MALDI-TOF Analysen zeigen, dass es sich dabei um zwei kleine Glutamin (Q)- und Prolin (P)-reiche Peptide handelte. Dies führte auch zu ihrer Namensgebung, QP1 und QP2, nach dem Einbuchstabencode der Aminosäuren. Dabei liegt das QP1-Peptid mit einer etwas größeren Molekularmasse von 2.5 kDa zwischen dem Nukleokapsid und dem 2.1kDa großen QP2-Peptid (George et al., 2011). Erste sequenzielle Untersuchungen von QP1 und QP2 konnten keine L-Domänen identifizieren, wie sie beim p6-Protein von HIV-1 Gag und p9-Protein von EIAV Gag gefunden wurden (Demirov und Freed, 2002). Überprüft wurden die bekannten Motive P(T/S)AP, PPxY und YPxL. Demnach spielen sie wahrscheinlich keine Rolle beim Budding und der Freisetzung von viralen Partikeln (Chudak et al., 2013).

Für weiterführende Untersuchungen bezüglich der Funktionalität des QP1- und QP2-Peptides wurden im Rahmen dieser Arbeit QP-Deletionsmutanten (Δ QP) für die bereits genutzten Konstrukte generiert. Sie waren teils C-terminal mit dem Fluoreszenzprotein Cherry markiert (Abbildung 35). Alle Konstrukte wurden, wie zuvor auch die Nicht-Deletionsmutanten, hinsichtlich ihrer Expression, Assemblierung, Budding, Freisetzung und Reifung untersucht, um Rückschlüsse auf ihre Funktion zu ziehen. Es konnten jedoch keine Abweichungen im Vergleich zu den Nicht-Deletionsmutanten von oricoHERV-K113 beobachtet werden. Die Daten bestätigen nochmals, dass beide QP-Peptide keine L-Domäne beinhalten. Jedoch steht die Frage im Raum, welche Funktion beide Peptide besitzen.

Ein Blick auf die Aminosäuresequenz von QP1 zeigt zwei überlappende PXXP-Motive (PIQPFVP) am 5'-Ende des Peptids (Abbildung 34). Dieses prolinreiche Motiv wird spezifisch von der 60 Aminosäuren umfassenden SH3 (src homologe Region)-Bindedomäne erkannt und gebunden, die in nicht-katalytischen Regionen von zytoplasmatischen Tyrosinkinasen oder Phospholipasen auftritt. Sie unterstützt die Protein-Interaktion und spielt ebenso eine entscheidende Rolle bei intrazellulären Signaltransduktionsprozessen (Pawson und Schlessingert, 1993; Morton und Campbell, 1994; Mayer BJ 2001; Saksela und Permi, 2012). Der negativ regulatorische Faktor Nef von HIV-1, -2 und SIV weist ebenfalls das PXXP-Motiv auf und bindet darüber mit den SH3-Bindedomänen zahlreicher zytoplasmatischer Wirtsfaktoren der infizierten Zelle (Fackler et al., 2001; Saksela, 2011). Somit ist Nef in der Lage den Zellstoffwechsel der Wirtszelle positiv für die virale Replikation zu beeinflussen. Nef unterstützt das Überleben der Wirtszelle und steigert deren Infektionsanfälligkeit. Zudem kommt es zu einer verstärkten viralen Replikation der Lentiviren (Das und Jameel, 2005; Ariën und Verhasselt, 2008; Laugette et al., 2010; Landi et al., 2011). Ob das QP-1 Protein von HERV-K113 durch seine PXXP-Motive ebenfalls in der Lage ist, in den Wirtszellstoffwechsel einzugreifen, ist derzeit noch ungeklärt.

Betrachtet man die Funktion anderer kleiner, am C-Terminus von Gag gelegener Proteine, so weist zum Beispiel das p6-Protein von HIV-1 Gag neben seiner L-Domäne noch weitere entscheidende Eigenschaften auf. Es ist für die Inkorporation des akzessorischen, viralen Proteins R (Vpr) in virale Partikel verantwortlich (Paxton et al., 1993; Strack et al., 2003). Vpr ermöglicht nach Infektion der Wirtszelle den Transport des Prä-Integrationskomplexes in den Zellkern und hat weitere verschiedene Funktionen im viralen Replikationszyklus (Heinzinger et al., 1994; He et al., 1995; Kogan und Rappaport, 2011; Zhao et al., 2011). Zudem besitzt p6 eine erhöhte Membranaffinität und beeinflusst somit auch die Bindung von Gag an die Plasmamembran (Solbak et al., 2012). Durch die Membranumgebung erhöht sich zudem die Bindungsaffinität gegenüber Vpr, was dessen Einbau in virale Partikel verstärkt (Salgado et al., 2009). Andere konzentrierten sich mit ihren Untersuchungen auf den hohen Phosphorylierungsgrad von p6, konnten aber keinen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Assemblierung, Budding oder Freisetzung herstellen (Radestock et al., 2013). Die bisherigen Studien bezüglich des p6-Proteins von HIV-1 zeigten, dass dieses kleine, am C-Terminus von HIV-1 Gag gelegene Protein eine entscheidende Rolle für zahlreiche zelluläre als auch virale Bindungspartner spielt.

Das D-Typ Retrovirus MPMV besitzt am C-Terminus ebenfalls ein kleines p4-Peptid (Bradac und Hunter, 1984; Henderson et al. 1985). Diese 36 Aminosäuren große, prolinreiche Sequenz weist wie QP1 und QP2 keine L-Domäne auf und ist nicht essentiell für die Assemblierung von VLPs. Das konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen einer Deletionsmutante nachgewiesen werden (Rumlova-Klikova et al., 2000; Nermut et al., 2002). Hong und Kollegen fanden heraus, dass Gag über das p4-Peptid mit dem Protein TRiC interagiert und an der Proteinfaltung von Gag beteiligt ist. Erfährt Gag eine optimale Faltung, so kann eine Interaktion von Gag-Proteinen stattfinden, die zur Assemblierung führt. Deletionsmutanten von p4 zeigten, dass es nicht nur für die Bindung von Gag an die Untereinheit TCP-1 γ des Chaperon TRiC verantwortlich ist, sondern auch dessen native Faltung stabilisiert. Diese Bindung schützt zudem das frisch translatierte, virale Polystrukturprotein vor der Aggregation und proteolytischen Spaltung (Frydman et al., 1992; Hong et al., 2001; Kohoutová et al., 2009). Demnach ist das MPMV p4-Peptid in die Faltung des Gag-Proteins involviert, stabilisiert und schützt es, wodurch es die Interaktion zweier Gag-Proteine ermöglicht (Clarke, 2006; Kubota et al., 2006). Auch für das p6-Protein von HIV-1 wurde eine starke Interaktion mit der Untereinheit TCP-1 γ des TRiC-Chaperons nachgewiesen (Hong et al., 2001; Kohoutová et al., 2009). Ob QP1 und QP2 ebenfalls an der nativen Proteinfaltung beteiligt sind oder die Inkorporation von anderen Proteinen in virale Partikel ermöglichen, gilt es in zukünftigen Studien zu klären.

4.3 Intrazellulärer Transport von HERV-K(HML-2) Gag

Bei HERV-K(HML-2) handelt es sich um ein C-Typ Retrovirus, das an der Plasmamembran assembliert, von dieser in den extrazellulären Raum buddet und während dessen oder kurz danach durch proteolytische Spaltung via viraler Protease reift. Jedoch ist der intrazelluläre Transport der Gag-Monomere zwischen Translation und Akkumulation an der Plasmamembran noch kaum erforscht.

4.3.1 Tracking intrazellulärer HERV-K(HML-2) Gag-Akkumulationen

HERV-K(HML-2) Gag konnte intrazellulär nicht nur an der Plasmamembran, sondern auch als stationäre oder mobile Akkumulationen im Zytoplasma transfizierter Zellen detektiert werden (Film 1 und 2). Ob die, teils starken, intrazellulären Akkumulationen des viralen Proteins auf eine Überexpression zurückzuführen sind, ist jedoch unklar. Im Rahmen dieser Arbeit erhoffte man sich mittels kinetischer Untersuchungen einen

Einblick in den Transport der Gag-Akkumulationen zu erhalten, um durch weitere Versuche deren Funktion und Struktur zu ergründen.

Es konnten drei verschiedene Geschwindigkeitsfenster detektiert werden (Abbildung 40). Sehr häufig wurde eine Geschwindigkeit von 0-0,4 $\mu\text{m/s}$ beobachtet, nicht ganz so häufig 0,4-1 $\mu\text{m/s}$. Eine Geschwindigkeit im Bereich von 1-2 $\mu\text{m/s}$ gehörte dahingegen eher zu den seltenen Ereignissen. Zudem bewegten sich die Akkumulationen in einem zytoplasmatischen Bereich von etwa 20 μm mal 20 μm und konnten ihre Geschwindigkeit jederzeit innerhalb des Bereiches von 0-2 $\mu\text{m/s}$ variieren. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Messungen nur Bewegungen hinsichtlich der X- und Y-Achse berücksichtigten, jedoch keine Bewegungen in der Z-Dimension, was die eigentliche Geschwindigkeit der Akkumulationen verfälschen konnte. Hierfür gab es zwei entscheidende Gründe. Zum einen hätte die Aufnahme von Z-Stapeln zur Detektion der Geschwindigkeit in der Z-Dimension zu Einbußen bezüglich der zeitlichen Auflösung geführt, da die Bewegung der Gag-Akkumulationen schon mit teils bloßem Auge wahrnehmbar waren. Zum anderen war es dem Tracking-Softwaremodul von Nikon ausschließlich möglich die generierten Daten in der X-, Y- und t-Dimension auszuwerten, jedoch nicht in der vierten Dimension Z. Desweiteren sollte bei den *in vivo* generierten Daten die Eigenbewegung und die sich stetig ändernde Oberflächenstruktur der Zelle nicht außer Acht gelassen werden. So könnte zum Beispiel eine Gag-Akkumulation, die stationär an der Plasmamembran adhärierte, durch zelluläre Bewegungen als freie, zytoplasmatische Gag-Akkumulation nahe der Plasmamembran detektiert werden. Das gilt auch für Plasmamembraneinstülpungen. Um dies zu untersuchen eignen sich insbesondere korrelative Untersuchungsmethoden wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Es handelt sich demnach bei den generierten Daten um grobe Richtwerte und es kann von einer wesentlich höheren Geschwindigkeit der Gag-Akkumulationen ausgegangen werden.

Ein Blick in die Literatur zeigt, dass bereits in früheren Studien verschiedene Geschwindigkeitsfenster beobachtet wurden, in denen sich HIV-1 Gag-Akkumulationen bewegten. Jouvenet und Kollegen detektierten bereits mittels TIRF-Mikroskopie zwei verschiedene Durchschnittsgeschwindigkeiten von Gag-Akkumulationen an der Plasmamembran transfizierter Zellen. Erste Akkumulationen fünf bis sechs Stunden nach Transfektion bewegten sich mit durchschnittlich 7nm/s recht langsam und konnten deshalb auch über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei Akkumulationen 15 bis 16 Stunden nach Transfektion eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 195nm/s gemessen. Dabei ist es egal, welche

Fluorophore an Gag gekoppelt sind. Auch das Mischungsverhältnis an Fluoreszenzprotein-markierten und unmarkierten Gag hat keinen Einfluss, solange es sich im Rahmen der zu VLPs führenden Mischungsverhältnisse befindet (Jouvenet et al., 2008). Neben Geschwindigkeitsunterschieden wurden bei diesen Studien drei verschiedene Intensitätsmuster der Fluoreszenz beobachtet, ein Anstieg der Fluoreszenzintensität, homogene Plateaus mit Fluktuationen bezüglich der Emission der Gag-Akkumulationen und ein Abklingen. Ein Fluoreszenzanstieg kann in den ersten, maximal neun Minuten, nach Erscheinen des ersten Plasmamembran-ständigen Gag-Signals detektiert werden. Diese Assemblierung von Gag-Monomeren beziehungsweise -Multimeren findet räumlich stationär an der Plasmamembran statt. Die anschließende Plateauphase mit Fluktuationen in der Fluoreszenz beschreibt eine stationäre Phase, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Einen Austausch von Gag zwischen Zytoplasma und Plasmamembran während dieser Phase widerlegten bereits FRAP-Analysen (Gomez und Hope, 2006; Jouvenet et al., 2008; Helma et al., 2012). Zudem wurde eine steigende, laterale Bewegung beobachtet. Gomez und Hope konnten nachweisen, dass der Cholesterolgehalt eine entscheidende Rolle für die Mobilität von Gag an der Plasmamembran spielten. Geringe Mengen in der Plasmamembran der Zelle schränken die hohe Mobilität von Gag enorm ein. Hierbei handelt es sich um einen reversiblen Prozess (Gomez und Hope, 2009). Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei der vergleichsweise langen Plateauphase um den Abschnürungsprozess der viralen Partikel von der Plasmamembran handelt. Die in der dritten Phase abklingende Fluoreszenzintensität, mit steigender Mobilität der Gag-Akkumulation verweist auf die Freisetzung der VLPs in das Kulturmedium (Jouvenet et al., 2008, 2009; Ivanchenko et al., 2009). Auch konnte gezeigt werden, dass sich schnelle und lateral frei bewegliche HIV-1 Gag-Akkumulationen meist zusammen mit Endosomen-spezifischen Proteinen auftreten und verschwinden. Es verweist auf eine endosomale Lokalisation von Gag (Jouvenet et al., 2008).

Zudem geht aus der Literatur hervor, dass sich Transportvesikeln des Golgi-Apparates beim axonalen Transport anterograd mit 2-5 $\mu\text{m/s}$ recht schnell bewegen, im Gegensatz zu Endozytose-Vesikeln, Lysosomen oder Autophagosomen mit 1-2 $\mu\text{m/s}$. Lasek und Kollegen konnten bereits 1984 nachweisen, dass Mikrofilament-gebundene, zytosolische Proteinkomplexe mit 0.02-0.09 $\mu\text{m/s}$ eher langsam durch das Zytoplasma transportiert werden (Lasek et al., 1984; Brown et al., 2003; Kaasik et al., 2007). Endosomen legen mittels Mikrotubuli- und/oder Aktin-assoziierten Motorproteinen kurze oder lange Strecken zurück, wobei kürzere Strecken häufiger zu beobachten sind (Soldati und

Schliwa, 2006). Dabei unterscheiden sie sich auch durch ihre Geschwindigkeitsmuster. Bei langen Strecken variiert die Geschwindigkeit eines Endosoms zwischen verschiedenen Streckenabschnitten sehr stark von unter $1\mu\text{m/s}$ bis hin zu $8\mu\text{m/s}$. Neben langsamen und schnellen Bewegungsphasen kann auch ein Wechsel zwischen mobilen und stationären Phasen detektiert werden. Diese Varianzen werden auch bei kurzen Distanzen beobachtet, wobei Endosomen lange Distanzen wesentlich schneller als kurze bewältigten. Die Bewegungsmuster sind dabei bidirektional gerichtet, zum Zellkern oder zur Peripherie hin (Rogers et al., 2010; Flores-Rodriguez et al., 2011). Vergleicht man das mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten, so fällt auf, dass die Bewegungsmuster der Gag-Akkumulationen denen der Endosomen ähneln. Es wurde eine sprunghafte Änderung der Geschwindigkeit als auch der Richtung beobachtet (Film 4), sowie ein Wechsel zwischen mobilen und stationären Phasen. Auch Akkumulationen, welche von einem intrazellulären, mobilen Zustand zu einem stationären, Plasmamembran-nahen Zustand wechselten, wurden erfasst. Die in dieser Arbeit ermittelte Kinetik der Gag-Akkumulationen lässt jedoch keine eindeutige Aussage zum intrazellulären Transport zu, was weiterführende Versuche bezüglich des Transportes via endosomalen Stoffwechselweg mit sich zog.

4.3.2 Mikrotubuligestützter HERV-K(HML-2) Gag-Transport

Das Zytosol ist eine visköse Substanz, welche mindestens zu 50% aus zytosolischen Proteinen besteht. Es lässt vermuten, dass Proteine allein durch Diffusion nur sehr langsam Strecken zurücklegen können. Zudem vermindern transiente Bindungen an Bindungspartner als auch das Zytoskelett diesen Prozess nochmals. Es verweist auf einen aktiven Proteintransport, um gerichtete Bewegungen von Zellorganellen und Makromolekülen zu gewährleisten (Luby-Phelps, 2000).

