

Analyse von HIV-1 Restriktionsfaktorkandidaten, die nach Aktivierung der *Toll-like* Rezeptoren 7 und 8 induziert werden

Bachelorarbeit zum Erlangen des Hochschulgrades
Bachelor of Science (B. Sc.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität

Vorgelegt von:
Nicolas Dominik Arnow
Matrikelnr.: 4881083

Erster Gutachter:
Prof. Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter:
Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Berlin, September 2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | V |
| Abstract | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Retroviren | 1 |
| 1.2 Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) | 1 |
| 1.2.1 HIV-Infektion und AIDS | 2 |
| 1.2.2 Morphologie und Genom von HIV-1 | 4 |
| 1.2.3 Replikationszyklus | 6 |
| 1.3 Angeborene Immunantwort | 7 |
| 1.3.1 Toll-like Rezeptoren | 7 |
| 1.4 Restriktionsfaktoren | 8 |
| 1.4.1 Der bislang unbekannte Restriktionsfaktor | 9 |
| 1.5 Zielsetzung | 11 |
| 2 Material | 12 |
| 2.1 Antibiotika | 12 |
| 2.2 Antikörper | 12 |
| 2.3 Bakterienstamm | 12 |
| 2.4 Chemikalien | 13 |
| 2.5 Enzyme | 13 |
| 2.6 Größenstandards | 14 |
| 2.7 Kits | 14 |
| 2.8 Laborgeräte | 14 |
| 2.9 Lösungen, Puffer und Nährmedien | 15 |
| 2.10 Oligonukleotide (Primer) | 16 |
| 2.11 Plasmide/Vektoren und Reporterviren | 17 |
| 2.12 Software | 17 |
| 2.13 Zellen | 18 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Methoden..... | 19 |
| 3.1 | DNA-Analytik | 19 |
| 3.1.1 | RNA-Extraktion | 19 |
| 3.1.2 | Vollängen cDNA-Synthese | 19 |
| 3.1.3 | Bestimmung der RNA und DNA-Konzentration | 19 |
| 3.1.4 | Agarose-Gelelektrophorese | 19 |
| 3.1.5 | Polymerase-Kettenreaktion | 20 |
| 3.1.6 | (präparative) Restriktionsverdau | 21 |
| 3.1.7 | Gel-Extraktion | 23 |
| 3.1.8 | Ligation | 23 |
| 3.1.9 | Transformation von E. coli..... | 24 |
| 3.1.10 | Plasmidpräparation | 24 |
| 3.2 | Protein-Analytik | 24 |
| 3.2.1 | SDS-PAGE..... | 24 |
| 3.2.2 | Western Blot..... | 25 |
| 3.3 | Infektion von HEK-293T Zellen | 25 |
| 3.4 | Analyse der Infektion | 26 |
| 3.4.1 | FACS | 26 |
| 3.4.2 | Luciferase-Assay | 26 |
| 3.5 | Zellbiologische Methoden | 27 |
| 3.5.1 | Adhärente Zellen | 27 |
| 3.5.2 | Isolierung von PBMC aus Buffy Coats | 27 |
| 3.5.3 | Lyse von Zellen | 28 |
| 3.5.4 | Suspensionszellen..... | 28 |
| 3.5.5 | Transfektion von Zellen mit PEI | 28 |
| 3.5.6 | Zellfixierung mit PFA | 29 |
| 3.5.7 | Zellkultivierung | 29 |
| 3.5.8 | Zellzahlbestimmung | 29 |
| 4 | Ergebnisse | 30 |
| 4.1 | Selektion von Gene aus Transkriptom Analyse | 30 |

| | | |
|----------|---|-------------|
| 4.2 | Amplifikation der DNA-Sequenzen aus cDNA | 32 |
| 4.3 | Klonierung in lentiviralem Vektor | 32 |
| 4.4 | Expressionsnachweis in HEK 293T Zellen | 34 |
| 4.5 | Untersuchung eines antiviralen Effekts durch Infektion mit Reporterviren..... | 35 |
| 5 | Diskussion | 39 |
| 6 | Ausblick..... | 42 |
| 7 | Anhang | i |
| 7.1 | Oligonukleotide | i |
| 7.1.1 | Klonierungsprimer..... | i |
| 7.1.2 | Sequenzierungsprimer | ii |
| 7.2 | Gensequenzen der klonierten GOI | ii |
| 7.3 | Western-Blots..... | vi |
| 7.4 | FACS-Rohdaten | ix |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | xi |
| | Literaturverzeichnis..... | xiii |
| | Danksagung..... | xvi |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | xvii |

Zusammenfassung

Bereits 1983 ist erstmals der Typ 1 des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) beschrieben worden. Bisher besteht keine Chance auf Heilung. Verfügbare Medikamente schaffen es zwar, den Virustiter unter die Nachweisbarkeitsgrenze zu bringen, aber das Virus kann sich nach Absetzen der Medikamente wieder ausbreiten. Grund dafür ist die Reservoirbildung von HIV in inaktivierten Gedächtniszellen. Die angeborene Immunantwort des Körpers gegen das HI-Virus wird, noch bevor das adaptive Immunsystem involviert ist, aktiviert und könnte neue Behandlungsansätze liefern. Ein Teil dieser natürlichen Immunantwort sind die Restriktionsfaktoren. Diese zellulären, antiviralen Proteine sind ein Teil unserer angeborenen Immunantwort gegen virale Infektionen. Das Finden und Untersuchen von weiteren Restriktionsfaktoren könnte daher vielversprechend für die HIV-Forschung sein. Die Expression von Restriktionsfaktoren wird oft stimuliert, nachdem die Zelle durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMP) detektiert hat. Eine Familie solcher PRRs sind die *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Es wurde bereits gezeigt, dass die TLR 7/8 das virale Genom von HIV erkennen können, und dass die Stimulierung von TLR7/8 durch einen Agonisten (Resiquimod, R848) eine HIV-1 Restriktion hervorruft. Dieser antivirale Block ist neuartig und kann keinem der bisher bekannten Restriktionsfaktoren zugeordnet werden. Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Kandidaten für diesen unbekanntesten Restriktionsfaktor auf deren antivirale Aktivität zu testen. Mittels eines Illumina RNA-Tiefen-Sequenz-Screenings wurde eine Transkriptom-Analyse durchgeführt. Die Analyse identifiziert und ordnet hochregulierte Gene ihrer Expressionsstärke nach Stimulierung der TLR7/8. In dieser Arbeit wurden nun acht hochregulierte Gene ausgewählt und analysiert, die die bislang unbekannteste TLR 7/8 Restriktion gegen HIV-1 verursachen könnten. Kriterien von diesen acht Genen waren Proteindomänen von bekannten Restriktionsfaktoren, wie die SAM-Domäne, oder bekannte katalytische Aktivitäten der Genprodukte, wie z.B. Ubiquitin Ligase Aktivität. Daraus resultierte die Selektion der Gene SAMD9, SAMD9L, SAMS1, LAP3, UBE2L6, CMPK2 und HERC5. Um diese als genetisches Material zu erhalten, wurden aus primären humanen R848-stimulierten Monozyten die RNA isoliert und in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Gene wurden aus der cDNA amplifiziert und in ein lentivirales Vektorkonstrukt kloniert. Die Expression wurde in HEK-293T Zellen getestet. In ein Experiment wurde nun mit pseudotypisierten GFP und Luciferase-Reporterviren die Infektiosität in HEK-293T der gewählten Gene mit einem Kontrollplasmid verglichen werden. In HEK-293T Zellen zeigte dies keinen signifikanten Unterschied zu dem Kontrollplasmid. Bislang konnte daher die unbekannteste Restriktion noch nicht identifiziert werden. Um die Restriktionsfaktorkandidaten definitiv auszuschließen, werden noch weitere Untersuchungen in monozytären Zelllinien, wie die U937 Zelllinie, vonnöten sein. Die Entdeckung eines neuartigen Restriktionsfaktors würde das Verständnis des Replikationszyklus von HIV weiter aufschlüsseln und vielleicht einen Ansatz für eine Therapie liefern.

Abstract

Since the description of the type 1 of the human immunodeficiency virus (HIV) in 1983, potent antiretroviral drugs are available that reduce the virus level under the detection limit. However, after discontinuation of the medication the infection breaks out again. The reason for that is the formation of HIV reservoirs in inactive memory-cells. The innate immune response of the body takes action before the adaptive immune system is involved and may allow for new treatment approaches. One part of the innate immune response are the so called restriction factors. These are cellular antiviral proteins that act against viral infections. To find and study new restriction factors can be a promising approach for HIV treatment. The cellular expression of restriction factors is often induced after the pattern recognition receptors (PRR) are stimulated by pathogen-associated molecular patterns (PAMP). One protein family PRRs are the toll-like receptors (TLR). It has already been shown that TLR 7/8 can recognize the viral RNA genome of HIV and that the stimulation of TLR 7/8 by their agonist (resiquimod, R848) results in the restriction of HIV-1. This antiviral block is novel and cannot be associated with any of the known restriction factors. The goal of this bachelor thesis is to find possible candidates for this unknown restriction factor and test their antiviral activity. Through illumina deep RNA sequencing a transcriptome analysis was performed. The analysis identified upregulated genes of and ranked those based on their expression level after stimulation with TLR 7/8. In this bachelor thesis we choose eight upregulated genes and analyzed their antiviral activity against HIV-1. Criteria for choosing these eight candidates were protein domains similar to those of known restriction factors like the SAM-domain or their catalytic activity such as ubiquitin ligase activity. We selected the genes SAMD9, SAMD9L, SAMS1, LAP3, UBE2L6, CMPK2 and HERC5. To get the genetic material of these genes I isolated RNA from primary human monocytes that were stimulated by R848 and transcribed the mRNA into complementary DNA (cDNA). Using the cDNA I amplified the genes of interest and cloned them into a lentiviral construct. The expression was tested in HEK-293T cells. Using pseudo-typed GFP and luciferase reporter virus I tested the infectivity of HIV-1 in HEK-293T cells transfected with the expression plasmids of the chosen genes of interest. None of the genes picked showed a significant antiviral activity compared to the control plasmid in HEK293T cells. In future experiments it will be essential to test the antiviral activity of these genes in a cell line closer to human monocytes, such as the monocytic U937 cells. The discovery of a novel restriction factor would improve our understanding of the replication cycle of HIV and may allow for a new approach for antiviral therapy.

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) bezeichnet membranumhüllte Viruspartikel, die als Genom einzelsträngige plusstrangorientierte-RNA besitzen. Charakteristisch für diese Familie ist der Schritt der reversen Transkription. Bei diesem Vorgang kommt es zu einem Umschreiben der RNA in doppelsträngige DNA, gefolgt von der Integration in das Genom der Wirtszelle. Das widerspricht dem zentralen Dogma vom unidirektionalen Fluss der genetischen Information (DNA → RNA → Proteine) und war der Grund für den taxonomischen Namen dieser Virusfamilie (*Retroviridae*; „retro“ = lat.: zurück, rückwärts). Die *Retroviridae* sind in zwei Unterfamilien unterteilt, die *Orthoretrovirinae* und die *Spumavirinae*. Wobei die *Orthoretrovirinae* aus den sechs Genera α^- , β^- , δ^- , ϵ^- , γ^- -Retroviren und Lentiviren bestehen. Die Benennung der Lentiviren (lat.: *lentus* = langsam) erfolgte aufgrund dessen, dass diese Viren funktionsmindernde Krankheiten mit langsam fortschreitenden und zum Teil lang andauernde Latenzphase bewirken. Wichtige Vertreter der Lentiviren sind die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2. Die integrierte Virus-DNA im Wirtsgenom wird als Provirus bezeichnet und dient als Template für die mRNA-Synthese. Die Übertragung der Retroviren kann nicht nur horizontal als freigesetztes Partikel, sondern auch vertikal in die nächste Generation erfolgen, wenn im Genom der Keimbahnzellen Proviren integriert sind. Man unterscheidet demnach zwischen endogenen und exogenen Formen (2).

Die überwiegenden Ziele retroviraler Infektionen sind teilungsaktive eukaryotische Zellen von Wirbeltieren, wobei das humanpathogene HI-Virus eine Ausnahme darstellt, weil es auch ruhende Zellen infizieren kann. Die Symptome nach einer Retrovirusinfektion sind sehr variabel und reichen oft von harmlosen Infektionsverläufen bis zu schwerwiegenden Immundefizienzen, Tumorerkrankungen oder neurologischen Defekten (2).