Ein aktiver und gerichteter Transport kann durch das Zytoskelett, welches das komplette Zytosol durchspannt, unterstützt werden. Es setzt sich neben Mikrotubuli auch aus Aktin und Intermediärfilamenten zusammen und unterliegt einem stetigen Wandel. Unter anderem ist das mikrotubuläre Netzwerk auch für den Transport von vesikulären Kompartimenten wie Endosomen verantwortlich (Aniento et al., 1993; Lebrand et al., 2002). Virologisch betrachtet, spielen Mikrotubuli nicht nur bei der Infektion der Wirtszelle eine entscheidende Rolle, indem sie den Prä-Integrationskomplex von der Zellperipherie zum Zellkern transportieren, sondern auch beim Transport von Gag zur Plasmamembran (Naghavi und Goff, 2007). Zudem lassen auch Trackingdaten vermuten,

dass es sich bei HERV-K(HML-2) Gag um einen mikrotubuligestützten Transport (1-8 μ m/s) handeln könnte (Soldati und Schliwa, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur vereinzelt eine distale, räumliche Nähe von Gag und deren QP-Deletionsmutante zu α -Tubulin, Bestandteil der Mikrotubuli, in peripheren Zellbereichen beobachtet werden (Abbildung 41). Jedoch wurde bei anderen Retroviren bereits ein Zusammenhang zwischen intrazellulären Gag-Transport und Mikrotubuli nachgewiesen. Bei HIV-1 konnte eine Kolokalisation des durch HIV-1 induzierten Wirtsfaktors "Suppressor des Zytokinsignalwegs 1" (SOCS1) mit Gag entlang des mikrotubulären Netzwerkes nachgewiesen werden. SOCS1 bindet zum einen an das Matrix- und Nukleokapsidprotein von HIV-1 Gag und zum anderen an mikrotubuläre Filamente. Es fördert zudem die Ubiquitinierung von Gag, was zu einer verstärkten Partikelformierung von HIV-1 an der Plasmamembran führt. Demnach steuert und stabilisiert es den kontrollierten, intrazellulären, mikrotubuligestützten Transport von Gag und reguliert damit auch die HIV-1 Partikelassemblierung an der Plasmamembran der Wirtszelle (Ryo et al., 2008; Nishi et al., 2009). Jedoch scheint HIV-1 Gag nicht ausschließlich via Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert zu werden. Die Depletion von SOCS1 mittels siRNA führt zur Anreicherung von Gag im perinuklearen Bereich und dessen Abbau durch Lysosomen, resultierend in einer verminderten Partikelproduktion bei humanen T-Zellen (Ryo et al., 2008). Jouvenet und Kollegen wiesen hingegen nach, dass eine transiente Zerstörung des mikrotubulären Netzwerkes mittels Nokodazol, den Transport von HIV-1 Gag zur Plasmamembran nicht beeinflusst (Jouvenet et al., 2006). Bei HTLV-1 konnte die SOCS1-Expression durch das virale Tax-Protein induziert werden. Die Interaktion beider Proteine führt zu einer erhöhten HTLV-1 Partikelproduktion (Charoenthongtrakul et al., 2011). HIV-1 als auch HTLV-1 assemblieren wie HERV-K(HML-2) an der Plasmamembran der Wirtszelle. Inwieweit SOCS1 auch Einfluss auf die Partikelassemblierung von HERV-K(HML-2) Gag hat, sollte in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

Bei der MPMV-Replikation werden Mikrotubuli ebenfalls eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Partikelassemblierung zugewiesen (Sfakianos und Hunter, 2003; Sfakianos et al., 2003; Pereira et al., 2014). Deren Notwendigkeit wird auch bei der Replikation des Rinderfoamyvirus (BFV) verdeutlicht. Das Spurmavirus assembliert im Zytoplasma, woraufhin die viralen Partikel mittels Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert werden (Wang et al., 2010). Gag des endogenen Jaagsiekt Schaf-Retrovirus (JSRV) nutzt via Dynein und Mikrotubuli den Stoffwechselweg von Recycling-Endosomen, um zur

Zellmembran zu gelangen (Armund et al., 2007). All diese Daten zeigen, dass das mikrotubuläre Netzwerk beim intrazellulären Transport von Retroviren oder retroviralen Komponenten eine entscheidende Rolle spielt. Dies kann in direkter Form der Fall sein oder aber auch über den endosomalen Stoffwechselweg. Demnach sollten für HERV-K(HML-2) noch weitere Untersuchungen vorgenommen werden, um eine eindeutige Aussage bezüglich der Funktion von Mikrotubuli für die späte Phase der Replikation treffen zu können.

4.3.3 Die Rolle des endosomalen Stoffwechselweges

Es gab zahlreiche Hinweise durch vorherige Versuche, dass Vesikel beim intrazellulären Transport von HERV-K(HML-2) Gag eine Rolle spielen. Intrazelluläre oricoHERV-K113 Gag-Akkumulationen besaßen eine runde Form und auch die kinetischen Daten verwiesen auf einen möglichen endosomalen Transport via Mikrotubuli und/oder Aktin (Film 1 und 4; Soldati und Schliwa, 2006). Lichtmikroskopisch wurden GagCherry-Akkumulationen in starker räumlicher Nähe zu vesikulären Strukturen detektiert (Abbildung 42A und B). Elektronenmikroskopische Untersuchungen identifizierten zudem mögliche vesikuläre Strukturen, die zahlreiche, teils reife VLPs an, aber auch im Lumen aufwiesen (Abbildung 42D-F). Ob es sich hier um angeschnittene, zelluläre Plasmamembran-Einstülpungen oder um intrazelluläre Vesikel handelt, ist aber unklar (Abbildung 42C und D). Aus Film 5 geht hervor, dass es sich wahrscheinlich um intrazelluläre Vesikel handelt. Aussagekräftig wären hier Schnittserien für transmissionselektronenmikroskopische oder elektronentomographische Analysen.

4.3.3.1 HERV-K(HML-2) Gag akkumuliert in späten Endosomen

Einst wurde vermutet, dass die Assemblierung von C-Typ Retroviren alleinig an der Plasmamembran stattfindet. Jedoch hat sich herausgestellt, dass der endosomale Stoffwechselweg bei vielen Retroviren ebenfalls eine teils entscheidende Rolle spielt. Zum Beispiel assembliert zytosolisches HIV-1 Gag nicht nur an der Plasmamembran, sondern auch perinuklear, direkt an späten Endosomen (Lehmann et al., 2009; Flores-Rodriguez et al., 2011). Hier kommt es an der zytosolischen Membran zur Akkumulation viraler Komponenten, was im Budding von VLPs in das Lumen der Endosomen resultiert. Aus späten Endosomen können zudem Multivesikuläre Körperchen (MVB) durch die Abschnürung ganzer Membranabschnitte in das endosomale Lumen hervorgehen (Piper und Katzmann, 2007). Im Lumen der intralumenalen Vesikel wurden ebenfalls

Anhäufungen von reifen VLPs beobachtet (Sherer et al., 2003; Blot et al., 2004). In der Immunfluoreszenz sind diese durch eine starke Fluoreszenz des markierten Gags im Lumen später Endosomen sichtbar (Sherer et al., 2003; Jouvenet et al., 2006). Eine Anreicherung von oricoHERV-K113 Gag beziehungsweise deren QP-Deletionsmutante im Lumen später Endosomen wurde auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet (Abbildung 44, Film 7). Ob es sich dabei um VLPs handelte, könnten CLEM-Studien aufdecken.

Auch bei der HIV-1 Replikation in Makrophagen wurde eine große Anzahl assemblierter, viraler Partikel im Lumen von späten Endosomen nachgewiesen (Raposo et al., 2002; Nguyen et al., 2003; Pelchen-Matthews et al., 2003; Ono, 2009). Dieses Phänomen wiesen ebenso Fibroblasten, T-Lymphozyten, dendritische und epitheliale Zellen auf (Kramer et al., 2005; Booth et al., 2006; Jouvenet et al., 2006). Der Transport dieser endosomalen Kompartimente erfolgt dann via Mikrotubuli zur Zellperipherie (Dorweiler et al., 2006; Lehmann et al., 2009; Huotari und Helenius, 2011). Hier verschmelzen endosomale Membran und Plasmamembran, wobei der intralumenale Inhalt des Endosoms in die Zellumgebung freigesetzt wird (Nydegger et al., 2002; Booth et al., 2006; Ono, 2009). Bei dieser sekretorischen Freisetzung der viralen Partikel fungieren die einstigen späten Endosomen als Exosomen und können anhand von spezifischen Markern identifiziert werden (Hsu et al., 2010; Ostrowski et al., 2010). So wurden an den Plasmamembranbereichen, an denen HIV-1 Gag akkumuliert, endosomenspezifische Mikrodomänen detektiert. Auch die späten Endosomenmarker CD63 und Lamp-1 konnten in der Virushülle freigesetzter HIV-1 VLPs nachgewiesen werden (Raposo et al., 2002; Nguyen et al., 2003; Pelchen-Matthews et al., 2003; Ono und Freed, 2004).

Bei HTLV-1 wurde eine ubiquitinstützte Anreicherung von Gag in Endosomen/MVB beobachtet (Blot et al., 2004; Dorweiler et al., 2006). Via Ubiquitinierung kann Gag durch den ESCRT in den endosomalen Stoffwechselweg eingebunden werden (Reggiori und Pelham, 2002; Piper und Luzio, 2007). Das wirtseigene AP-3 δ , ein endosomales Adapterprotein, bindet direkt an das Matrixprotein von HIV-1 Gag und verstärkt somit dessen Transport zu MVB (Dong et al., 2005; Piper und Katzmann, 2007; Ryo et al., 2008). Dies zeigt, dass Gag diverser Retroviren im unterschiedlichen Maße in der Lage ist, zwei verschiedene, membranbezogene Assemblierungswege zu nutzen und Wirtsfaktoren einen entscheidenden Einfluss darauf haben. Die Einbindung des endosomalen Weges in die Partikelreplikation wird zudem durch die Kollokalisierung von viraler RNA und späten Endosomen bestätigt (Lehmann et al., 2009; Molle et al., 2009).

4.3.3.2 HERV-K(HML-2) Gag wird durch Lysosomen degradiert

Auch Lysosomen, Bestandteil des endosomalen Stoffwechselweges, wurde eine Rolle bei der viralen Replikation zugewiesen. Sie dienen aufgrund ihrer katabolischen Funktion der negativen Regulierung der viralen Replikation. HERV-K113 Gag beziehungsweise deren QP-Deletionsmutante akkumulierte ebenfalls an Lysosomen, was auf den hydrolytischen Abbau des viralen Polystrukturproteins schließen lässt (Abbildung 43, Film 6). Wird der HIV-1 Gag stabilisierende, in den mikrotubulären Transport von Gag involvierte SOCS1-Wirtsfaktor geblockt, so kommt es zum Abbau von HIV-1 Gag via Lysosomen (Ryo et al., 2011). Wird hingegen die lysosomale Degradierung von HIV-1 Gag gehemmt, beispielsweise durch Chloroquin oder Monensin, so akkumuliert Gag verstärkt an späten Endosomen. Dies führt zum drastischen Anstieg der VLP-Freisetzung via Endosomen bei HIV-1 (Basyuk et al., 2003; Molle et al., 2009). Bei Makrophagen wird der lysosomale Abbau von endosomalen, viralen HIV-1 Partikeln durch die Unfähigkeit der Rekrutierung der Protonenpumpen ATPase unterbunden. Endosomen sind ohne diese nicht in der Lage ein saures Milieu im Lumen aufzubauen. Somit bleibt die endosomale Reifung aus und damit auch die Fusion von Endosomen und Lysosomen (Jouve et al., 2007).

4.3.3.3 HERV-K(HML-2) Gag interagiert nicht mit Recycling-Endosomen

Ein weiteres Kompartiment des endosomalen Stoffwechselweges stellen Recycling-Endosomen dar. Eine Funktion während der späten Replikationsphasen von retroviralen Partikeln wie MLV oder HIV-1 konnte bisher nicht gezeigt werden (Sherer et al., 2003). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte nur sehr selten eine räumliche Nähe von HERV-K113 Gag oder dessen QP-Deletionsmutante zu Recycling-Endosomen beobachtet werden (Abbildung 45). Dass es sich hierbei um eine unspezifische räumliche Nähe handelte, wurde vor allem durch den Film 8 deutlich, da die Gag-Akkumulationen nahe der spezifisch markierten Membran des Kompartiments auftraten und auch wieder verschwanden. Nur sehr kleine Akkumulationen verblieben an Recycling-Endosomen. Diese geringe Anhäufung des viralen Strukturproteins an der zytosolischen Kompartimentmembran könnte auf deren Plasmamembran- und Liganten-Recyclingfunktion beruhen (Steinman et al., 1983; Ono, 2009; Huotari und Helenius, 2011). Durch Endozytose könnte bereits an der Plasmamembran akkumuliertes Gag über frühe Endosomen zu den Recycling-Endosomen gelangen. Für MPMV wurde hingegen gezeigt, dass der endosomale, sekretorische Stoffwechselweg nicht in den intrazellulären Transport von Gag involviert ist. Dennoch spielen Recycling-Endosomen hier eine

entscheidende Rolle, da eine Mutation der für das Kompartiment spezifischen GTPase rab11 den Gag-Transport via Recycling-Endosomen hemmt beziehungsweise die Gag-Reifung verzögert (Sonnichsen et al., 2000; Sfakianos und Hunter, 2003; Saftig und Klumperman, 2009). Vergleicht man die in dieser Arbeit gesammelten Daten mit den publizierten Daten von HIV-1, MLV und MPMV, so verhält sich HERV-K(HML-2) Gag vorherrschend wie die Polystrukturproteine von HIV-1 und MLV.

HERV-K(HML-2) Gag scheint somit nicht nur an der Plasmamembran zu assemblieren, sondern auch Kompartimente des endosomalen Stoffwechselwegs zu nutzen. Um jedoch die Endozytose replizierter VLPs auszuschließen, sollte in weiteren Studien eine Immunpräzipitation mittels endosomaler Marker am Zellkulturüberstand vorgenommen werden. Zudem kann mittels diverser, den endosomalen Stoffwechselweg beeinflussender Substanzen die Gewichtigkeit beider Assemblierungswege näher untersucht werden (Basyuk et al., 2003; Molle et al., 2009). Auch weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen mittels Immunmarkierung verschiedener endosomaler Marker können tiefere Einblicke ermöglichen (Sherer et al., 2003; Dorweiler et al., 2006).

4.4 Das Hüllprotein Env von HERV-K(HML-2)

Das Hüllprotein Env von HERV-K(HML-2) war bereits Objekt zahlreicher Studien. Das Glykoprotein ermöglicht die Infektion von Wirtszellen durch die Bindung an zelleigene Oberflächenrezeptoren (Waheed und Freed, 2009). Auch Env von oricoHERV-K113 wurde bereits hinsichtlich seiner Expression und dem Einbau in virale Partikel untersucht (Beimforde et al., 2007; Hanke et al., 2009). Neueste Studien zeigen, dass Env von HERV-K(HML-2) zudem ein Ziel für Impfstoffe bieten kann (Kraus et al., 2013). Jedoch wurden noch keine intrazellulären Lokalisationsstudien betrieben und auch keine Aussagen bezüglich seiner intrazellulären Transportwege getroffen. Hierfür sind entweder Env spezifische Antikörper oder kleine Markersequenzen von Nöten, da größere Tags dessen Funktionalität beeinflussen können (Erlwein et al., 2003; Hanke et al., 2009). Für die Studien im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene oricoEnv-Konstrukte kloniert und verwendet, welche einen kleinen, C-terminalen Tag aufwiesen (Abbildung 46). Die C-terminale, zytoplasmatische Domäne von Env ist bestimmend für den intrazellulären Transport, die Integration von Env in virale Partikel und die Fusiogenität (Blot et al., 2006; Celma et al., 2007; Côté et al., 2008). Somit stellen die grundlegenden

Untersuchungen bezüglich intrazellulärer Lokalisation, Transport und Integration in virale Partikel beider Env-Konstrukte eine Grundlage für weiterführende Versuche dar.

4.4.1 Intrazelluläre Verteilung des HERV-K(HML-2) Env

HERV-K113 Env konnte bisher nur intrazellulär in fast ausschließlich unprozessierter Form mittels Western Blot detektiert werden. Im Vergleich zu anderen Betaretroviren wird es nur geringfügig an der Zelloberfläche präsentiert und auch nicht in virale Partikel integriert (Dewannieux et al., 2005; Beimforde et al., 2009).