1.2 Das humane Immundefizienz-Virus (HIV)

1981 wurde eine unbekannte Immundefizienz diagnostiziert, die sich durch schwerwiegende opportunistische Infektionen äußerte. Im Folgejahr wurde die weiterhin unbekannte Immunschwäche als *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) beschrieben (3). Zwei Jahre später wurde erstmals ein Retrovirus aus der Probe eines an AIDS erkrankten Patienten isoliert (4) welches ein Jahr später als Erreger der Krankheit identifiziert werden konnte (5). 1985 erhielt das Retrovirus letztendlich den Namen *human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) (6). Währenddessen wurde ein weiterer Erreger des Immunschwächesyndroms, der HIV Typ-2 Erreger, in Westafrika entdeckt (7). HIV-1 ist in

vier Gruppen (M, N, O, P) unterteilt und stammt von dem *simianen Immundefizienzvirus* (SIV) ab (8, 9).

Laut Schätzungen lebten 2015 weltweit 36,7 Mio. Menschen mit einer HIV-Infektion. Die Zahl der Todesfälle belief sich auf 1,1 Mio. (10). Derzeit infizieren sich weltweit 2,1 Mio. Menschen jährlich mit HIV, davon 3200 deutschlandweit (Jahr: 2015) (10, 11). Die Infektion kann durch eine antiretrovirale Therapie zwar eingedämmt werden, bis zum heutigen Zeitpunkt ist sie jedoch unheilbar.

1.2.1 HIV-Infektion und AIDS

Die HIV-Infektion erfolgt durch infektiöse Körperflüssigkeiten und in den meisten Fällen über Sexualkontakte. Zugleich kann das Virus über kontaminiertes Blut bei Transfusionen, Injektionsnadeln, z.B. beim Drogenkonsum, sowie bei der Geburt oder des Stillens von Babies übertragen werden. Ein Infektionsrisiko stellen nicht nur die freien Viruspartikel, sondern auch bereits infizierte Zellen dar. HI-Viren lassen sich nicht über Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen, sodass HIV, im Vergleich zu anderen Krankheitserregern, oft als schwer übertragbar bezeichnet wird. Die Übertragbarkeit des Virus sollte jedoch nicht unterschätzt werden, denn die Gefahr der Übertragung über die oben genannten Wege ist gerade bei hohen Viruslasten sehr groß (2, 12).

Der Verlauf der HIV-Infektion lässt sich in die folgenden drei Phasen einteilen (→Abb.1)

Die erste Phase (*Primärinfektion*) dauert ca. einen bis sechs Monate an und verläuft häufig unauffällig. Es können grippeähnliche Symptome wie Fieber, Gelenkschmerzen Lymphknotenschwellungen und eventuell auch Hautausschlag, auftreten. In dieser Phase befinden sich große Virusmengen im Blut und die CD4⁺-Lymphocyten-Anzahl sinkt vorübergehend etwas, steigt jedoch zum Ende dieser Phase wieder an. Da die Viruslast in dieser Phase extrem hoch ist, ist auch das Übertragungsrisiko höher als im weiteren Verlauf der Infektion (13).

Die zweite Phase nennt sich *Latenzphase* und kann durchschnittlich 10 Jahre andauern. Der Patient ist in dieser Phase in einem symptomfreien Zustand. Durch die Immunantwort sinkt die Viruslast im Blut und die CD4⁺-Zellzahl nimmt nur sehr gering im Laufe der Jahre ab. Insgesamt herrscht im Körper des Infizierten ein Gleichgewicht zwischen Virusreplikation, mit dem zu folgenden Zelltod und der Produktion neuer CD4⁺-Zellen (2).

In der letzten Phase, sogenannten *symptomatischen Phase*, kommt es zur Immunschwäche und das AIDS-Krankheitsbild tritt hervor. Die CD4⁺-Zellzahl nimmt rapide ab während die Viruslast im Blut wieder zunimmt. Durch die Schwächung des Immunsystems kommt es zu HIV-assoziierten Infektionen wie Pilzinfektionen, Gürtelrose oder bakterieller Lungenentzündung. Sinkt die CD4⁺-Zellzahl unter ein bestimmtes Level, ca.200 Zellen/ μ l, so treten AIDS-opportunistische Krankheiten, wie z.B. Kaposi-Sarkom oder Candida-Infektion, auf. Die erforderliche Vielfalt an spezifischen Antikörpern ist

im Körper dann nicht mehr gegeben und verschiedenste Keime können sich vermehrt im Körper ausbreiten. Opportunistische Krankheiten sind demnach Infektionen, die nur bei Menschen mit einer Immunschwäche zu einer Erkrankung führen. Letztlich versagt das Immunsystem, wobei eine mögliche Ursache der drastische Verlust der $CD4^+$ -T-Zellen ist. Der Patient erliegt dabei einer der opportunistischen Infektionen (2, 12-14).

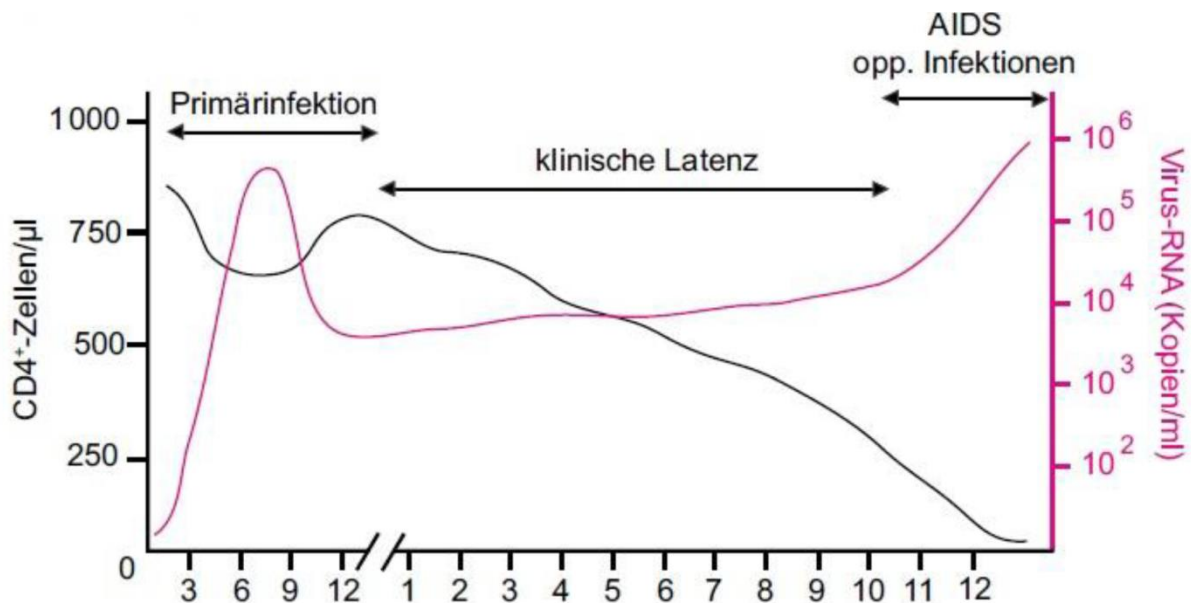


Abbildung 1: Verlauf einer natürlichen HIV Infektion

Während der Primärinfektion steigt zunächst die Viruslast drastisch an, wodurch die $CD4^+$ Zellenanzahl abnimmt. Das Immunsystem dämmt das Virus ein, die Viruslast sinkt, jedoch bilden sich Reservoir und das Virus kann Jahrzehnte in einer latenten Phase bleiben. Mit der Zeit nimmt die $CD4^+$ -Zellkonzentration ab. Zuletzt steigt die Viruslast im Blut wieder an. Die $CD4^+$ -Zellzahl nimmt rapide ab und die Infektion mit Symptomatik der AIDS Erlangung auf, worauf Infektionen von opportunistischen Infektionen folgen (2).

Trotz verschiedener Therapien ist es, bis auf einen Ausnahmefall (15), bis heute nicht gelungen, HIV-Infektionen komplett zu heilen. Der Grund dafür sind die HIV-Reservoir; bestimmte Zellen mit integriertem HI-Provirus, welche von den Medikamenten bei der antiretroviralen Therapie nicht beeinflusst werden. Die Ursache dafür liegt darin, dass die Proviren inaktiv sind. Sie exprimieren keine viralen Proteine und stellen dadurch für das Immunsystem keinen Unterschied zu gesunden T-Zellen dar. Es wurde festgestellt, dass auf zellulärer Ebene vor Allem ruhende, latent infizierte $CD4^+$ – Gedächtnis-T-Zellen (*Memory T cells*) als HIV-Reservoir dienen (16). Dabei bildet sich die Latenz aus, nachdem aktivierte $CD4^+$ - T-Zellen mit HIV infiziert wurden und kurz darauf, bevor sie eliminiert werden, zu Gedächtniszellen werden. Somit sind diese Zellen dann für das Immunsystem unauffällig, bis sie von einem Antigen reaktiviert werden und erneut Viren produziert werden können (→Abb.2).

HIV-Reservoirie erlauben also trotz Therapie den Fortbestand replikationskompetenter Viren, was bedeutet, dass bei einer Therapiepause wieder eine vermehrte Virusproduktion stattfinden kann (17-22).

Ziel ist es eine Möglichkeit zur Eradikation (*Keimeliminierung*) von HIV zu finden. Dafür ist es notwendig HIV daran zu hindern sich in das Wirtszellgenom zu integrieren, in ruhenden Gedächtniszellen zu reaktivieren, wie es bei der „Shock and Kill“-Methode der Fall ist (23) oder die Provirale RNA im Genom epigenetisch still zulegen. Letzten Endes sollte die Expression der Viralen Proteine und damit neuer Virionen verhindert werden (24).

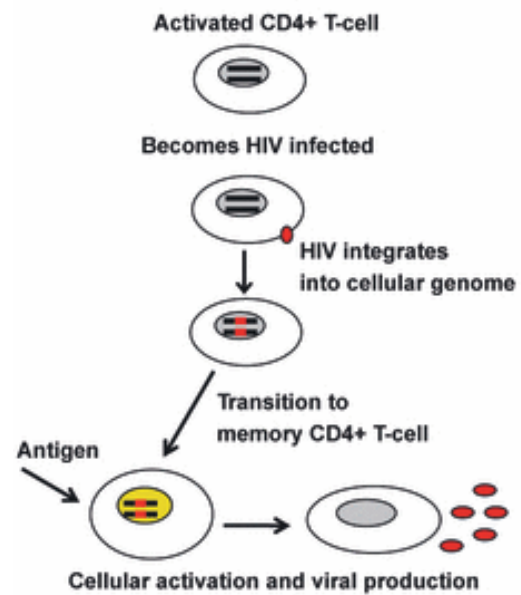


Abbildung 2: CD4+ T-Gedächtniszellen als HIV-Reservoir

Eine aktivierte CD4⁺-T-Zelle wird durch HIV infiziert und entwickelt sich danach zu einer Gedächtniszelle, welche durch Antigene reaktiviert werden kann. (1)

1.2.2 Morphologie und Genom von HIV-1

Die äußerste Schicht des HIV-1-Partikels (→Abb. 3) ist eine Hüllmembran. Ihr Ursprung stammt aus der Cytoplasmamembran. Auf ihr befindet sich extern das Glykoprotein 120 (gp 120) und in der Transmembran das Glykoprotein 41 (gp41). Die isometrische Struktur des Partikels beruht auf dem Matrixprotein (p17), welches an die Innenseite der Hüllmembran gebunden ist. Der Kern des Partikels bildet das Viruscapsid. Im Falle des lentiviralen Virus HIV-1 besitzt es eine konische Form, welches durch das Link-Protein (p6) mit der Hüllmembran verbunden ist. Die zwei identisch einzelsträngigen RNA's (ssRNA), die nicht miteinander verbunden sind und das Virusgenom darstellen, befinden sich zusammen mit reverse Transkriptase, Protease, Integrase und Nucleocapsidprotein im Capsid. Sie weisen alle Merkmale einer zellulären mRNA auf, eine 5'-CAP-Struktur zu Beginn und eine 3'-Polyadenylierung am Ende des RNA-Strangs (2, 25).