Die Generierung der vermutlichen Wildtypsequenz von HERV-K113 Env durch Sequenzvergleiche und deren Codonoptimierung verstärkte die Akkumulation von Env (orico Env) an der Plasmamembran. Es wurde auch im Zytoplasma und gehäuft nahe des Zellkerns detektiert. Plasmamembranbereiche mit einer starken Anhäufung von Env wiesen nur eine geringe Membranfärbung durch DiO auf (Abbildung 47). Das Phänomen beruht auf der Tatsache, dass sich der Lebendfarbstoff DiO ausschließlich in Membranbereiche einlagert, die keine Lipid Rafts aufweisen (Rönnebäumer et al., 2008). Die Literatur zeigt, dass diverse behüllte Viren wie HIV-1, MLV, HTLV-1 und Influenza an mit Lipid Rafts angereicherten Membranbereichen assemblieren, budden und diese in die virale Hülle einbauen (Scheiffele et al., 1997; Lindwasser und Resh, 2001; Niyogi und Hildreth, 2001; Ono und Freed, 2001; Beer et al., 2003; Takeda et al., 2003; Rajendran und Simons, 2005; Wielgosz et al., 2005). Hier reichert sich auch das virale Hüllprotein an und wird somit in die Virushülle integriert (Chazal und Gerlier, 2003; Waheed und Freed, 2009). In der Virushülle von HIV-1 und MLV konnte ein wesentlich höherer Anteil an Raft-Lipiden gemessen werden als in der Plasmamembran der Wirtszelle. Sie liegen in der Partikelmembran zudem in einer erheblich geordneteren Form vor (Aloia et al., 1993; Brugger et al., 2006; Chan et al., 2008).

Um Membranbereiche mit Env-Akkumulationen in der Transmissionelektronenmikroskopie zu identifizieren, erweist sich die Membranfärbung mittels DiO als hilfreich. DiO ist in der Lage Diaminobenzidin (DAB) zu photokonvertieren und eröffnet somit die Möglichkeit Lipid Raft-arme Plasmamembranbereiche zu identifizieren (<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorescent-tracers-of-cell-morphology-and-fluid-flow/tracers-for-membrane-labeling.html>, Zugriff am: 27.12.2013). Demnach könnten in zukünftigen Studien nicht nur bestimmte Plasmamembranbereiche,

sondern auch intrazelluläre, Lipid Raft-reiche Membranabschnitte von armen durch die CLEM differenziert werden.

4.4.1.1 HERV-K(HML-2) Env wird am Endoplasmatischen Retikulum translatiert

Das virale Hüllprotein Env gehört zu den Typ-1 Membranglykoproteinen, die sich durch einen ins Zytosol ragenden C-Terminus auszeichnen. Retrovirales Env setzen sich aus Signalpeptid, Oberflächenprotein und Transmembranprotein zusammen. Es wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum translatiert und zeitgleich in die Retikulummembran via der membrandurchspannenden Domäne des Transmembranproteins integriert. Somit ragen Signalpeptid und Oberflächenprotein ins Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums und gelangen durch Membranfusion an die Zelloberfläche (Berman et al., 1988; Haffar et al., 1988; Hunter und Swanstrom, 1990; Hanke et al., 2009). Der C-terminal gelegene, zytoplasmatische Teil verbleibt dabei im Zytosol. An diesem befand sich zudem der TC-beziehungsweise V5-Tag des Hüllproteins, das aus den Konstrukten oricoEnvTC und oricoEnvV5 hervorging (Abbildung 46). Für HERV-K113 oricoEnv konnte ebenfalls eine Kolokalisation mit dem Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Abbildung 48A; Hanke et al., 2009). Es erklärte die bereits in den vorherigen Versuchen beobachteten Akkumulationen von Env am Zellkern der transfizierten Zelle (Abbildung 47C). Natives Env-Vorläuferprotein unterliegt ko- und posttranslationalen Modifikationen im Endoplasmatischem Retikulum und Trans Golgi Apparat. Hierzu gehören unter anderem die Glykosylierung, aber auch die Prozessierung von Env durch Furin oder furinartige Proteasen (Kurth und Bannert, 2010; Checkley et al., 2011; Johnson et al., 2011).

Bei HIV-1 wurde bereits die Oligomerisierung von Env im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen. Es wird vermutet, dass die Oligomerisierung den membrangekoppelten Transport von Env zum Trans Golgi Apparat ermöglicht (Pinter et al., 1989; Schawaller et al., 1989; Earl et al., 1990, 1991). Auch für HIV-2 und SIV konnte die Oligomerisierung von Env direkt nach der Synthese am Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Doms et al., 1990). Inwieweit die Oligomerisierung von Env mit den ebenfalls am Endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Sphingolipiden und Cholesterolen zusammenhängt, ist unklar. Sphingolipid-Cholesterol-reiche Mikrodomänen sind Bestandteil der Lipid Rafts und in geringen Konzentrationen in allen intrazellulären Membranen zu finden. Sie bilden entlang des sekretorischen Stoffwechselweges einen Konzentrationsgradienten. Perinuklear kann eine eher geringe

Konzentration gemessen werden, welche zur Zelloberfläche hin ansteigt. Hohe Konzentrationen treten damit nur in der Plasmamembran als auch in endosomalen Membranen auf (van Meer, 1998; Liscum und Munn, 1999; van Meer und Holthuis, 2000; Hao et al., 2002). Dies zeigt, dass Lipid Rafts endosomal und mikrotubuligestützt zur Plasmamembran transportiert werden (Ikonen, 2001). Somit liegt nahe, dass Lipid Raft-Domänen im Endoplasmatischen Retikulum integriertes Env mit sich zur Zelloberfläche führen.

4.4.1.2 HERV-K(HML-2) Env und der endosomale Stoffwechselweg

Lipid Rafts wurden in Recycling-Endosomen, aber auch frühen Endosomen verstärkt nachgewiesen (Hornick et al., 1997; Mukherjee et al., 1998; Gagescu et al., 2000). HERV-K113 oricoEnv konnte jedoch nur in einigen transfizierten Zellen mit späten und Recycling-Endosomen in Zusammenhang gebracht werden (Abbildung 48C und D). Inwieweit TC- als auch V5-Tag an der zytosolischen Domäne von oricoEnv Einfluss auf den intrazellulären Transport beziehungsweise den immunhistochemischen Nachweis von Env haben ist nicht geklärt. Die C-terminal gelegene, zytoplasmatische Domäne von Env ist jedoch neben der Integration und der Fusiogenität der viralen Partikel auch ausschlaggebend für den intrazellulären Transport des Hüllproteins (Blot et al., 2006; Celma et al., 2007; Lambelé et al., 2007; Cote et al., 2008; da Silva et al., 2013).

Lysosomen scheinen beim intrazellulären Transport von retroviralen Env zur Plasmamembran keine Rolle zu spielen. Auch für HERV-K113 konnte kein Zusammenhang zwischen oricoEnv und dem katabolischen Kompartiment hergestellt werden (Abbildung 48B). Bei MLV wurde dennoch nachgewiesen, dass die virale RNA mittels Lysosomen und Transferrin-positiven Endosomen transportiert wird. Hierbei spielt die Interaktion der viralen RNA mit Gag und Env eine entscheidende Rolle. Es lässt auf die Formierung von Buddingkomplexen an der endosomalen Membran schließen (Basyuk et al., 2003). Lysosomen besitzen jedoch bei der Degradierung von internalisiertem Env eine wichtige Rolle. Es wird über die clathrinabhängige Endozytose aufgenommen. Diese frühen, Env-beladenen Endosomen fusionieren aber neben Lysosomen auch mit Recycling-Endosomen. Hierdurch gelangt Env wieder zur Plasmamembran und kann in virale Partikel integriert werden (Rajendran und Simons, 2005; Checkley et al., 2011). HERV-K113 oricoEnv zeigte bei einigen Zellen eine Kollokalisierung von Env und Recycling-Endosomen-Marker, was die These des Env-Recyclings unterstützt (Abbildung 48D).

4.4.2 Gag und Env assemblieren an der Plasmamembran

Assemblierung, Budding und Freisetzung von C-Typ Retroviren, wie HIV-1 und HERV-K(HML-2), findet an der Zellmembran infizierter Zellen statt (Gelderblom et al., 1985; Ono, 2009; Hogue et al., 2011; Kraus et al., 2011; Chudak et al., 2013). Demnach sollten Env und Gag im Rahmen der Assemblierung auch kolokalisiert an der Plasmamembran auftreten, was aus Abbildung 49 deutlich hervorgeht. Für HIV-1 und andere an der Plasmamembran assemblierende Retroviren konnte dies in zahlreichen Studien bestätigt werden (Lindwasser und Resh, 2001; Ono und Freed, 2001; Kurth und Bannert, 2010). Zudem wurden bereits beide viralen Proteine mit Lipid Rafts in Zusammenhang gebracht (Aloia et al., 1993; Nguyen und Hildreth, 2000; Ono und Freed, 2001; Brugger et al., 2006; Chan et al., 2008; Hogue et al., 2011). Das und die Matrixprotein-gekoppelte Rekrutierung von Env bestätigen die Kolokalisation von Gag und Env an der Plasmamembran (Checkerly et al., 2011; Sunquist und Kräusslich, 2012). Demnach sind mehrere Rekrutierungs- und Bindungsprozesse viraler und wirtseigener Komponenten in die Assemblierung viraler Partikel involviert. Die Kolokalisation von Gag und Env an der Plasmamembran legt den Grundstein, bestätigt aber nicht den Einbau von oricoEnv in HERV-K113 Partikel.

Auch wurden intrazelluläre Kolokalisationen von Gag und Env beobachtet (Abbildung 49 und 50; Film 9). Dabei könnte es sich um Assemblierungskomplexe, um durch Plasmamembraneinstülpungen internalisierte, virale Partikelanhäufungen oder um endosomale, VLP-beladene Vesikel handeln. Ersteres kann fast ausgeschlossen werden, da transmissionselektronenmikroskopisch eine Assemblierung nur an der Plasmamembran beobachtet wurde (Abbildung 42; Rowell et al., 1995; Egan et al., 1996; Johnson et al., 2011). Das Verfahren der CLEM würde auch hier aufschlussreiche Ergebnisse liefern.

4.4.3 Env wird verstärkt in HERV-K(HML-2) Partikel inkorporiert

Bezüglich des Einbaus von HERV-K113 oricoEnv in virale Partikel wurden bereits in der Vergangenheit Untersuchungen angestellt. Wildtyp (wt) Env zeigt nur eine sehr schwache Expression und wird nicht in virale Partikel inkorporiert. Die Codonoptimierung und die Beseitigung der internen Schnittstelle von wtEnv verbesserte die Expression von HERV-K113 Env um mehr als das 50-fache. Jedoch konnte erst bei oricoEnv, das sich vom codonoptimierten Env durch acht Rückmutationen unterscheidet, eine verstärkte Prozessierung des Vorläuferproteins beobachtet werden (Hanke et al., 2009). Unprozessiertes Env wird zwar zur Plasmamembran transportiert, aber nicht in virale

Partikel inkorporiert. Da Env nach seiner Integration in die Zellmembran zeitnah dem Degradierungsprozess unterliegt, wird unprozessiertes Env wie auch prozessiertes schnell von der Zelloberfläche via clathringestützter Endozytose entfernt (Dubay et al., 1992; Rowell et al., 1995; Egan et al., 1996; Apte und Sanders, 2010; Lucas et al., 2010). Der Einbau von Env in virale Partikel muss demnach zeitnah erfolgen. Ein Beweis das dies passiv geschieht, ist die Pseudotypisierung, die den Einbau von viralem Hüllprotein verschiedener Viren einer aber auch anderer Familien in ein virales Partikel beschreibt (Zavada, 1982; Reiser et al., 1996; Kobinger et al., 2001; Zeilfelder und Bosch, 2001; Hofmann et al., 2004; Kobinger et al., 2004; Liu et al., 2004). Dadurch konnte teils sogar die Infektiosität von viralen Partikeln gesteigert werden (Reiser et al. 1996; Mochizuki et al., 1998). Es zeigt, dass alle Viren den gleichen Mechanismus der Env-Inkorporation nutzen. Die Vermutung der passiven Inkorporation wird unterstützt durch die Tatsache, dass der Einbau von wirtseigenen Oberflächenprotein von der Expressionsrate des viralen Hüllproteins abhängt. Eine verstärkte Expression führt zu einer gesteigerten Inkorporation des Hüllproteins in die Virushülle (Hammarstedt et al., 2000; Hamarstedt und Garoff, 2004; Chertova et al., 2006). Deshalb wurde auch für die Untersuchungen bezüglich oricoEnv neben dem oricoHERV-K113 Konstrukt noch zusätzlich oricoEnv-TC oder -V5 dem Transfektionsansatz beigelegt.

Um die Prozessierung und den Einbau von HERV-K113 oricoEnv in virale Partikel zu prüfen, wurden die in den Zellkulturüberstand freigesetzten, viralen Partikel mittels Western Blot untersucht (Abbildung 51). Es wurde deutlich, dass Env sowohl mit als auch ohne C-terminalen Tag prozessiert und vermehrt in der Hüllmembran von HERV-K113 Partikeln vorliegt (Hanke et al., 2009). Elektronenmikroskopisch konnte dies bestätigt werden. Zellen, zusätzlich transfiziert mit oricoEnvV5 oder oricoEnvTC, zeigten verstärkt haarige Strukturen (Spikes) auf der Oberfläche der viralen Partikel (Abbildung 52A im Vergleich zu 24, 25 und 27). Präparationsartefakte konnten dabei ausgeschlossen werden, da alle Proben zusammen und auch mehrfach präpariert wurden. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass Dewannieux und Kollegen durch die Transfektion mit der Phönixsequenz von HERV-K ebenfalls Hüllprotein auf der Oberfläche von HERV-K(HML-2) Partikel nachweisen konnten (Dewannieux et al., 2006). Auch bei andern Retroviren wurden Spikes auf der Partikeloberfläche mittels Elektronenmikroskopie identifiziert (White et al., 2011; Frank et al., 2012). Diese Oberflächenstrukturen konnten in der Rasterelektronenmikroskopie als Unebenheiten auf den viralen Partikeln nachgewiesen werden (Abbildung 52C im Vergleich zu 29). Die Daten belegen, dass oricoEnv mit einem

kurzen C-terminalen Tag seine Funktionalität bezüglich Transport und Partikelinkorporation nicht einbüßte. Zudem konnte die Generierung zweifach markierter HERV-K(HML-2) Partikel bestätigt werden, welche sich für weiterführende, lichtmikroskopische Infektionsstudien hervorragend eignen (Melikyan et al., 2005; Campbell et al., 2006; Huang und Xie, 2014).

5 Zusammenfassung

Aufgrund der geringen Expression war das Studium des intrazellulären Transports von HERV-K(HML-2)-Proteinen und ihres Zusammenbaus zu viralen Partikeln bisher nicht möglich. Unbekannt waren deshalb auch die beteiligten Mechanismen. Die Klonierung eines Provirus mit revertierten, nicht-synonymen Mutationen und die Erhöhung der Expression ermöglichten die in dieser Arbeit auf Basis des HERV-K113-Elements erfolgten mikroskopischen Studien.

Für die lichtmikroskopische Darstellung des Polystrukturproteins Gag und des Hüllproteins Env wurden C-terminal markierte Konstrukte generiert. Es konnte gezeigt werden, dass fluoreszenzprotein-markiertes Gag nicht in der Lage ist zu viralen Partikeln zu assemblieren. Es treten aberrante Buddingstrukturen auf, die an der Zelloberfläche zu Plasmafortsätzen auswachsen. Um fluoreszenzmarkierte Partikel herzustellen ist ein Mischungsverhältnis von mindestens 1:5 mit nicht markiertem Gag nötig. Bei diesem Verhältnis wurden Partikel mit der erwarteten Morphologie generiert und deren Freisetzung und Reifung dokumentiert. Für gewöhnlich erfolgt die Freisetzung mit C-Typ-Morphologie. Eine starke Überexpression von Gag führte jedoch zur intrazellulären Akkumulation von unreifen Partikeln im Zytoplasma und somit zur A/B-Typ-Morphologie. Die Partikel lagern sich an die zytoplasmatische Seite von Plasmamembran und Vesikeln an. Bezüglich des intrazellulären Transports stand HERV-K113 Gag mit Kompartimenten des endosomalen Stoffwechselwegs im Zusammenhang. Dies und die kinetischen Analysen von mobilen, intrazellulären Gag-Akkumulationen legen die Schlussfolgerung nahe, dass, wie auch bei anderen Retroviren, der endosomale Stoffwechselweg in den Transport und die Regulation des Gag-Transports involviert ist. Dabei spielen späte Endosomen und Lysosomen eine besondere Rolle.

Eine signifikante Kollokalisierung von Gag und Env findet ausschließlich an der Plasmamembran statt und bestätigte damit die C-Typ-Assemblierung von HERV-K(HML-2). Durch eine verstärkte Expression von Env wurde zudem ein gesteigerter Einbau des C-terminal markierten Hüllproteins in virale Partikel erreicht. Das ermöglicht zusammen mit der Gag-Env-Zweifachmarkierung zukünftige, lichtmikroskopische Infektionsstudien mit HERV-K(HML-2).

Im Zuge der Arbeit wurden darüber hinaus zwei kleine, C-terminal im Gag gelegene Glutamin(Q)- und Prolin(P)-reiche Proteine (QP1 und QP2) entdeckt, die bis dato noch unbekannt waren. Mikroskopische Untersuchungen konnten eine Funktion in der späten Replikationsphase nicht belegen, bilden aber die Grundlage weiterführender Studien.

Conclusion

The pure expression of the HERV-K(HML-2) proteins obstructed up until now the study of the intracellular transport and assembly of viral particles. To gain insight into these mechanisms a HERV-K113 provirus was cloned containing revertive non-synonymous mutations. The resulting increase of viral protein expression allowed for the first time to study in detail the late phase of viral replication using microscopy.

For light microscopic representation of the polyprotein Gag and the envelope protein Env C-terminal labeled constructs were generated. It was shown, that fluorescence labeled Gag is not able to assemble to viral particles. Instead, aberrant budding structures were observed forming tubular plasma extensions at the cell surface. Our studies revealed, that the generation of fluorescent viral particles showing the common viral particle morphology was achieved, when mixing fluorescently labeled and non-labeled Gag proteins in a ratio of 1:5. These C-type particles were released and mature. However, a high level of Gag overexpression leads to an intracellular accumulation of immature particles in the cytoplasm of the transfected cells. These particles showing a A/B-type morphology accumulated at the cytoplasmic side of the plasma membrane and vesicles. Additionally, HERV-K113 Gag was associated with compartments of the endosomal metabolic pathway for intracellular transport. These localization patterns and the kinetic analysis of the mobile intracellular Gag fractions lead us to the conclusion, that the endosomal pathway is involved in the regulation of Gag transport where late endosomes and lysosomes playing a major role.

A significant colocalization of Gag and Env takes place exclusively at the plasma membrane confirming the C-Type assembly of HERV-K(HML-2). Through an intensified expression of Env, we were able to induce an increased incorporation of the C-terminal labeled envelope protein. In the future, this will allow together with a double labeling of Gag and Env infections studies of HERV-K(HML-2) via light microscopy.

Within the scope of these studies, we also identified two small, so far unknown glutamine (G) and proline (P) rich proteins (QP1 and QP2) located at the C-terminus of Gag. The microscopic studies could not identify a potential role in the late phase of viral replication. But these data will be the basis for further investigations in the future.

6 Literaturverzeichnis

- Accola MA, Hoglund S, Goettlinger HG** (1998) A putative alpha-helical structure which overlaps the capsid-p2 boundary in the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is crucial for viral particle assembly. *J. Virol.* 72, 2072–2078.
- Adamson CS, Jones IM** (2004) The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress. *Rev Med Virol.* 14:107–121.
- Aloia RC, Tian H, Jensen FC** (1993) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5181–5185.
- Alroy I, Tuvia S, Greener T, Gordon D, Barr HM, Taglicht D, Mandil-Levin R, Ben-Avraham D, Konforty D, Nir A, Levius O, Bicoviski V, Dori M, Cohen S, Yaar L, Erez O, Propheta-Meirani O, Koskas M, Caspi-Bachar E, Alchanati I, Sela-Brown A, Moskowitz H, Tessmer U, Schubert U, Reiss Y** (2005) The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1478–1483.
- Alves C, Dourado L** (2010) Endocrine and metabolic disorders in HTLV-1 infected patients. *Braz J Infect Dis.* 14(6):613-20. Review.
- Amit I, Yakir L, Katz M, Zwang Y, Marmor MD, Citri A, Shtiegman K, Alroy I, Tuvia S, Reiss Y, Roubini E, Cohen M, Wides R, Bacharach E, Schubert U, Yarden Y** (2004) Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev.* 18(14):1737-52.
- Andersson ML, Lindeskog M, Medstrand P, Westley B, May F, Blomberg J** (1999) Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *J Gen Virol.* 80 (Pt 1):255-60.
- Anitei M, Wassmer T, Stange C, Hoflack B** (2010) Bidirectional transport between the trans-Golgi network and the endosomal system. *Mol Membr Biol.* 27(8):443-56. Review.
- Antony JM, Deslauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C** (2011) Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochim Biophys Acta.* 1812(2):162-76. Review.
- Apte S, Sanders DA** (2010) Effects of retroviral envelope-protein cleavage upon trafficking, incorporation, and membrane fusion. *Virology.* 405(1):214-24.
- Ariën KK, Verhasselt B** (2008) HIV Nef: role in pathogenesis and viral fitness. *Curr HIV Res.* 6(3):200-8.
- 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. *Clin Cancer Res.* 8(6):1800-7.

- Armbruster V, Sauter M, Roemer K, Best B, Hahn S, Nty A, Schmid A, Philipp S, Mueller A, Mueller-Lantsch N** (2004) Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J Virol.* 78(19):10310-9.
- Arnaud F, Murcia PR, Palmarini M** (2007) Mechanisms of late restriction induced by an endogenous retrovirus. *J Virol.* 81(20):11441-51. Epub 2007 Aug 15.
- Arnaud F, Varela M, Spencer TE, Palmarini M** (2008) Coevolution of endogenous betaretroviruses of sheep and their host. *Cell Mol Life Sci.* 65(21):3422-32.
- Axelrod D** (1979) Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys J.* 26(3):557-573.
- Babst M** (2005) A protein's final ESCRT. *Traffic* 6,2-9.
- Bachand F, Yao XY, Hrimech M, Rougeau N, Cohen EA** (1999) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 Gag precursor. *J. Biol. Chem.* 274:9083-9091.
- Bagossi P, Bander P, Bozóki B, Tözsér J** (2009) Discovery and significance of new human T-lymphotropic viruses: HTLV-3 and HTLV-4. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 7(10):1235-49. Review.
- Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J** (2010) Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *Int Rev Immunol.* 29(4):351-70. Review.
- Baltimore D** (1975) Tumor viruses: 1974. *39:1187-1200.*
- Baluyot MF, Grosse SA, Lyddon TD, Janaka SK, Johnson MC** (2012) CRM1-Dependent Trafficking of Retroviral Gag Proteins Revisited. *J Virol.* 86(8): 4696-4700.
- Bannert N, Kurth R** (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 Suppl 2:14572-9. Review.
- Barbero P, Bittova L, Pfeffer SR** (2002) Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol.* 156(3):511-8.
- Barré-Sinoussi F, Chermann J C, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinét-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L** (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science.* 220:868-871.
- Basyuk E, Galli T, Mougél M, Blanchard JM, Sitbon M, Bertrand E** (2003) Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* 5:161-174.
- Beer C, Pedersen L, Wirth M** (2005) Amphotropic murine leukaemia virus envelope protein is associated with cholesterol-rich microdomains. *Virol J.* 2:36.

- Beimforde N, Hanke K, Ammar I, Kurth R, Bannert N** (2008) Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology*. 371(1):216-25.
- Bello NF, Dussupt V, Sette P, Rudd V, Nagashima K, Frederic Bibollet-Ruche F, Chen C, Montelaro RC, Hahn BH, Bouamr F** (2012) Budding of Retroviruses Utilizing Divergent L Domains Requires Nucleocapsid. *J Virol*. 86(8): 4182–4193.
- Berman PW, Nunes WM, Haffar O** (1988) Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type 1 in vitro and in continuous cell lines. *J Virol*. 62:3135–42.
- Bieda K, Hoffmann A, Boller K** (2001) Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol*. 82 (Pt 3):591-6.
- Bieniasz PD** (2006) Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344:55–63.
- Bittner JJ** (1936) Some possible effects of nursing on the mammary gland tumour incidence in mice. *Science*. 84:162–162.
- Blenis J, Resh MD** (1993). Subcellular localization specified by protein acylation and phosphorylation. *Curr. Opin. Cell Biol*. 5:984–989.
- Blond JL, Besème F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B, Mallet F** (1999) Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*. 73(2):1175-85.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL** (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. In: *J. Virol*. 74:3321–3329.
- Blot V, Lopez-Verges S, Breton M, Pique C, Berlioz-Torrent C, Grange MP** (2006) The conserved dileucine- and tyrosine-based motifs in MLV and MPMV envelope glycoproteins are both important to regulate a common Env intracellular trafficking. *Retrovirol*. 3:62.
- Blot V, Perugi F, Gay B, Prévost MC, Briant L, Tangy F, Abriel H, Staub O, Dokh lar MC, Pique C** (2004) Ned4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *J Cell Sci* 117: 2357–2367.
- Bock M, Stoye JP** (2000) Endogenous retroviruses and the human germline. *Curr Opin Genet Dev*. 10(6):651-5. Review.
- Bodem J, Schied T, Gabriel R, Rammling M, Rethwilm A** (2011) Foamy virus nuclear RNA export is distinct from that of other retroviruses. *J Virol*. 85(5):2333-41.

- Boenisch T** (2003) Handbuch: Immunchemische Färbemethoden. 3. Auflage. *DayoCytomation Cop.*
- Boeke JD, Corces VG** (1989) Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu Rev Microbiol.* 43:403-34.
- Boeke JD, Stoye JD** (1997) Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. , p. 343–436. *In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.*
- Boller K, Frank H, Löwer J, Löwer R, Kurth R** (1983). Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol.* 64, 2549–2559.
- Boller K, Janssen O, Schuldes H, Tönjes RR, Kurth R** (1997) Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol.* 71(6):4581-8.
- Boller K, Schonfeld K, Lischer S, Fischer N, Hoffmann A, Kurth R, Toenjes RR** (2008) Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol.* 89:567–572.
- Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, Gould SJ** (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol.* 172(6):923-35.
- Borel S, Espert L, Biard-Piechaczyk M** (2012) Macroautophagy Regulation during HIV-1 Infection of CD4+ T Cells and Macrophages. *Front Immunol.* 3:97.
- Bradac J, Hunter E** (1984) Polypeptides of Mason-Pfizer monkey virus. I. Synthesis and processing of the gag-gene products. *Virology.* 138(2):260-75.
- Brandenburg B, Zhuang X** (2007) Virus trafficking-learning from single-virus tracking. *Nature Rev. Microbiol.* 5:197-208.
- Briggs JA, Wilk T, Fuller SD** (2003) Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *J. Gen. Virol.* 84:757-768.
- Briggs JA, Kräusslich HG** (2011) The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol.* 410(4):491-500.
- Brown A** (2003) Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. *J Cell Biol.* 17;160(6):817-21.
- Brugger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Krausslich HG** (2006) The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(8):2641–6.
- Bryant M, Ratner L** (1990) Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:523–527.

- Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J** (2005) Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res.* 65(10):4172-80.
- Büscher K, Hahn S, Hofmann M, Trefzer U, Ozel M, Sterry W, Löwer J, Löwer R, Kurth R, Denner J** (2006) Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 16(3):223-34.
- Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, Stevenson M** (1993a) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature.* 365(6447):666-9.
- Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M** (1993b) Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(13):6125-9.
- Burnette WN** (1981) Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem. Bd.* 112(2): 195–203.
- Buzdin A, Ustyugova S, Khodosevich K, Mamedov I, Lebedev Y, Hunsmann G, Sverdlov E** (2003) Human-specific subfamilies of HERV-K (HML-2) long terminal repeats: three master genes were active simultaneously during branching of hominoid lineages. *Genomics.* 81(2):149-56.
- Callahan R, Drohan W, Tronick S, Schlom J** (1982) Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 79(18):5503-7.
- Campbell EM, Perez O, Melar M, Hope TJ** (2007) Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. *Virology.* 360(2):286-93.
- Campbell S, Fisher RJ, Towler EM, Fox S, Issaq HJ, Wolfe T, Phillips LR, Rein A** (2001) Modulation of HIV-like particle assembly in vitro by inositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19):10875-9.
- Carlemalm E, Villiger W, Hobot JA, Acetarin JD, Kellenberger E** (1985) Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. *J Microsc.* 140(Pt 1):55-63.
- Celma CC, Paladino MG, Gonzalez SA, Affranchino JL** (2007) Importance of the short cytoplasmic domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion activity and envelope glycoprotein incorporation into virions. *Virology* 366:405–414.

- Cereseto A, Mulloy JC, Franchini G** (1996) Insights on the pathogenicity of human T-lymphotropic/leukemia virus types I and II. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 Suppl 1:69-75. Review.
- Chan J, Dick RA, Vogt VM** (2011) Rous Sarcoma Virus Gag has no specific requirement for Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate for plasma membrane association *in vivo* or for liposome interaction *in vitro*. *J Virol.* 85(20): 10851–10860.
- Chan R, Uchil PD, Jin J, Shui G, Ott DE, Mothes W, Wenk MR** (2008) Retroviruses human immunodeficiency virus and murine leukemia virus are enriched in phosphoinositides. *J Virol.* 82(22):11228–38.
- Chang MHY, Karageorgos LE und Meikle PJ** (2002) CD107a (Lamp-1) and CD107b (Lamp-2). *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 16:147-151.
- Chang YF, Wang SM, Huang KJ, Wang CT** (2007) Mutations in capsid major homology region affect assembly and membrane affinity of HIV-1 Gag. *J. Mol. Biol.* 370, 585–597.
- Charoenthongtrakul S, Zhou Q, Shembade N, Harhaj NS, Harhaj EW** (2011) Human T cell leukemia virus type 1 Tax inhibits innate antiviral signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS1. *J Virol.* 85(14):6955-62.
- Chazal N, Gerlier D** (2003) Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(2): 226–237.
- Checkley MA, Lutttge BG, Freed EO** (2011) HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol.* 410(4):582-608. Review.
- Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Barsov E, Hood BL, Fisher RJ, Nagashima K, Conrads TP, Veenstra TD, Lifson JD, Ott DE** (2006) Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol.* 80(18):9039-52.
- Chen C, Okayama H** (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques.* 6(7):632-8.
- Chojnacki J, Müller B** (2013) Investigation of HIV-1 assembly and release using modern fluorescence imaging techniques. *Traffic.* 14(1):15-24.
- 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.
- Clarke AR** (2006) Cytosolic chaperonins: a question of promiscuity. *Mol Cell.* 24(2):165-7. Review.

- Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M** (1986) Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*. 324(6098):691-5.
- Coffin JM, Hughes HS, Varmus HE** (1997) Book: *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Coiras M, López-Huertas MR, Sánchez del Cojo M, Mateos E, Alcamí J** (2010) Dual role of host cell factors in HIV-1 replication: restriction and enhancement of the viral cycle. *AIDS Rev*. 12(2):103-12. Review.
- Collinet C, Stöter M, Bradshaw CR, Samusik N, Rink JC, Kenski D, Habermann B, Buchholz F, Henschel R, Mueller MS, Nagel WE, Fava E, Kalaidzidis Y, Zerial M** (2010) Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature*. 464(7286):243-9.
- Côté M, Zheng YM, Albritton LM, Liu SL** (2008) Fusogenicity of Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is dependent on low pH and is enhanced by cytoplasmic tail truncations. *J Virol*. 82(5):2543-54.
- Crawford LV, Crawford EM** (1961) The properties of Rous sarcoma virus purified by density gradient centrifugation. *Virology*. 13:227-232.
- Cullen BR** (2003) Nuclear RNA export. *J. Cell Sci*. 116:587–597. Review.
- Cullen BR** (2002) Using retroviruses to study the nuclear export of mRNA. *Results Probl. Cell Differ*. 35:151–168. Review.
- Dale BM, McNERNEY GP, Hübner W, Huser TR, Chen BK** (2011) Tracking and quantitation of fluorescent HIV during cell-to-cell transmission. *Methods*. 53(1):20-6.
- Das SR, Jameel S** (2005) Biology of the HIV Nef protein. *Indian J. Med. Res*. 121(4):315-32.
- De Guzman RN, Wu ZR, Stalling CC, Pappalardo L, Borer PN, Summers MF** (1998) Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* 279:384–388.
- Deininger PL, Batzer MA** (2002) Mammalian retroelements. *Genome Res*. 12(10):1455-65. Review.
- Demirov DG, Freed EO** (2004) Retrovirus budding. *Virus Res*. 106(2):87-102. Review.
- Dewannieux M, Blaise S, Heidmann T** (2005) Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *J. Virol*. 79:15573–15577.
- 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 Res*. 16:1548–1556.