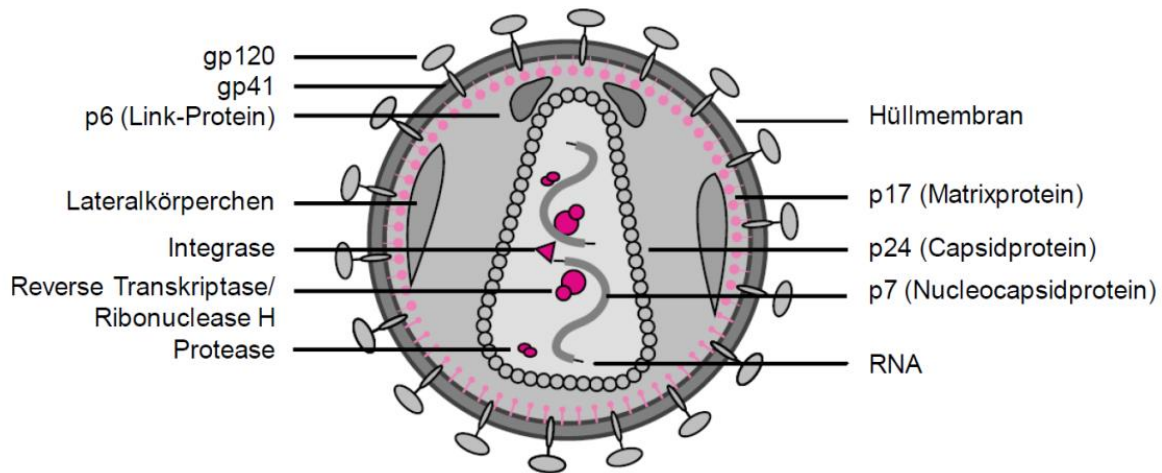


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines HIV-1 Partikels

Die Hüllmembran (mit gp120 und gp41) ist auf der Innenseite mit Matrixproteinen (p17) ausgekleidet. Das Capsid besteht aus Capsidproteinen (p24). Im Inneren befinden sich Link-Proteine (p6), Lateralkörperchen, Integrase, reverse Transkriptase bzw. Ribonuclease H und Protease. Das RNA-Genom (ssRNA) bildet mit Nucleocapsidproteinen (p7) einen Komplex. (2)

Das HIV-1 Genom (→Abb. 4) ist 9,7 kBp groß und codiert für gruppenspezifische Antigene (gag), Polymerase (pol) und Envelope (env), die von *long terminal repeats* (LTR) flankiert werden. Die pol Genregion codiert die Enzyme des Virus. Das gag Gen codiert die Capsid-, Matrix-, Link- und Nucleocapsid-Proteine, während der env Abschnitt für die extern- und transmembranen Glycoproteine verantwortlich ist. Die Proteine von Gag und env liegen zunächst als ein Polyprotein vor und werden erst in der späteren Reifung des Virus gespalten. Zusätzlich zu diesen Genen, welche alle infektiösen Retroviren besitzen, codiert das HIV-1 Genom noch regulatorische Proteine *trans-activator of transcription* (tat) sowie *regulator of expression of virion proteins* (rev) und akzessorische Proteine *viral infectivity factor* (vif), *viral protein rapid* (vpr), *viral protein out* (vpu) und *negative factor* (nef). Sie alle fördern die Infektiosität, indem sie die Replikation beschleunigen oder antivirale Proteine der Wirtszelle inhibieren (2, 25, 26).

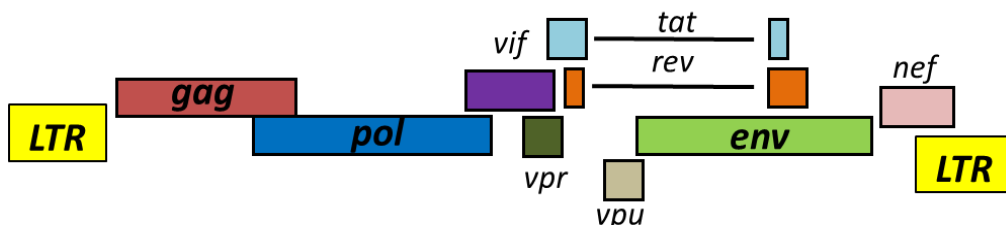


Abbildung 4: HIV-1 Genom

Das Genom von HIV-1 codiert für Strukturproteine (gag, pol, env), regulatorische Proteine (tat, rev) und akzessorische Proteine (vif, vpr, vpu, nef) und wird von zwei LTRs flankiert. Erstellt nach (2).

1.2.3 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus (→Abb. 5) von HIV beginnt nach dem Übertreten in die Blutbahn des Wirts. Durch das Glykoprotein gp120 bindet das Virus an einen CD4⁺-Rezeptor von Makrophagen oder T-Lymphozyten. Zum Verschmelzen der Hüllmembran des Virus mit der Zellmembran wird noch ein Chemokinrezeptor (CCR5 Makrophagen oder CXCR4 T-Lymphocyten) als Corezeptor benötigt. Nach dem Anbinden und Verschmelzen gelangt das Capsid in das Cytoplasma der Zielzelle (*Uncoating*). Im Cytoplasma erfolgt darauf die reverse Transkription des Virusgenoms, wonach das Virusgenom als doppelsträngige DNA vorliegt. Mithilfe des Matrixproteins p17 und des akzessorischen Proteins vpr gelangt die nun virale DNA durch die Kernporen in den Zellkern. Dies ist nur Lentiviren möglich. Anderen Retroviren ist dies nur in sich teilenden Zellen möglich. Im Zellkern wird nun die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom mithilfe der Integrase vorgenommen. Damit liegt das Virus dann als Provirus vor. Bis die Genexpression beginnt, kann das Provirus längere Zeit latent bleiben (→1.2.1). Nach Beendigung der Latenzphase erfolgt die Transkription der Provirus-DNA durch die humane RNA-Polymerase II. Die mRNA wird anschließend im Cytoplasma translatiert, woraufhin die synthetisierten viralen Proteine und die virale RNA sich anschließend zu unreifen Partikeln an der Zellmembran zusammenfügen (*assembly*) und durch Exozytose in den Extrazellularraum gelangen (*release*). Nach der proteolytischen Spaltung der Proteine und der Ausbildung des Capsids entstehen reife Viruspartikel, die in der Lage sind, weitere Zellen zu infizieren (*maturation*) (27-29).