- Dinh AT, Theofanous T, Mitragotri S** (2005) A model for intracellular trafficking of adenoviral vectors. *Biophys J.* 89(3):1574-88.
- Doms RW, Earl PL, Chakrabarti S, Moss B** (1990) Human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus env proteins possess a functionally conserved assembly domain. *J Virol.* 64(7):3537-40.
- Doms RW, Lamb RA, Rose JK, Helenius A** (1993) Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology.* 193:545-562.
- Dong X, Li H, Derdowski A, Ding L, Burnett A, Chen X, Peters TR, Dermody TS, Woodruff E, Wang JJ, Spearman P** (2005) AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell.* 120(5):663-74.
- Dorweiler IJ, Ruone SJ, Wang H, Burry RW, Mansky LM** (2006) Role of the human T-cell leukemia virus type 1 PTAP motif in Gag targeting and particle release. *J Virol.* 80:3634–3643.
- Dubay JW, Roberts SJ, Hahn BH, Hunter E** (1992) Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J Virol.* 66(11):6616-25.
- Dussupt V, Sette P, Bello NF, Javid MP, Nagashima K, Bouamr F** (2011) Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *J Virol.* 85(5):2304-15.
- Earl PL, Doms RW, Moss B** (1990) Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:648–52.
- Earl PL, Koenig S, Moss B** (1991) Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol.* 65:31–41.
- Egan MA, Carruth LM, Rowell JF, Yu X, Siliciano RF** (1996) Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J Virol.* 70:6547–56.
- Ellermann V, Bang O** (1908) Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46:595–609.
- Enomoto K, Gill DM** (1980) Cholera toxin activation of adenylate cyclase. Roles of nucleoside triphosphates and a macromolecular factor in the ADP ribosylation of the GTP-dependent regulatory component. *J Biol Chem.* 255(4):1252-8.

- Erlwein O, Buchholz CJ, Schnierle BS** (2003) The proline-rich region of the ecotropic Moloney murine leukaemia virus envelope protein tolerates the insertion of the green fluorescent protein and allows the generation of replication-competent virus. *J Gen Virol.* 84(Pt 2):369-73.
- Espert L, Biard-Piechaczyk M** (2009) Autophagy in HIV-induced T cell death. *Curr Top Microbiol Immunol.* 335:307-21. Review.
- Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M** (2007) Autophagy and CD4+ T lymphocyte destruction by HIV-1. *Autophagy.* 3(1):32-4. Review.
- Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M** (2006) Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest.* 116(8):2161-72.
- Fackler OT, Wolf D, Weber HO, Laffert B, D'Aloia P, Schuler-Thurner B, Geffin R, Saksela K, Geyer M, Peterlin BM, Schuler G, Baur AS** (2001) A natural variability in the prolin-rich motif of Nef modulates HIV-1 replication in primary T cells. *Curr Biol.* 11(16):1294-9.
- Felts RL, Narayan K, Estes JD, Shi D, Trubey CM, Fu J, Hartnell LM, Ruthel GT, Schneider DK, Nagashima K, Bess JW Jr, Bavari S, Lowekamp BC, Bliss D, Lifson JD, Subramaniam S** (2010) 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(30):13336-41.
- Fiebig U, Hartmann MG, Bannert N, Kurth R, Denner J** (2006) Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J. Virol.* 80:5651–5654.
- Fine D, Schochetman G** (1978) Type D primate retroviruses: A review. *Cancer Res.* 38, 3123-3139.
- Fledderman EL, Fujii K, Ghanam RH, Waki K, Prevelige PE, Freed EO, Saad JS** (2010) Myristate exposure in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is modulated by pH. *Biochemistry.* 49(44):9551-62.
- Flores-Rodriguez N, Rogers SS, Kenwright DA, Waigh TA, Woodman PG, Allan VJ** (2011) Roles of Dynein and Dynactin in Early Endosome Dynamics Revealed Using Automated Tracking and Global Analysis. *PLoS One.* 6(9): e24479.
- Fogarty KH, Zhang W, Grigsby IF, Johnson JL, Chen Y, Mueller JD, Mansky LM** (2011) New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses.* 3(6):770-93. Review.
- Frank GA, Bartesaghi A, Kuybeda O, Borgnia MJ, White TA, Sapiro G, Subramaniam S** (2012) Computational separation of conformational heterogeneity using cryo-electron tomography and 3D sub-volume averaging. *J Struct Biol.* 178(2):165-76.

- Franke EK, Yuan HE, Luban J** (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*. 372(6504):359-62.
- Freed EO** (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 251:1-15. Review.
- Freed EO** (2001) HIV-Replication. *Somat Cell Mol Genet*. 26(1-6):13-33. Review.
- Freed EO** (2002) Viral Late Domains. *J Virol*. 76(10):4679-87.
- Freed EO, Martin MA** (1995) Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol*. 69: 1984–1989.
- Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument-Bromage H, Wall JS, Tempst P, Hartl FU** (1992) Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J*. 11(13):4767-78.
- Fukuda M** (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem*. 266:21327-30
- Furuta K, Yang XL, Chen JS, Hamilton SR und August JT** (1999) Differential expression of the lysosome-associated membrane proteins in normal human tissues. *Arch. Biochem. Biophys*. 365:75-82.
- Gallay P, Swingler S, Aiken C, Trono D** (1995) HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell*. 80(3):379-88.
- Galli UM, Sauter M, Lecher B, Maurer S, Herbst H, Roemer K, Mueller-Lantzsch N** (2005) Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene* 24(19), 3223-8.
- Gallo RC** (2005) The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2:17.
- Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler, UK, Worthylake DK, Wang H, McCutcheon JP, Sundquist WI, Hill CP** (1997) Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278: 849–853.
- Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI** (2008) The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*. 18(2):203-17. Review.
- Garg H, Mohl J, Joshi A** (2012) HIV-1 induced bystander apoptosis. *Viruses*. 4(11):3020-43. Review.

- Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI** (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*. 107(1):55-65.
- Gebhardt A, Bosch JV, Ziemiecki A, Friis RR** (1984) Rous sarcoma virus p19 and gp35 can be chemically crosslinked to high molecular weight complexes. An insight into virus assembly. *J. Mol. Biol.* 174, 297–317.
- Gelderblom HR, Oezel M, Pauli G** (1985). T-Zell-spezifische Retroviren des Menschen: Vergleichende morphologische Klassifizierung und mögliche funktionelle Aspekte. *Bundesgesundheitsblatt* 28: 161-171.
- Gelderblom HR** (1996) Structure and Classification of Viruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 41.
- 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.
- Gessain A, de Thé G** (1996) What is the situation of human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 Suppl 1: S228-35.
- Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, De Wilde M** (1989) Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. 59(1):103-12.
- Gifford RJ** (2006) Evolution at the host-retrovirus interface. *Bioassays*. 28(12):1153-6.
- Gifford R, Tristem M** (2003) The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 26 (3), 291–315.
- Gladnikoff M, Rousso I** (2008) Directly monitoring individual retrovirus budding events using atomic force microscopy. *Biophys J*. 94(1):320-6.
- Grigorov B, Decimo D, Smagulova F, Pechoux C, Mougél M, Muriaux D, Darlix JL** (2007) Intracellular HIV-1 Gag localization is impaired by mutations in the nucleocapsid zinc fingers. *Retrovirology* 4, 54.
- Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S, Sundquist WI** (1996) Structure of the aminoterminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 273, 231–235.
- Goff A, Ehrlich LS, Cohen SN, Carter CA** (2003) Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release. *J Virol.* 77:9173–9182.
- Gomez CY, Hope TJ** (2006) Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells. *J Virol.* 80(17): 8796–8806.

- Göttlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA** (1991) Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3195–3199.
- Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA** (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(15):5781-5.
- Gottwein E, Bodem J, Muller B, Schmechel A, Zentgraf H, Kraeusslich HG** (2003) The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release. *J. Virol.* 77, 9474–9485.
- Götzinger N, Sauter M, Roemer K, Mueller-Lantzsch N** (1996) Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours. *J Gen Virol.* 77 (Pt 12):2983-90.
- Gougeon ML, Piacentini M** (2009) New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis.* 14(4):501-8. Review.
- Griffin BA, Adams SR, Tsien RY** (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science.* 281(5374):269-72.
- Gross L** (1980) *Oncogenic viruses.* Third edition. Oxford, Pergamon.
- Haffar O, Dowbenko DJ, Berman PW** (1988) Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *J Cell Biol.* 107:1677-87.
- Hamard-Peron E, Muriaux D** (2011) Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. *Retrovirology.* 7;8:15. Review.
- Hammarstedt M, Garoff H** (2004) Passive and active inclusion of host proteins in human immunodeficiency virus type 1 gag particles during budding at the plasma membrane. *J Virol.* 78(11):5686–5697.
- Hammarstedt M, Wallengren K, Pedersen KW, Roos N, Garoff H** (2000) Minimal exclusion of plasma membrane proteins during retroviral envelope formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(13):7527–7532.
- Hanke K, Hohn O, Liedgens L, Fiddeke 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. *J Virol.* 87(20): 11019-11030.
- Hanke K, Kramer P, Seeher S, Beimforde N, Kurth R, Bannert N** (2009) Reconstitution of the ancestral glycoprotein of human endogenous retrovirus k and modulation of its functional activity by truncation of the cytoplasmic domain. *J Virol.* 83(24):12790-800.
- Hao M, Lin SX, Karylowski OJ, Wustner D, McGraw TE, Maxfield FR** (2002) Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem.* 277(1):609–17.

- He J, Choe S, Walker R, Di MP, Morgan DO, Landau NR** (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J. Virol.* 69:6705–6711.
- Hearps AC, Jans DA** (2007) Regulating the functions of the HIV-1 matrix protein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 341–346.
- Heidecker G, Lloyd PA, Fox K, Nagashima K, Derse D** (2004) Late assembly motifs of human T-cell leukemia virus type 1 and their relative roles in particle release. *J Virol.* 78(12):6636-48.
- Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M** (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:7311-7315.
- Helma J, Schmidthals K, Lux V, Nüske S, Scholz AM, Kräusslich HG, Rothbauer U, Leonhardt H** (2012) Direct and dynamic detection of HIV-1 in living cells. *PLoS One.* 7(11):e50026.
- Henderson LE, Sowder R, Smythers G, Benveniste RE, Oroszlan S** (1985) Purification and N-terminal amino acid sequence comparisons of structural proteins from retrovirus-D/Washington and Mason-Pfizer monkey virus. *J Virol.* 55(3):778-87.
- Herniou E, Martin J, Miller K, Cook J, Wilkinson M, Tristem M** (1998) Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* 72:5955–5966.
- Heslin DJ, Murcia P, Arnaud F, Van Doorslaer K, Palmarini M, Lenz J** (2009) A single amino acid substitution in a segment of the CA protein within Gag that has similarity to human immunodeficiency virus type 1 blocks infectivity of a human endogenous retrovirus K provirus in the human genome. *J Virol.* 83, 1105–1114.
- Hizi A, Henderson LE, Copeland TD, Sowder RC, Krutzsch HC, Oroszlan S** (1989) Analysis of gag proteins from mouse mammary tumor virus. *J Virol.* 63(6):2543-9.
- Hofmann H, Hattermann K, Marzi A, Gramberg T, Geier M, Krumbiegel M, Kuate S, Uberla K, Niedrig M, Pöhlmann S** (2004) S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients. *J Virol.* 78(12):6134-42.
- Hogue IB, Grover JR, Soheilian F, Nagashima K, Ono A** (2011) Gag Induces the Coalescence of Clustered Lipid Rafts and Tetraspanin-Enriched Microdomains at HIV-1 Assembly Sites on the Plasma Membrane. *J Virol.* 85(19): 9749–9766.
- Hohn O, Hanke K, Lausch V, Zimmermann A, Mostafa S, Bannert N** (2014) Codon optimized protein expression renders the assembly type and morphology of a reconstituted HERV-K(HML-2). (*in Arbeit*)

- Hollinshead M, Rodger G, Van Eijl H, Law M, Hollinshead R, Vaux DJ, Smith GL** (2001) Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *J Cell Biol.* 154(2):389-402.
- Hong S, Choi G, Park S, Chung AS, Hunter E, Rhee SS** (2001) Type D retrovirus Gag polyprotein interacts with the cytosolic chaperonin TRiC. *J Virol.* 75(6):2526-34.
- Honig MG, Hume RI** (1986) Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol.* 103(1):171-87.
- Hornick CA, Hui DY, DeLamatre JG** (1997) A role for retosomes in intracellular cholesterol transport from endosomes to the plasma membrane. *Am J Physiol.* 273:C1075-C1081.
- Houzet L, Gay B, Morichaud Z, Briant L, Mougél M** (2006) Intracellular assembly and budding of the Murine Leukemia Virus in infected cells. *Retrovirology.* 3:12.
- Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Grønberg M, Möbius W, Rhee J, Barr FA, Simons M** (2010) Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol.* 189(2):223-32.
- Huang LL, Xia HY** (2014) Progress on the labeling and single-particle tracking technologie of viruses. *Analyst.* 139(13):3336-46.
- Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO** (1995) p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* 69:6810-6818.
- Hübner W, Chen P, Del Portillo A, Liu Y, Gordon RE, Chen BK** (2007) Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1. *J Virol.* 81(22):12596-607.
- Hunter E, Swanstrom R** (1990) Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 157:187-253.
- Huotari J, Helenius A** (2011) Endosome maturation. *EMBO J.* 30(17):3481-500. Review.
- Ikonen E** (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 13(4):470-7. Review.
- Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, Kräusslich HG, Eils R, Rohr K, Bräuchle C, Müller B, Lamb DC** (2009) Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.* 5(11):e1000652.
- Jackson WT, Giddings TH Jr, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, Kirkegaard K** (2005) Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3(5):e156.

- Jern P, Sperber GO, Blomberg J** (2005) Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy. *Retrovirology*. 2:50.
- Johnson MC, Scobie HM, Ma YM, Vogt VM** (2002) Nucleic Acid-Independent Retrovirus Assembly Can Be Driven by Dimerization. *J Virol*. 76(22): 11177-11185.
- Johnson WE, Coffin JM** (1999) Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:10254-10260.
- Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neefjes J** (2005) Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic*. 6(12):1070-7. Review.
- Jouvenet N, Neil SJD, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD** (2006) Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol*. 4(12):e435.
- Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM** (2008) Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature*. 454(7201):236-40.
- Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD** (2009) Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(45):19114-9.
- Ju G, Skalka AM** (1980) Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat (LTR) of avian retroviruses: structural similarities with transposable elements. *Cell*. 22(2 Pt 2):379-86.
- Jun S, Ke D, Debiec K, Zhao G, Meng X, Ambrose Z, Gibson GA, Watkins SC, Zhang P** (2011) Direct visualization of HIV-1 with correlative live-cell microscopy and cryo-electron tomography. *Structure*. 19(11):1573-81.
- Kaasik A, Safiulina D, Choubey V, Kuum M, Zharkovsky A, Veksler V** (2007) Mitochondrial swelling impairs the transport of organelles in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*. 282(45):32821-6.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T** (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing, *EMBO J*. 19, 5720–5728.
- Kaemmerer U, Germeyer A, Stengel S, Kapp M, Denner J** (2011) Human endogenous retrovirus K (HERV-K) is expressed in villous and extravillous cytotrophoblast cells of the human placenta. *J Reprod Immunol*. 91(1-2):1-8.
- Kanzaki I, Setoyama M, Katahira Y** (1996) Human T lymphotropic virus-1 infection. *Australas J Dermatol*. 37 Suppl 1:S20-2.
- Katzmann DJ, Babst M, Emr SD** (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106: 145–155.

- Katzmann DJ, Odorizzi G, and Emr SD** (2002). Receptor down regulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893–905.
- Katzourakis A, Tristem M, Pybus OG, Gifford RJ** (2007) Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*104(15):6261-5.
- Kazanji M, Gessain A** (2003) Human T-cell Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. *Cad Saude Publica.* 19(5):1227-40.
- Kerppola TK** (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys.* 37:465-87. Review.
- Kerppola TK** (2009) Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev.* 38(10):2876-86. Review.
- Kim SE, Liu F, Im YJ, Stephen AG, Fivash MJ, Waheed AA, Freed EO, Fisher RJ, Hurley JH, Burke TR Jr.** (2011) Elucidation of New Binding Interactions with the Tumor Susceptibility Gene 101 (Tsg101) Protein Using Modified HIV-1 Gag-p6 Derived Peptide Ligands. *ACS Med Chem Lett.* 12;2(5):337-341.
- Knippe DM, Howley PM, Griffin DE** (2006) *Fields Virology.* (2.Vol.) Lippincott Williams & Wilkins.
- Kobinger GP, Deng S, Louboutin JP, Vatamaniuk M, Matschinsky F, Markmann JF, Raper SE, Wilson JM** (2004) Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 15(2):211-9.
- Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, Wilson JM** (2001) Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol.* 19(3):225–230.
- Kogan M, Rappaport J** (2011) HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology.* 13;8:25. Review.
- Kohoutová Z, Rumlová M, Andreánsky M, Sakalian M, Hunter E, Pichová I, Ruml T** (2009) The impact of altered polyprotein ratios on the assembly and infectivity of Mason-Pfizer monkey virus. *Virology.* 384(1):59-68.
- Kramer B, Pelchen-Matthews A, Deneka M, Garcia E, Piguet V, Marsh M** (2005) HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis.* 35:136–142.
- Kräusslich HG, Facke M, Heuser AM, Konvalinka J, Zentgraf H** (1995) The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J. Virol.* 69, 3407–3419.

- Kraus B, Boller K, Reuter A, Schnierle BS** (2011) Characterization of the human endogenous retrovirus K Gag protein: identification of protease cleavage sites. *Retrovirology*. 8:21.
- Krone B, Grange JM** (2010) Melanoma, Darwinian medicine and the inner world. *J Cancer Res Clin Oncol*. 136(12):1787-94. Review.
- Kubota S, Kubota H, Nagata K** (2006) Cytosolic chaperonin protects folding intermediates of Gbeta from aggregation by recognizing hydrophobic beta-strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(22):8360-5.
- Kuff EL, Lueders KK** (1988) The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv. Cancer Res*. 51:183-276.
- Kuma A, Matsui M, Mizushima N** (2007) LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy. *Autophagy* 3:4, 323-328.
- Kurth R, Bannert N** (2010) *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis*. Caister Academic Press.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, S. 680–685.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X** (2003) Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(16): 9280–9285.
- Lammers M, Neumann H, Chin JW, James LC** (2010) Acetylation regulates cyclophilin A catalysis, immunosuppression and HIV isomerization. *Nat Chem Biol*. 6(5):331-7.
- Lampe M, Briggs JA, Endress T, Glass B, Riegelsberger S, Kräusslich HG, Lamb DC, Bräuchle C, Müller B** (2007) Double-labeled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction. *Virology*. 30;360(1):92-104.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al.** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822): 860-921.
- Landi A, Iannucci V, Nuffel AV, Meuwissen P, Verhaselt B** (2011) One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef. *Cur HIV Res*. 9(7):496-504.
- Larson DR, Johnson MC, Webb WW, Vogt VM** (2005) Visualization of retrovirus budding with correlated light and electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(43):15453-8.
- Larson DR, Ma YM, Vogt VM, Webb WW** (2003) Direct measurement of Gag-Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy. *J Cell Biol*.162(7):1233-44.

- Lasek RJ, Garner JA, Brady ST** (1984) Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol.* 99(1 Pt 2):212s-221s. Review.
- Laugette N, Brégnard C, Benichou S, Basmaciogullari S** (2010) Human immunodeficiency virus (HIV) type-1; HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med.* 31(5):418-33.
- Le Blanc I, Prevost MC, Dokhelar MC, Rosenberg AR** (2002) The PPPY motif of human T-cell leukemia virus type 1 Gag protein is required early in the budding process. *J. Virol.* 76, 10024–10029.
- Leboyer M, Tamouza R, Charron D, Faucard R, Perron H** (2011) Human endogenous retrovirus type W (HERV-W) in schizophrenia: A new avenue of research at the gene-environment interface. *World J Biol Psychiatry.* 22.
- Lee GE, Murray JW, Wolkoff AW, Wilson DW** (2006) Reconstitution of herpes simplex virus microtubule-dependent trafficking in vitro. *J Virol.* 80(9):4264-75.
- Lee YN, Bieniasz PD** (2007) Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog.* 3(1):e10.
- Lehmann M, Milev MP, Abrahamyan L, Yao XJ, Pante N, Mouland AJ** (2009) Intracellular transport of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and viral production are dependent on dynein motor function and late endosome positioning. *J Biol Chem.* 284(21):14572-85.
- Leis J, Baltimore D, Bishop JM, Coffin J, Fleissner E, Goff SP, Oroszlan S, Robinson H, Skalka AM, Temin HM, et al.** (1988) Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol.* 62(5):1808-9.
- Lindwasser OW, Resh MD** (2001) Multimerization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Promotes Its Localization to Barges, Raft-Like Membrane Microdomains. *J Virol.* 75(17): 7913–7924.
- Liscum L, Munn NJ** (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 1438:19-37.
- Liu SL, Halbert CL, Miller AD** (2004) Jaagsiekte sheep retrovirus envelope efficiently pseudotypes human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors. *J Virol.* 78(5):2642–2647.
- Löwer R, Böller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R** (1993) Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4480-4484.
- Löwer R, Löwer J, Frank H, Harzmann R, Kurth R** (1984) Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J. Gen. Virol.* 65(5): 887–898.

- Löwer R, Löwer J, Kurth R** (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(11):5177-5184.
- Luby-Phelps K** (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol*. 192:189-221. Review.
- Lucas TM, Lyddon TD, Cannon PM, Johnson MC** (2010) Pseudotyping incompatibility between HIV-1 and gibbon ape leukemia virus Env is modulated by Vpu. *J Virol*. 84(6):2666-74.
- Luft JH** (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol*. 9:409-14.
- Luttmann W, Bratke K, Kuepper M, Myrtek D** (2006) *Der Experimentator: Immunologie*. 2. Auflage. Elsevier: Spektrum Akademischer Verlag.
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA** (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(8):622-32. Review.
- Ma YM, Vogt VM** (2004) Nucleic acid binding induced Gag dimerization in the assembly of Rous sarcoma virus particles in vitro. *J. Virol*. 78, 52–60.
- Macfarlane C, Simmonds P** (2004) Allelic variation of HERV-K(HML-2) endogenous retroviral elements in human populations. *J Mol Evol*. 59(5):642-56.
- Madela K, Banhart S, Zimmermann A, Piesker J, Bannert N, Laue M** (2014) A Simple Procedure to Analyze Positions of Interest in Infectious Cell Cultures by Correlative Light and Electron Microscopy. In: Müller-Reichert T, Verkade P. Correlative light and electron microscopy. Vol.2. Chapter 5. (*in Druck*)
- Mager DL, Patrik M** (2003) Retroviral repeat sequences. In: Cooper, D.N. (Ed.), *Nature Encyclopedia of the Human Genome*. Nature Pub. Group, London; New York. 5 vols.
- Magin C, Lower R, Lower J** (1999) cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J Virol*. 73:9496-9507.
- Magin-Lachmann C, Hahn S, Strobel H, Held U, Loewer J, Loewer R** (2001) Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. *J Virol*. 75(21):10359-71.
- Malassiné A, Blaise S, Handschuh K, Lalucque H, Dupressoir A, Evain-Brion D, Heidmann T** (2007) Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta*. 28(2-3):185-91.
- Malim MH, Bieniasz PD** (2012) HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(5):a006940.

- Martin D, Gutkind JS** (2008) Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene*. 27 Suppl 2:31-42. Review.
- Martin-Serrano J, Neil SJ** (2011) Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat Rev Microbiol*. 9(7):519-31.
- Mayer BJ** (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci*.144(Pt7):1253-63.
- Mayer J, Ehlhardt S, Seifert M, Sauter M, Muller-Lantzsch N, Mehraein Y, Zang KD, Meese E** (2004) Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. *Virology*. 322:190-198.
- Medstrand P, Blomberg J** (1993) Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J Virol*. 67(11):6778-87.
- Melikyan GB, Barnard RJ, Abrahamyan LG, Mothes W, Young JA** (2005) Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(24):8728-33.
- Mellman I** (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 12:575-625. Review.
- Merritt EA, Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Hol WG** (1994) Galactose-binding site in Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Mol Microbiol*. 13(4):745-53.
- Mertz JA, Lozano MM, Dudley JP** (2009) Rev and Rex proteins of human complex retroviruses function with the MMTV Rem-responsive element. *Retrovirology*. 3;6:10.
- Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM** (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 403(6771):785-9.
- Milev MP, Brown CM, Mouland AJ** (2010) Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1. *Retrovirology*. 7:41.
- Mizushima N** (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:2491-502.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T** (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*. 27:421-9.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y** (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 15:1101-11.

- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J** (1998) High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol.* 72(11):8873–8883.
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schaetzel H** (2009) Retroviren, In: *Molekulare Virologie.* (3. Auflage) Spektrum Akademischer Verlag GmbH, S. 409-459.
- Molinari M** (2002) Folding of viral glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Virus Res.* 82:83-86.
- Molle D, Segura-Morales C, Camus G, Berlioz-Torrent C, Kjems J, Basyuk E, Bertrand E** (2009) Endosomal trafficking of HIV-1 gag and genomic RNAs regulates viral egress. *J Biol Chem.* 284(29):19727-43.
- Morton CJ, Campbell ID** (1994) SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr Biol.* 4(7):615-7.
- Moyes DL, Martin A, Sawcer S, Temperton N, Worthington J, Griffiths DJ, Venables PJ** (2005) The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease. *Genomics.* 86(3):337-41.
- Mukherjee S, Zha X, Tabas I, Maxfield FR** (1998) Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys J.* 75:1915-1925.
- Müller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Kräusslich HG** (2004) Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J Virol.* 78(19):10803-13.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn G, Erlich HA** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*;51 Pt 1:263-73.
- Muradrasoli S, Forsman A, Hu L, Blikstad V, Blomberg J** (2006) Development of real-time PCRs for detection and quantitation of human MMTV-like (HML) sequences HML expression in human tissues. *J Virol Methods.* 136(1-2):83-92.
- Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, Foedinger D, Seppel H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Loewer R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K** (2003) An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res.* 2003 Dec 15;63(24):8735-41.
- Mylonas I, Bruening A, Kainer F, Friese K** (2010) HTLV infection and its implication in gynaecology and obstetrics. *Arch Gynecol Obstet.* 282(5):493-501. Review.
- Naghavi MH, Goff SP** (2007) Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Curr Opin Immunol.* 19(4):402-7. Review.
- Naito S, Matsumoto S** (1978) Identification of cellular actin within the rabies virus. *Virology.* 91(1):151-63.

- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y** (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165-178.
- Nermut MV, Bron P, Thomas D, Rumlova M, Ruml T, Hunter E** (2002) Molecular organization of Mason-Pfizer monkey virus capsids assembled from Gag polyprotein in *Escherichia coli*. *J Virol.* 76(9):4321-30.
- Nermut MV, Hockley DJ** (1996) Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 214:1-24.
- Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD** (2006) HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog.* 2(5):e39.
- Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE** (2003) Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem.* 278(52):52347-54.
- Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N** (2009) Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Lett.* 583(8):1243-50.
- Niyogi K, Hildreth JE** (2001) Characterization of new syncytium-inhibiting monoclonal antibodies implicates lipid rafts in human T-cell leukemia virus type 1 syncytium formation. *J Virol.* 75(16):7351–7361.
- Nydegger S, Foti M, Derdowski A, Spearman P, Thali M** (2003) HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic.* 4:902–910.
- Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO** (2004) Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(41):14889-94.
- Ono A, Freed EO** (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:13925-13930
- Ono A, Freed EO** (2004) Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol.* 78:1552–1563.
- Ono A, Freed EO** (2005) The role of lipid rafts in enveloped virus replication. *Adv Virus Res.* 64:311-58.
- Ono A** (2009) HIV-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization. *Future Virol.* 4(3):241-257.
- Ono A** (2010) Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol Cell.* 102(6): 335–350.

- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C** (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 12(1):19-30; sup pp 1-13.
- Ott DE, Coren LV, Shatzer T** (2009) The nucleocapsid region of human immunodeficiency virus type 1 Gag assists in the coordination of assembly and Gag processing: role for RNA-Gag binding in the early stages of assembly. *J Virol.* 83(15):7718-27.
- Oezel M, Pauli G, Gelderblom HR** (1988). The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch Virol.* 100:255-266.
- Paillart JC, Göttinger HG** (1999) Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J Virol.* 73(4):2604-12.
- Parent LJ, Bennett RP, Craven RC, Nelle TD, Krishna NK, Bowzard JB, Wilson CB, Puffer BA, Montelaro RC, Wills JW** (1995) Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol.* 69(9):5455-60.
- Parton RG, Richards AA** (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic.* 4: 724-738.
- Pawson T, Schlessingert J** (1993) SH2 and SH3 domains. *Curr Biol.*3(7):434-42.
- Paxton W, Connor RI, Landau NR** (1993) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of *gag* and mutational analysis. *J Virol.* 67:7229–7237.
- Pédelacq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS** (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 24(1):79-88.
- Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M** (2003) Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol.* 162:443–455.
- Perez LG, Davis GL, Hunter E** (1987) Mutants of the Rous sarcoma virus envelope glycoprotein that lack the transmembrane anchor and cytoplasmic domains: analysis of intracellular transport and assembly into virions. *J. Virol.* 61, 2981–2988.
- Perlman M, Resh MD** (2006) Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic.* 7(6):731-45.
- Pfeffer SR, Rothman JE** (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem.* 56:829–852.

- Pickl WF, Pimentel-Muñoz FX, Seed B** (2001) Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol.* 75(15):7175-83.
- Pinter A, Honnen WJ, Tilley SA, Bona C, Zaghouani H, Gorny MK, Zolla-Pazner S** (1989) Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 63:2674–9.
- Piper RC, Katzmann DJ** (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:519-47. Review.
- Piper RC, Luzio JP** (2007) Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 19(4):459-65. Review.
- Poetgens AJ, Drewlo S, Kokozidou M, Kaufmann P** (2004) Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Hum Reprod Update.* 10(6):487-96. Review.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC** (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77: 7415–7419.
- Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He GP, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI** (2003) HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol.* 162(3):425-34.
- Puffer BA, Parent LJ, Wills JW, Montelaro RC** (1997) Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J Virol.* 71(9):6541-6.
- Quigley JP, Rifkin DB, Reich R** (1971) Phospholipid composition of Rous sarcoma virus, host cell membranes and other enveloped RNA viruses. *Virology.* 46:106–116.
- Radestock B, Morales I, Rahman SA, Radau S, Glass B, Zahedi RP, Müller B, Kräusslich HG** (2013) Comprehensive mutational analysis reveals p6Gag phosphorylation to be dispensable for HIV-1 morphogenesis and replication. *J Virol.* 87(2):724-34.
- Raiborg C, Stenmark H** (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 458(7237):445-52. Review.
- Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H** (2002) Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic.* 3(10):718-29.
- Reed R** (2003) Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr Opin Cell Biol.* 15:326–331.
- Reggiori F, Pelham HR** (2002) A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol.* 4(2):117-23.

- Regmi CK, Bhandari YR, Gerstman BS, Chapagain PP** (2013) Exploring the Diffusion of Molecular Oxygen in the Red Fluorescent Protein mCherry Using Explicit Oxygen Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*. 117(8):2247-53.
- Reid BG, Flynn GC** (1997) Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*. 36(22):6786-91.
- Reil H, Bukovsky AA, Gelderblom HR, Gottlinger HG** (1998) Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J*. 17(9):2699–2708.
- Rein A** (1994) Retroviral RNA packaging: a review. *Arch Virol Suppl*. 9:513-22. Review.
- Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M** (1996) Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(26):15266–15271.
- Renart J, Reiser J, Stark GR** (1979) Transfer of proteins from gels to Diazobenzoyloxy-methylpaper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. Bd. 76(7), S. 3116–3120.
- Resh MD** (1994) Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76,411–413.
- Resh MD** (2004) A myristoyl switch regulates membrane binding of HIV-1 Gag. *PNAS*. 101 (2):417-418.
- Reuss FU, Schaller HC** (1991) cDNA sequence and genomic characterization of intracisternal A-particle-related retroviral elements containing an envelope gene. *J Virol*. 65(11):5702-9.
- Rhee SS, Hunter E** (1990) A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell*. 63:77–86.
- Rogers SS, Flores-Rodriguez N, Allan VJ, Woodman PG, Waigh TA** (2010) The first passage probability of intracellular particle trafficking. *Phys Chem Chem Phys*. 12:3753–3761.
- Rönnebäumer K, Gross U, Bohne W** (2008) The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryot Cell*. 7(6):1001-8.
- Rothman JE, Lodish HF** (1977) Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature*. 269:775–780.
- Rous P** (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med*. 13:397–411.

- Rowe WP, Pincus T** (1972) Quantitative studies of naturally occurring murine leukemia virus infection of AKR mice. *J Exp Med*, 135:429-436.
- Rowell JF, Ruff AL, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll K, Lin X, Tang J, August JT, Siliciano RF** (1995) Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol*. 155:1818–28.
- Rubin H** (1965) Genetic control of cellular susceptibility to pseudotypes of Rous sarcoma virus. *Virology* 26:270-276.
- Ruggieri A, Maldener E, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Meese E, Fackler OT, Mayer J** (2009) Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) encodes a stable signal peptide with biological properties distinct from Rec. *Retrovirology*. 16:6:17.
- Rudner L, Nydegger S, Coren LV, Nagashima K, Thali M, Ott DE** (2005) Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol*. 79(7):4055-65.
- Rumlova-Klikova M, Hunter E, Nermut MV, Pichova I, Ruml T** (2000) Analysis of Mason-Pfizer monkey virus Gag domains required for capsid assembly in bacteria: role of the N-terminal proline residue of CA in directing particle shape. *J Virol*. 74(18):8452-9.
- Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N** (2008) SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(1):294-9.
- Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF** (2006) Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11364–11369.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239, 487–491.
- Saksela K** (2011) Interactions of the HIV/SIV pathogenicity factor Nef with SH3 domain-containing host cell proteins. *Curr HIV Res*. 9(7):531-42.
- Saksela K, Permi P** (2012) SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett*. 586(17):2609-14. Review.
- Sandefur S, Smith RM, Varthakavi V, Spearman P** (2000) Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol*. 74(16):7238-49.