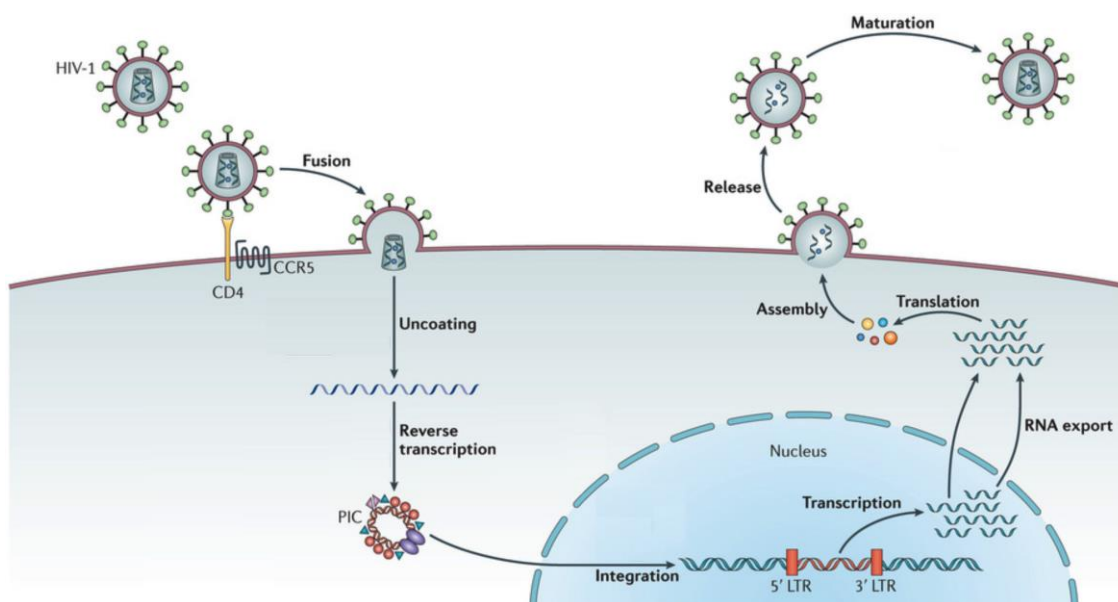


Abbildung 5: Replikationszyklus von HIV-1

Der Replikationszyklus von HIV-1 setzt sich aus den nachfolgenden Schritten zusammen: Anheftung an die Zielzellmembran und Eindringen in die Zelle, Verlust des Capsids, reverse Transkription, Integration in die Wirts-DNA, Transkription und RNA-Export, Translation, Zusammenschluss von viralen Proteinen und RNA-Genom zu unreifen Viruspartikeln, Knospung, Freisetzung und anschließende Reifung des HIV-1 Partikels. Modifiziert nach (30).

1.3 Angeborene Immunantwort

Wie bereits beschrieben, sind die Zielzellen des HI-Virus Zellen, deren Oberfläche einen CD4 – Rezeptor besitzt. Dies sind vor allem T-Lymphozyten aber auch Makrophagen (→1.2.3). Makrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems und maßgeblich an der Erregerabwehr beteiligt. Meist sind sie es, die ein Erreger zuerst erkennen und durch Phagozytose beseitigen. Dies ist ein Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr. Eine weitere Aufgabe der Makrophagen ist die Ausschüttung von Cytokinen, die eine Signalkaskade für weitere Immunantworten auslösen. Sie sind zudem in der Lage, Antigene anhand der von ihnen getöteten Zellen auf ihrer Zellmembran auszubilden, um anschließend von T-Helferzellen (T_H) erkannt zu werden und eine Antikörperproduktion auszulösen, indem sie die Antikörper-Synthese der B-Zellen induzieren. (14). T_H -Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem. Durch die Antigene werden auch naive T-Zellen (T_N) differenziert und zu Effektorzellen umgewandelt. In diesem ausdifferenzierten Zustand sind die Zellen in der Lage, die spezifischen Funktionen in der Immunabwehr auszuführen. Nach Abwehr der Antigene sterben etwa 95 % der T-Effektorzellen ab, während sich ein kleiner Teil dieser Zellen zu langlebigen Gedächtnis-T-Zellen entwickelt (31). Sollten diese Zellen zuvor durch HIV infiziert worden sein, sind sie ein Reservoir für den Virus (→1.2.1).

1.3.1 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*) des angeborenen Immunsystems. Sie sind in der Lage, molekulare Muster von Pathogenen (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) zu erkennen (32). PAMPs können Lipide, Kohlenhydrate, Nucleinsäuren oder Proteine sein, die als Ligand an ein TLR binden und ihn so aktivieren. Dies löst eine Reihe von Signalkaskaden aus, welche zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und der Expression von antiviralen Proteinen führt (33, 34). Sie befinden sich überwiegend auf Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen, aber auch auf T- und B-Zellen (35).

Die TLR7 und TLR8 erkennen virale einzelsträngige RNA, darunter auch die von HIV (36, 37). Bei einer Aktivierung dieser TLR werden als Immunantwort auf die Fremd-RNA antivirale Proteine, sogenannte Restriktionsfaktoren (→1.4) in der Zelle exprimiert. Sie sind in der Lage, einer möglichen Infektion entgegenzuwirken. Die Stimulation von TLR 7/8 löst auch eine Signalkaskade aus, welche in einer Expression von proinflammatorischen Zytokinen und der Ausschüttung von Interferon resultiert. Die Aktivierung der TLR 7/8 kann in vivo durch entsprechende Agonisten „künstlich“ ausgelöst werden. Durch die Stimulation von Imidazoquinolin Resiquimod (R848) lassen sich beide Rezeptoren gleichzeitig aktivieren (38-40).

1.4 Restriktionsfaktoren

Restriktionsfaktoren sind Proteine, die eine antivirale Wirkung besitzen. Neben der Aktivierung von bestimmten *Toll-like* Rezeptoren (→1.3) wird ihre Expression durch Interferon induziert. Es sind bisher verschiedenste Restriktionsfaktoren und ihre Wirkungen bekannt, doch gibt keiner bisher die Möglichkeit, die Infektion gänzlich zu verhindern. Grund dafür sind die verschiedenen akzessorischen Proteine (→1.2.2), welche als Antagonisten binden und die deren antiviralen Effekte inhibieren (→Abb. 6).

Die Restriktionsfaktoren Tetherin und APOBEC3 (*apolipoprotein B editing catalytic polypeptide-like 3*) sind dafür verantwortlich, die Vermehrung des Virus zu verhindern. APOBEC3 wird bei dem packaging Prozesses im Capsid mit verpackt und löst eine Desaminierung (Cytosin → Uracil-Mutationen) aus. Demnach kann die transkribierte DNA nicht mehr in das Wirtsgenom integriert werden. Das akzessorische Protein vif bindet an APOBEC3 und verhindert so dessen Verpackung in Viruspartikel und wirkt so deren Effekt entgegen (41).

Tetherin dagegen verhindert den *release* der Viruspartikel, indem es sich an die Zellmembran bindet. Dadurch kann das Virus den Reifeprozessen nicht durchlaufen und verhindert eine Infektion dieses Virion. Der virale Antagonist zu diesem Restriktionsfaktor ist das Protein vpu, welches Tetherin degradieren kann (42).

In sich nicht teilenden Zellen ist SAMHD1 (*sterile alpha motif histidine-aspartate-domain-containing protein 1*) hauptsächlich für eine Restriktion gegenüber HIV-1 verantwortlich. SAMHD1 ist eine Triphosphohydrolase die den dNTP-Pool in der Zelle kontrolliert. Die antivirale Wirkung beruht auf dem Absenken des dNTP-Pools und vermindert dadurch auch das Umschreiben der viralen RNA durch die Reversetranskriptase in DNA. (43). Der Restriktionsfaktor liegt unter anderem in Monozyten vor, seine Expression wird durch Interferon induziert (44). Das akzessorische Protein vpx von HIV-2 ist in der Lage SAMHD1 zu degradieren und die antivirale Wirkung zu inaktivieren (45, 46). Darum wurde vpx dazu genutzt HIV-1 Viren zu produzieren, die auch in der Lage sind inaktive Monozyten zu infizieren (47).

HIV-1 weist allerdings keinen Antagonisten gegenüber *Tripartite motif-containing protein 5* (Trim5) α auf (→Abb. 6). Allerdings handelt es sich dabei nicht um das humane TRIM5 α (huTRIM5 α), sondern um das analoge Rhesusaffen TRIM5 α (rhTRIM5 α). Das huTRIM5 α weist eine Restriktion gegen das *murine leukemia virus* (MLV) auf (48). Die Wirkung, wie die Proteine die Restriktion hervorruft, beruht auf der Bindung von TRIM5 α als E3 ubiquitin ligase an dem jeweiligen Virus Capsid (→Abb.6). Dabei beschleunigt es den *uncoating* Prozess des Capsid. Der genaue Mechanismus ist noch nicht genauer bekannt, jedoch geht man davon aus, dass durch das verfrühte *uncoating* die virale RNA von der Zelle degradiert werden kann (49). Zudem löst TRIM5 α eine Signalkaskade aus, indem es als ein PRR fungiert, welcher eine Immunantwort der Zelle auslöst (50). Grund, warum das huTRIM5 α HIV-

1 nicht blockiert, ist eine einzelne Aminosäuren Mutation in der SPRY-Domäne des Proteins. Bei einem Austausch dieser Aminosäure ist eine ähnliche Restriktion gegen HIV-1 wie rhTRIM5 α zu beobachten (48).

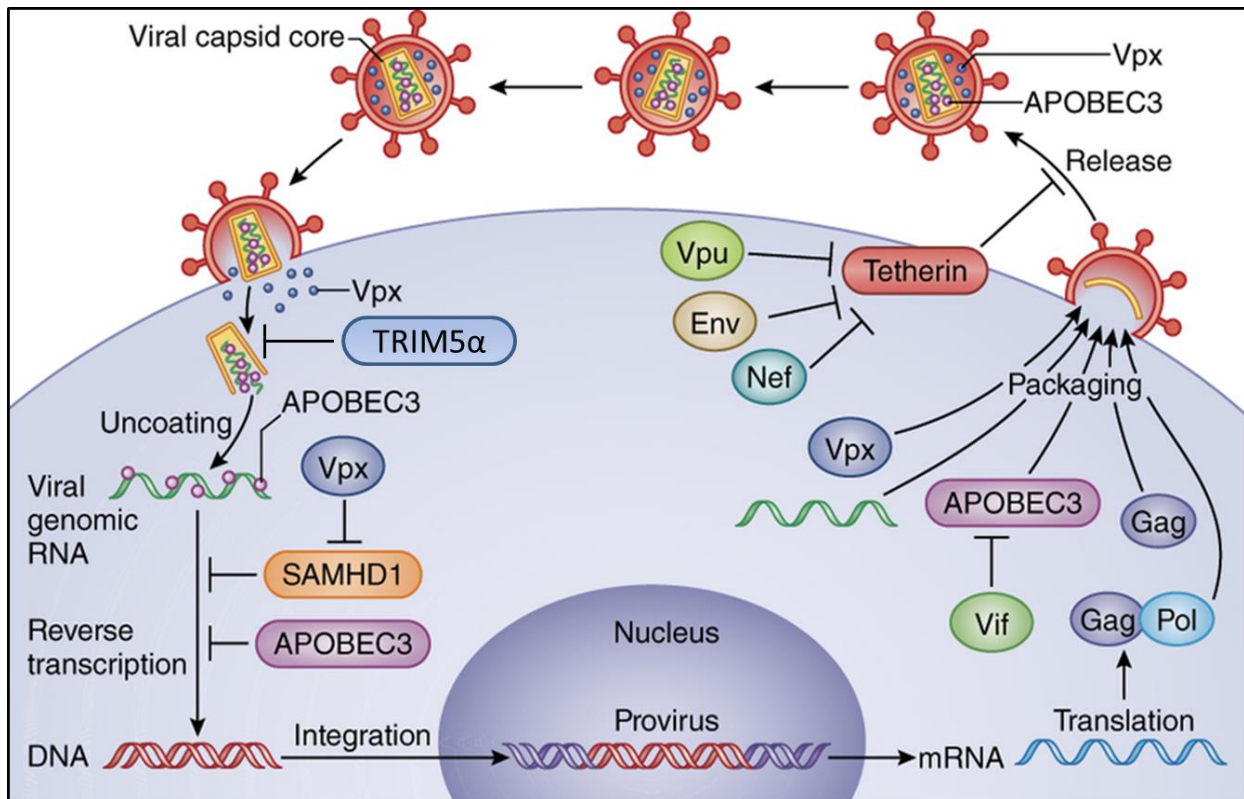


Abbildung 6: Wirkung verschiedener Restriktionsfaktoren im HIV-1 Replikationszyklus