- Sandefur S, Varthakavi V, Spearman P** (1998) The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J Virol.* 72(4):2723-32.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition). In: CSH Press. 2 S. 1–1659
- Schawaller M, Smith GE, Skehel JJ, Wiley DC** (1989) Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. *Virology.* 172:367–9.
- Scheenen WJ, Makings LR, Gross LR, Pozzan T, Tsien RY** (1996) Photodegradation of indo-1 and its effect on apparent Ca²⁺ concentrations. *Chem Biol.* 3(9):765-74.
- Scheiffele P, Roth MG, Simons K** (1997) Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 16(18):5501-8.
- Schnapp BJ, Reese TS** (1989) Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:1548–1552.
- Scholz I, Still A, Dhenub TC, Coday K, Webb M, Barklis E** (2008) Analysis of human immunodeficiency virus matrix domain replacements. *Virology.* 20;371(2):322-35.
- Schroer TA, Steuer ER, Sheetz MP** (1989) Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell.* 56:937–946.
- Sfakianos JN, Hunter E** (2003) M-PMV capsid transport is mediated by Env/Gag interactions at the pericentriolar recycling endosome. *Traffic.* 4:671–680.
- Sfakianos JN, LaCasse RA, Hunter E** (2003) The M-PMV cytoplasmic targeting-retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic.* 4 (10):660-70.
- Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY** (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods.* 5(6): 545–551.
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY** (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods.* 2(12):905-9. Review.
- Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Horner SM, Cicchetti G, Allen PG, Pypaert M, Cunningham JM, Mothes W** (2003) Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic.* (11):785-801.
- Smit AF** (1999) Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9; 657–663.

- Solbak SM, Reksten TR, Röder R, Wray V, Horvli O, Raae AJ, Henklein P, Henklein P, Fossen T** (2012) HIV-1 p6-Another viral interaction partner to the host cellular protein cyclophilin A. *Biochim Biophys Acta.* 1824(4):667-78.
- Soldati T, Rancaño C, Geissler H, Pfeffer SR** (1995) Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. *J Biol Chem.* 270(43):25541-8.
- Soldati T, Schliwa M** (2006) Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(12):897-908. Review.
- Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M** (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149:901–914.
- Spearman P, Wang JJ, Vander Heyden N, Ratner L** (1994). Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J. Virol.* 68, 3232–3242.
- Spearman P, Horton R, Ratner L, Kuli-Zade I** (1997) Membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein in vivo supports a conformational myristyl switch mechanism. *J Virol.* 71(9):6582-92.
- Stamnes MA, Rutherford SL, Zuker CS** (1992) Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. *Trends Cell Biol.* 2(9):272-6.
- Steinman RM, Mellman IS, MüllerWA, Cohn ZA** (1983) Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 96: 1–27.
- Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG** (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell.* 114(6):689-99.
- Stroffekova K, Proenza C, Kurt G. Beam** (2001) The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins. *Pflügers Arch.* Bd. 442, S. 859–866.
- 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.
- Summers MF, Henderson LE, Chance MR, Bess JW Jr, South TL, Blake PR, Sagi I, Perez-Alvarado G, Sowder RC 3rd, Hare DR, et al.** (1992) Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci.* 1, 563–574.
- Swanstrom R, Wills JW** (1997) Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (Eds.), *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 263–334.

- Takasaki T, Kurane I, Aihara H, Ohkawa N and Yamaguchi J** (1997) Electron microscopy study of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) core structure: two RNA strands in the core of mature and budding particles. *Arch. Virol.* 142: 375-382.
- Takeda M, Leser GP, Russell CJ, Lamb RA** (2003) Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25):14610-7.
- Tang C, Loeliger E, Luncsford P, Kinde I, Beckett D, Summers MF** (2003) Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(2):517-22.
- Tang SW, Ducroux A, Jeang KT, Neuveut C** (2012) Impact of cellular autophagy on viruses: Insights from hepatitis B virus and human retroviruses. *J Biomed Sci.* 19:92. Review.
- Tarlinton RE, Meers J, Young PR** (2006) Retroviral invasion of the koala genome. *Nature.* 442(7098):79-81.
- Teissier E, Penin F, Pécheur EI** (2010) Targeting cell entry of enveloped viruses as an antiviral strategy. *Molecules.* 16(1):221-50. Review.
- Temin HM** (1963) Separation of morphological conversion and virus production in Rous sarcoma virus infection. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 27:407-414.
- Temin HM** (1964) Nature of the provirus of Rous sarcoma. *Nat Cancer Inst Monogr.* 17:557-570.
- Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Göttlinger HG** (2013) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature.* 372(6504):363-5.
- Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH** (1992) Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* 6:1457-1465.
- Tönjes RR, Boller K, Limbach C, Lugert R, Kurth R** (1997) Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology.* 233(2):280-91.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Bd.* 76(9), 4350–4354.
- Tritel M, Resh MD** (2000) Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol.* 74(13):5845-55.
- Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J** (2001) Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr. Biol.* 11, 1531–1535.

- Van der Goot FG, Gruenberg J** (2006) Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 16(10):514-21. Review.
- Van Meer G** (1998) Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol.* 8:29–33.
- Van Meer G, Holthuis JCM** (2000) Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1486:145-170.
- Van Nie R, Verstraeten AA, De Moes J** (1977) Genetic transmission of mammary tumour virus by GR mice. *Int. J. Cancer.* 19(3):383-90.
- Vogt VM** (2000) Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 12945–12947.
- Vogt VM, Simon MN** (1999) Mass Determination of Rous Sarcoma Virus Virions by Scanning Transmission. *J Virol.* 73(8): 7050–7055.
- von Schwedler UK, Stemmler TL, Klishko VY, Li S, Albertine KH, Davis DR, Sundquist WI** (1998) Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *EMBO J.* 17, 1555–1568.
- von Schwedler UK, Stuchell M, Mueller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimbara DM, Scott A, Kraeusslich HG, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI** (2003) The protein network of HIV budding. *Cell.* 114(6):701-13.
- Votteler J, Neumann L, Hahn S, Hahn F, Rauch P, Schmidt K, Studtrucker N, Solbak SM, Fossen T, Henklein P, Ott DE, Holland G, Bannert N, Schubert U** (2011) Highly conserved serine residue 40 in HIV-1 p6 regulates capsid processing and virus core assembly. *Retrovirology.* 16;8:11.
- Wang CT, Barklis E** (1993). Assembly, processing, and infectivity of human immunodeficiency virus type1 *gag* mutants. *J Virol.* 67, 4264–4273.
- Wang CT, Zhang Y, McDermott J, Barklis E** (1993) Conditional infectivity of a human immunodeficiency virus matrix domain deletion mutant. *J Virol.* 67(12):7067–7076.
- Wang E, Wolf BA, Lamb RA, Choppin PW, Goldberg AR** (1976) The presence of actin in enveloped viruses. In: Goldbaum R, Pollard T, Rosenbaum J (eds) *Cell motility.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 589-599.
- Wang H, Machesky NJ, Mansky LM** (2004) Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release. *J Virol.* 78(3):1503-12.
- Wang H, Norris KM, Mansky LM** (2002) Analysis of bovine leukemia virus gag membrane targeting and late domain function. *J Virol.* 76(16):8485-93.

- Wang X, Gao Y, Tan J, Devadas K, Ragupathy V, Takeda K, Zhao J, Hewlett I** (2012) HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4+ T cells. *Cell Signal*. 24(7):1414-9.
- Weiss RA** (2006) The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 3:67. Review.
- Welker R, Janetzko A, Kräusslich HG** (1997) Plasma membrane targeting of chimeric intracisternal A-type particle polyproteins leads to particle release and specific activation of the viral proteinase. *J Virol*. 71(7):5209-17.
- White TA, Bartesaghi A, Borgnia MJ, de la Cruz MJ, Nandwani R, Hoxie JA, Bess JW, Lifson JD, Milne JL, Subramaniam S** (2011) Three-dimensional structures of soluble CD4-bound states of trimeric simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins determined by using cryo-electron tomography. *J Virol*. 85(23):12114-23.
- Wiedenmann J, Oswald F, Nienhaus GU** (2009) Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life*. 61(11):1029-42. Review.
- Wielgosz MM, Rauch DA, Jones KS, Ruscetti FW, Ratner L** (2005) Cholesterol dependence of HTLV-I infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(1):43–50.
- Wilk T, Geiselhart V, Frech M, Fuller SD, Fluegel RM, Loechelt M** (2001) Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J. Virol*. 75:7995–8007.
- Wills JW, Cameron CE, Wilson CB, Xiang Y, Bennett RP, Leis J** (1994) An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding. *J Virol*. 68(10):6605-18.
- Wirth M, Joachim J, Tooze SA** (2013) Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*. 23(5):301-9.
- Wodrich H, Kraeusslich HG** (2001) Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. *Results Probl Cell Differ*. 34:197-217. Review.
- Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X** (2013) The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*. 9(2):124-37.
- Xiang Y, Cameron CE, Wills JW, Leis J** (1996) Fine mapping and characterization of the Rous sarcoma virus Pr76gag late assembly domain. *J Virol*. 70(8):5695-700.
- Yamashita M, Achiron A, Miura T, Takehisa J, Ido E, Igarashi T, Ibuki K, Osame M, Sonoda S, Melamed E et al.** (1995) HTLV-I from Iranian Mashhadi Jews in Israelis phylogenetically related to that of Japan, India, and South America rather than to that of Africa and Melanesia. *Virus Genes*. 10(1): 85-90.

- Yasuda J, Hunter E** (1998) A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-independent role in virion release. *J Virol.* 72(5):4095-103.
- Yu X, Yuan X, McLane MF, Lee TH, Essex M** (1993) Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* 67, 213–221.
- Yuan B, Li X, Goff SP** (1999) Mutations altering the moloney murine leukemia virus p12 Gag protein affect virion production and early events of the virus life cycle. *EMBO J.* 18:4700–4710.
- Zábranský A, Hadravová R, Stokrová J, Sakalian M, Pichová I** (2009) Premature processing of mouse mammary tumor virus Gag polyprotein impairs intracellular capsid assembly. *Virology.* 384(1):33-7.
- Zavada J** (1982) The pseudotypic paradox. *J Gen Virol* 63(Pt 1):15–24.
- Zeifelder U, Bosch V** (2001) Properties of wild-type, C-terminally truncated, and chimeric maedi-visna virus glycoprotein and putative pseudotyping of retroviral vector particles. *J Virol.* 75(1):548–555.
- Zhang Y, Qian H, Love Z, Barklis E** (1998) Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J Virol.* 72, 1782–1789.
- Zhao RY, Li G, Bukrinsky MI** (2011) Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. *J Neuroimmune Pharmacol.* 6(2):216-29. Review.
- Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD** (1994) Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol.* 68(4):2556-69.
- Zhou W, Resh MD** (1996) Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Virol.* 70(12):8540-8.
- Zhou X, Pan S, Sun L, Corvera J, Lin SH, Kuang J** (2008) The HIV-1 p6/EIAV p9 docking site in Alix is autoinhibited as revealed by a conformation-sensitive anti-Alix monoclonal antibody. *Biochem J.* 414(2):215-20.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide (Primer)

7.1.1 Sequenzierprimer

Tabelle 26: Primer für die Sequenzierungs-PCR

Zielgen	Primername	Sequenz (5' → 3')
Gag	445_Seq_R	CTCGGTCTCTTTCTGGCTCTTC
	892_Seq_F	GAGCAGGAAAGAGGGCGACAC
	1180_Seq_R	CGTCGATCCACCAGGTCTTG
	1591_Seq_F	CGACGTGATCAGCGAGTATGTG
	1776_Seq_R	GTGGCCTGGATGGTGATGTTC
	2340_Seq_F	CTACATCAAGGGCGGCAACAG
	2250_Seq_R	GCTGGATCTCGCCCTTGAG
Env	Seq_coEnv_SGM_F	CGGCATGAGCCTGCGGCCAG
	Seq_coEnv_AVD_R	GGTCAGGTCGCTGTCCACGG
	Seq_coEnv_LLT_F	CTGCTGACCTGCATCGACAGC
	Seq_coEnv_SGS_R	CTGGTCGATGCTGCTCTGGCT
	Seq_coEnv_LVP_F	CTGGTGCCCGGCACCGAGG
Cherry	2919_Seq_YLK_Cherry_F	C TAC TTG AAG CTG TCC TTC CC
	2886_Seq_KSG_Cherry_R	CTT GGA GCC GTA CAT GAA CTG
EGFP	pEGFP_Seq_F	GTCGTAACAACCTCCGCCCAT
	pEGFP_Seq_R	TCGCCGTCCAGCTCGACCAG

7.1.2 Mutageneseprimer

Tabelle 27: Primer für die Mutagenese-PCR

Zielgen	Primername	Sequenz (5' → 3')
Gag	Mut_CMVoricok113 _stopp_p5_FI	CCACAACAACCTGGGGCATTCTGAATTCAGC CATTGTTCCTCAG
	Mut_CMVoricok113 _stopp_p5_RI	CTGAGGAACAATGGCTGAATTCAGAATGCC CCAGTTTGTGTGG

Zielgen	Primername	Sequenz (5' → 3')
Gag	Mut_pcDNA3 oricogagΔp5-III_F	<u>CCA CAA CAA ACT GGG GCA TTC TAG GCT</u> <u>CGA GCA TGC ATC TAG</u>
	Mut_pcDNA3 oricogagΔp5-III_R	<u>CTA GAT GCA TGC TCG AGC CTA</u> GAA TGC CCC AGT TTG TTG TGG
	Mut_pcDNA3orico GagCherryΔp5_F	CCA CAA CAA ACT GGG GCA TTC <u>TTG GTA</u> <u>CCG CGG GCC CGG GAT</u>
	Mut_pcDNA3orico GagCherryΔp5_R	<u>ATC CCG GGC CCG CGG TAC CAA</u> GAA TGC CCC AGT TTG TTG TGG
Env	Mut_orcioEnvV5 _TC-Tag_FI	<u>CAGATCGTGACCGTGAGCGTGTGCTGCCCGGCT</u> <u>GCTGCTGAGCGGCCGCATCTGGTAAGCCT</u>
	Mut_orcioEnvV5 _TC-Tag_RI	AGGCTTACCAGATGCGGCCGCT <u>CAGCAGCAGCCG</u> <u>GGGCAGCACACGCTCACGGTCACGATCTG</u>

Primer zur Generierung der QP-Deletionsmutanten und oricoEnv_TC. Die veränderten Sequenzbereiche wurden unterstrichen.

7.1.3 Klonierungsprimer

Tabelle 28: Primer für Klonierung

Zielgen	Primername	Sequenz (5' → 3')
Gag	83_SacI_gag_F	CCAGACCGCGAGCTCGCCGCCATGGGGCAA AAAGTAAAATTTAA
	2060_KpnI_gag_R	GGTGTTCGCCGTCACGTCGTCAACCATGGGATAT GG
EGFP	PCR_Amp_NotI_EGFP_F	TATTCGGCGCCGCAATGGTGAGCAAGGGC
	PCR_XhoI_EGFP_R	TGCTCGACATGTTTCATTGAGCTCCA ACTGCG

Die Primer für die Klonierung ermöglichten das Einbringen von Restriktionsendonukleaseschnittstellen (grau unterlegt) N- und C-terminal der *gag* und *egfp* Sequenz. Sie bildeten die Grundlage für die Klonierung von oricoGagCherry und oricoGagEGFP.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
add	auffüllen
ADP	Adenosindiphosphat
ALV	Aviäres Leukosevirus
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AT	Adenin/Thymin
ATL	Adulte T-Zell-Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Gold
bp	Basenpaare
BFV	Rinderfoamyvirus ("bovine foamy virus")
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BLV	Rinderleukämievirus ("bovine leukemia virus")
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine serum albumin")
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CA	Kapsidprotein ("capsid protein")
CaCl ₂	Calciumchlorid
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein ("cyan fluorescence protein")
CLEM	korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie ("correlative light and electron microscopy")
cLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop ("confocal laser scanning microscope")
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	"Cleavage site"
Cu	Kupfer
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
(d)dNTP	(Di-)Desoxinukleotriphosphat
DiO	3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin-Perchlorat, C ₅₃ H ₈₅ ClN ₂ O ₆

DMEM	"Dulbecco´s modified Eagle medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure ("desoxiribonucleic acid")
DsRed	"Discosoma red fluorescent protein"
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein ("enhanced green fluorescence protein")
<i>egfp</i>	EGFP-Gen
EIAV	Virus der equinen infektiösen Anämie ("Equine infectious anemia virus")
EM	Elektronenmikroskopie
Env	virales Hüllprotein ("envelope protein")
<i>env</i>	Env-Gen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERV	EndogeneRetroviren
ESCRT	"Endosomal sorting complexes required for transport"
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
F	Farad; elektrische Kapazität
FeLV	Felines Leukämievirus
FKS	fetales Kälberserum
FlAsH-EDT ₂	"Fluorescein arsenical helix binder"
FRET	Förster Resonanz Elektronen Transfer
G	Guanin
GA	Glutaraldehyde
Gag	Gruppen-spezifisches Antigen ("group-specific antigen")
<i>gag</i>	Gag-Gen
GC	Guanin/Cytosin
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein ("green fluorescence protein")
GTP	Guanintriphosphat
HAM/TSP	HTLV-1-assozierte Myelopathie/Tropische Spastische Paraparese
HBS	Hepespuffer ("hepes buffer saline")
HCL	Salzsäure
HeNe	Helium-Neon
HERV	Humanes Endogenes Retrovirus

HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HML-2	Humaner Maus-Mammatumovirus-artig 2 ("human mouse mammary tumor virus-like 2")
hpt	Stunden nach Transfektion ("hours past transfection")
HRP	Meerrettichperoxidase ("horseradish peroxidase")
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie Virus
ICTV	"International Committee on Taxonomy of Viruses"
IgG	Immunglobulin G
JSRV	Jaagsiekte Schaf-Retrovirus
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KoRV	Koala Retrovirus
L	Leucin
Lamp	lysosomal-assoziiertes Membranprotein ("lysosomal-associated membrane protein")
LB	Lysogene Brühe ("lysogeny broth")
LC	Rattenmikrotubuli- assoziiertes Protein 1, leichte Kette 3 ("rat microtubule-associated protein 1 light chain 3")
LTR	"long terminal repeat"
M	Molar
MA	Matrixprotein
Mesh	Maschen
Mg	Magnesium
min	Minuten
MLV	Murines Leukämievirus
mM	Millimolar
MMTV	Maus-Mammatumovirus
mol	Maßeinheit für die Stoffmenge
MPMV	"Mason Pfizer Monkey Virus"
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
MSD	Membran-durchspannende Domäne
MVB	Multivesikulares Körperchen ("multi-vesicular body")

n	Anzahl an durchgeführten Versuchen
NA	Numerische Apertur
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NC	Nukleokapsid
NGS	Ziegennormalserum ("normal goat serum")
Ni	Nickel
nm	Nanometer
n.p.	nicht publiziert
ORF	"open reading frame"
orico	originale codonoptimiert
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALM	"photo activated localization microscopy"
PB	Primerbindestelle
PBS	Phosphatpuffer ("phosphate buffer saline")
PBS	Primerbindestelle
pc	Plasmid zyklisch
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PEN	Polyethylenaphthalat ("polyethylene naphthalate")
PERV	Porcines Endogenes Retrovirus
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH ("pondus Hydrogenii") -Wert
PIC	Prä-Integrationskomplex
PLT	Fortschreitende Temperatursenkung ("progressiv lowering temperature")
pm	Plasmid mammalia
PMT	Fotoelektronenvervielfacher ("photomultiplier tube")
<i>pol</i>	Polymerase/RT/RNAaseH-Gen
PP	Phosphorprotein
Pr	Vorläufer ("precursor")
<i>pro</i>	Protease-Gen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
QP	Glutamin(Q)- und Prolin(P)-reich

®	eingetragenes Warenzeichen
rab	"Ras-related in brain"
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rER	rause Endoplasmatisches Retikulum
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein ("red fluorescence protein")
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ("sodium dodecyl sulfate")
SFV	Semliki-Forest-Virus
SH3	src homologe Region
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
SOB	Super optimale Brühe ("super optimal broth")
SOCS1	"suppressor of cytokine signaling 1"
SP	Signalpeptid von Env
STED-M	"stimulated emission depletion microscopy"
STORM	"stochastic optical reconstruction microscopy"
SU	Oberflächenprotein von Env
t	Zeit
T	Tyrosin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Tetracystein
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIRF-M	"total internal reflection fluorescence microscopy"
TM	Transmembranprotein
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan/ Trometamol
tRNA	Transfer- Ribonukleinsäure
U	Einheiten ("Units")
U3	unique 3'
U5	unique 5'
Upm	Umdrehungen pro Minute

Anhang

UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
VLP	virusartige Partikel ("virus-like partikle")
W	Tryptophan
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
YFP	Gelbfluoreszierendes Protein ("yellow fluorescence protein")
μm	Mykrometer
Ω	Ohm
∞	unendlich
Δ	delta, ohne
3D	dreidimensional

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Phylogenetischer Stammbaum der Retroviren.....	3
Abbildung 2:	Proliferation endogener Retroviren.....	4
Abbildung 3:	Einteilung endogener Retroviren.....	5
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Betaretrovirus.....	8
Abbildung 5:	Retrovirale Gag-Proteine.....	9
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der retroviralen RNA und des Provirus..	10
Abbildung 7:	Schema des retroviralen Replikationszyklus.....	12
Abbildung 8:	Endosomaler Stoffwechselweg.....	14
Abbildung 9:	Intrazelluläre Transportwege und Assemblierung von HIV-1 Gag.....	15
Abbildung 10:	Morphologie von A-, B-, C- und D-Typ-Retroviren.....	17
Abbildung 11:	Einteilung von HERV-K(HML-2) Retroviren.....	22
Abbildung 12:	Provirus und Transkripte von HERV-K113.....	23
Abbildung 13:	Gag-Vorläuferprotein von HERV-K113.....	24
Abbildung 14:	Aminosäureaustausche bei HERV-K113.....	27
Abbildung 15:	Indirekte Zwei-Schritt-Methode der Immunlokalisation.....	55
Abbildung 16:	Funktionsweise von FlAsH-EDT ₂ <i>in vivo</i>	59
Abbildung 17:	Phasendiagramm und Kritischer Punkt.....	69
Abbildung 18:	18 Well μ Slide mit PEN-Membran Boden, Gridschablone und Kohlekoordinatenmuster.....	71
Abbildung 19:	μ Dish Grid500 ^{high} Koordinatenmuster.....	74
Abbildung 20:	Schematische Darstellung der verwendeten oricoGag-Konstrukte.....	78
Abbildung 21:	Beginnende Expression von GagCherry.....	80
Abbildung 22:	Fluoreszenzprotein-markiertes Gag akkumuliert an der Zellperipherie.....	80
Abbildung 23:	Fluoreszenzprotein-markiertes und unmarkiertes Gag akkumuliert an der Zellmembran.....	81
Abbildung 24:	Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie transfizierter HEK293T-Zellen.....	83
Abbildung 25:	Unmarkiertes und markiertes Gag assembliert an der Plasmamembran.....	85
Abbildung 26:	Akkumulation von viralen Partikeln unter der Plasmamembran..	86
Abbildung 27:	Mischungsverhältnisse von unmarkiertem und markiertem Gag führen zu VLPs.....	87

Abbildung 28:	Korrelative Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie.....	90
Abbildung 29:	Korrelative Licht- und Rasterelektronenmikroskopie.....	91
Abbildung 30:	Fluoreszenzprotein-markiertes Gag wird in VLPs eingebaut.....	94
Abbildung 31:	UZ-Pellets in der Fluoreszenz- und Transmissionselektronenmikroskopie.....	96
Abbildung 32:	GagCherry wird in VLPs eingebaut und prozessiert.....	97
Abbildung 33:	GagCherry wird durch die virale Protease prozessiert.....	99
Abbildung 34:	C-terminaler Sequenzvergleich der Gag-Proteine von oriHERV-K113, MPMV und MMTV.....	100
Abbildung 35:	QP-Deletionsmutanten der oricoHERV-K113-Konstrukte.....	101
Abbildung 36:	Markiertes und unmarkiertes Gag Δ QP akkumuliert an der Zellmembran.....	103
Abbildung 37:	Transmissionselektronenmikroskopie der QP-Deletionsmutanten.....	104
Abbildung 38:	GagCherry Δ QP wird in VLPs eingebaut und wie Gag Δ QP prozessiert.....	106
Abbildung 39:	UZ-Pellets von Zellkulturüberständen der QP-Deletionsmutanten.....	107
Abbildung 40:	Tracking einer mobilen GagCherry-Akkumulation.....	110
Abbildung 41:	GagCherry kolokalisiert sehr selten mit Mikrotubuli.....	112
Abbildung 42:	Intrazelluläre Lokalisation von HERV-K113 GagCherry und viralen Partikeln.....	113
Abbildung 43:	Gag ist an Lysosomen lokalisiert.....	115
Abbildung 44:	Gag ist im Lumen von späten Endosomen angereichert.....	116
Abbildung 45:	Gag befindet sich nur selten in räumlicher Nähe zu Recycling-Endosomen.....	117
Abbildung 46:	Verwendete Konstrukte von HERV-K113 oricoEnv.....	120
Abbildung 47:	Lichtmikroskopischer Vergleich der Konstrukte oricoEnv-V5 mit oricoEnvTC.....	121
Abbildung 48:	Lokalisation von EnvTC an intrazellulären Membranstrukturen.....	123
Abbildung 49:	Gag und Env assemblieren an der Plasmamembran und vereinzelt intrazellulär.....	124
Abbildung 50:	Kolokalisation von Gag und FlAsH-markiertem Env.....	125
Abbildung 51:	EnvV5 und EnvTC wird in virale Partikel eingebaut.....	126
Abbildung 52:	Env auf der Oberfläche viraler Partikel.....	128

7.4 Filmverzeichnis

Die aufgeführten Filme befinden sich auf der beigelegten CD/DVD im Bucheinband. Die Filme sind mittels Windows Media Player abspielbar.

Film 1	80
HEK293T-Zellen transfiziert mit oricoGagCherry in der Lebendzellmikroskopie. Nach fünf Stunden (0min) Detektion des Proteins GagCherry und steigender Expression innerhalb von 12 min. (Abbildung 2)	
Film 2	80
HEK293T-Zellen 16 Stunden nach Transfektion mit oricoGagCherry in der Lebendzellmikroskopie. (144 Bilder, 1Bild/ 4s)	
Film 3	81
HEK293T-Zelle 24 Stunden nach Transfektion mit oricoGagCherry in der konfokalen Lebendzellmikroskopie. Akkumulation von GagCherry an der Plasmamembran mit fluoreszierenden, fadenförmigen Ausläufern. (100 Bilder, 1Bild/ 3,1s)	
Film 4	110
Tracking einer GagCherry-Akkumulation in einer HUH7-Zelle 24 Stunden nach Transfektion mit oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 im Verhältnis von 1:5. Rotes Kreuz: getrackte GagCherry-Akkumulation. (145 Bilder, 1Bild/5,6s; Abbildung 40)	
Film 5	112
Z-Stack von HEK293T-Zellen transfiziert mit oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 im Mischungsverhältnis 1:5 sowie DiO-Membranfärbung. (Abbildung 42B)	
Film 6	115
HUH7-Zellen 16 Stunden nach der Transfektion mit oricoGagEGFP und CMVoricoHERV-K113 (1:5). Die Lysosomen wurden mit LysoTracker® Red DND-99 lebend gefärbt.	

Film 7	116
HUH7-Zellen 16 Stunden nach der Transfektion mit oricoGagCherry und CMVoricoHERV-K113 (1:5). Zur Visualisierung später Endosomen wurde dem Transfektionsansatz zudem das Konstrukt EGFP-rab7wt zugegeben.	
Film 8	117
HUH7-Zellen 16 Stunden nach der Transfektion mit oricoGagEGFP und CMVoricoHERV-K113 (1:5). Zur Visualisierung von Recycling-Endosomen wurde dem Transfektionsansatz zudem das Konstrukt DsRed-rab11wt zugegeben.	
Film 9	124
Z-Stack von HEK293T-Zellen transfiziert mit CMVoricoHERV-K113 (anti-Gag HERV-K113 und anti-Mause Alexa568) und oricoEnvTC (anti-Env HERV-K113 und anti-Mause Alexa488) im Verhältnis 8:1 nach etwa 16 Stunden in der konfokale Laserskanningmikroskopie. (Abbildung 49C)	

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Laborgeräte.....	29
Tabelle 2:	Mikroskope.....	30
Tabelle 3:	Software.....	31
Tabelle 4:	Labormaterialien.....	32
Tabelle 5:	Chemikalien.....	33
Tabelle 6:	Enzyme.....	36
Tabelle 7:	Größenstandards.....	36
Tabelle 8:	Primärantikörper.....	36
Tabelle 9:	Sekundärantikörper.....	37
Tabelle 10:	Vitalfarbstoffe.....	37
Tabelle 11:	Puffer.....	38
Tabelle 12:	Nährmedien.....	38
Tabelle 13:	Kits.....	39
Tabelle 14:	Adhärente, humane Zelllinien.....	39
Tabelle 15:	Leervektoren.....	39
Tabelle 16:	Konstrukte.....	40
Tabelle 17:	Ausplattierte Zellzahlen der verwendeten humanen Zelllinien....	49
Tabelle 18:	Mengenangaben der verwendeten Lösungen für die Calciumphosphat- Transfektion.....	51
Tabelle 19:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	53
Tabelle 20:	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper im Western Blot und deren Verdünnung.....	54
Tabelle 21:	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz und deren Verdünnung.....	56
Tabelle 22:	Einbettprotokoll für den Einbettautomaten Leica EM TP.....	64
Tabelle 23:	Einbettprotokoll für die PLT mit Lowicryl HM20.....	65
Tabelle 24:	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunogoldmarkierung und deren Verdünnung.....	67
Tabelle 25:	Einbettprotokoll für die Handeinbettung bei Raumtemperatur in Epon.....	73
Tabelle 26:	Primer für die Sequenzierungs-PCR.....	191
Tabelle 27:	Primer für die Mutagenese-PCR.....	191
Tabelle 28:	Primer für die Klonierung.....	192

7.6 Publikationsliste

CMV-promoter driven codon-optimized expression alters the assembly type and morphology of a reconstituted HERV-K(HML-2).

Hohn O, Hanke K, Lausch V, Zimmermann A, Mostafa S, Bannert N (2014) Viruses. 6(11):4332-45.

A Simple Procedure to Analyze Positions of Interest in Infectious Cell Cultures by Correlative Light and Electron Microscopy.

Madela K, Banhart S, Zimmermann A, Piesker J, Bannert N, Laue M (2014) Methods Cell Biol. 124:93-110.

Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2).

Chudak C, Beimforde N, George M, Zimmermann A, Lausch V, Hanke K, Bannert N (2013) Retrovirology.10:140.

Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element.

George M, Schwecke T, Beimforde N, Hohn O, Chudak C, Zimmermann A, Kurth R, Naumann D, Bannert N (2011) Retrovirology. 8:30.

7.7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei zahlreichen lieben Menschen bedanken, mit deren Unterstützung es möglich war, diese Doktorarbeit anzufertigen. Es wird mir vielleicht nicht möglich sein jeden zu erwähnen, jedoch gilt der Dank euch allen, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Ich möchte PD Dr. Norbert Bannert für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Robert Koch-Institut anfertigen zu können. Auch dafür das ich meinen Forschergeist und meine mikroskopische Ader frei entfalten durfte. Ebenso haben mir die zahlreichen Denkanstöße und die kritische Begutachtung meiner Ergebnisse sehr geholfen. In diesem Rahmen möchte ich auch dem leider bereits verstorbenen Prof. Dr. Reinhardt Kurt für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ruppert Mutzel für die Übernahme der Betreuung und der Zweitgutachtertätigkeit. Damit war es mir erst möglich meine Dissertation an der Freien Universität Berlin einzureichen.

Ein außerordentlicher Dank gilt auch Dr. Michael Laue für die zahlreichen inspirierenden und hilfreichen Gespräche. Seine Unterstützung und die seiner Arbeitsgruppe, sowie die freie Nutzung aller Gerätschaften für die Probenpräparation und Analyse habe ich sehr zu schätzen gewusst. Bei Kazimierz Madela, Gudrun Holland und Janett Piesker möchte ich mich insbesondere für die methodischen Hilfestellungen bedanken. Ich habe wirklich viel gelernt.

Mein Dank gilt auch allen Doktoranden und technischen Angestellten für die schöne gemeinsame Zeit, die Einweisung in das molekularbiologische Arbeiten und die Unterstützung mit Konstrukten und Primern. Im besonderen gilt dies Kirsten Hanke, Claudia Chudak, Veronika Lausch und Lars Niederstadt.

Auch danke ich von Herzen meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben und immer hinter mir standen. Einen erheblichen Beitrag haben auch meine Freunde geleistet, welche mir immer Mut gemacht haben und zur Seite standen.

Ohne euch alle wäre ich heut nicht da, wo ich bin. Danke!

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die ihnen vorliegende Arbeit zum Thema: "Intrazellulärer Transport, Assembly und Egress des endogenen Betaretrovirus HERV-K113" selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und wurde unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel sowie Literatur angefertigt.

Hamburg, 08.10.2014

Anja Zimmermann