Beim Eintreten des Capsid in die Zelle bindet TRIM5 α an dieses und beschleunigt dadurch das uncoating, welches zur Degradation der viralen RNA führt. SAMHD1 reguliert und senkt in inaktiven Zellen den dNTP-Pool, wodurch der Schritt der Reversentranskription verhindert wird. Das virale Protein vpx von HIV-2 kann SAMHD1 inhibieren. Bei dem packaging Prozess kann APOBEC3 im Capsid mitverpackt werden. Es löst Mutationen in der viralen DNA aus, wodurch diese in der nächsten infizierten Zelle defekt ist. Durch vif, ein weiteres virales Protein, kann APOBEC3 gebunden und blockiert werden. Tetherin bindet das Virion bei dem release aus der Zelle, wodurch eine Reifung des Virus verhindert wird. Vpu, env und nef sind Agonisten von Tetherin und hindern, dass es an dem Virion bindet. Abbildung modifiziert aus (51).

1.4.1 Der bislang unbekannte Restriktionsfaktor

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das Aktivieren der TLR 7/8 in Monozyten durch R848 eine HIV-1 Restriktion auslöst (\rightarrow Abb. 7) (52). Das Virus wird nach Eintritt in die Zielzelle, jedoch vor der reversen Transkription im Replikationszyklus gestoppt. Es konnte gezeigt werden, dass das virale RNA Genom wenige Stunden nach Viruseintritt in R848-behandelte Monozyten degradiert wird. Der genaue Restriktionsmechanismus ist bisher unbekannt. Um auszuschließen, dass SAMHD1

ursächlich für die Restriktion war, wurde die HIV-1 Infektion in Anwesenheit des SAMHD1 Antagonisten Vpx durchgeführt. Somit zeigt das Experiment, dass die durch TLR 7/8 ausgelöste Restriktion unabhängig von allen bisher bekannten Restriktionsfaktoren, welche für eine Restriktion in diesen Bereich des Replikationszyklus infrage kämen, verlief. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass ein bisher unbekannter Restriktionsfaktor der Ursprung dieser Restriktion gegenüber HIV-1 war (52).

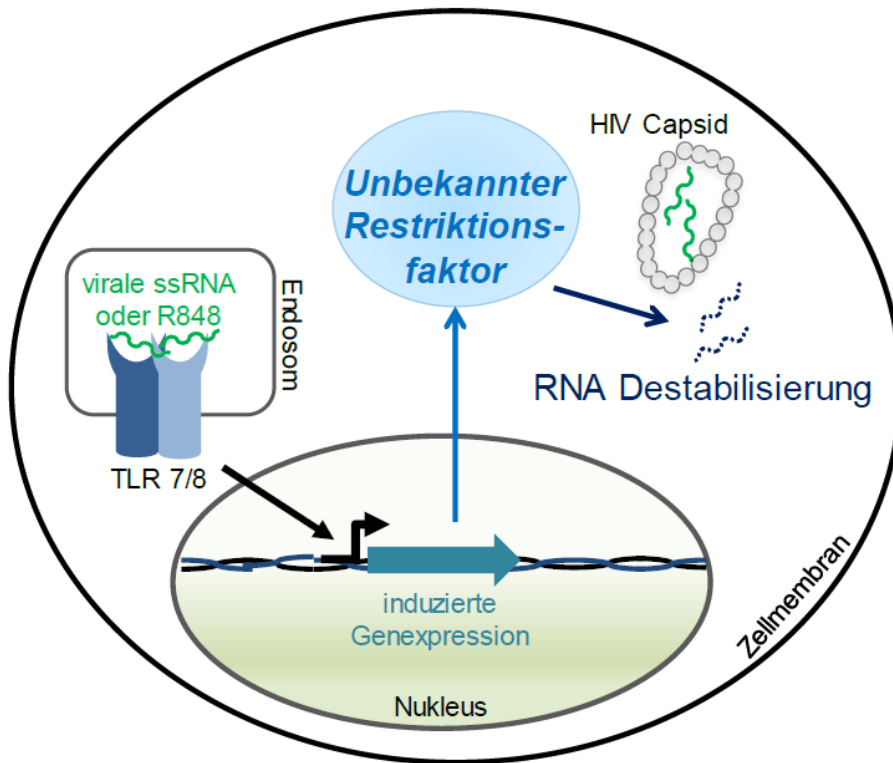


Abbildung 7: Aktivierung von TLR7/8 resultiert in Destabilisierung des HIV-1 Genoms

Die Aktivierung von TLR7/8 induziert einen neuartigen Restriktionsfaktor, der in der Lage ist, das virale RNA Genom von HIV-1 zu degradieren.

1.5 Zielsetzung

Bisherige Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung von TLR7/8 durch Resiquimod (R848) in infizierten Monozyten eine HIV-1 Restriktion herbeiführen. Diese Restriktion erfolgt interferonunabhängig und wird sehr wahrscheinlich durch einen neuartigen Restriktionsfaktor ausgelöst, der in der Lage ist, die virale RNA zu destabilisieren.

Zu Beginn dieser Arbeit lag eine Transkriptom-Analyse eines RNA-Tiefen-Sequenz-Screening vor, in dem Monozyten mit R848 und Interferon (IFN) α stimuliert und die hochregulierten RNA's ihrer Expressionsstärke nach geordnet wurden. Die Analyse war der Ausgangspunkt Proteine zu finden, die diese Restriktion auslösen. Es wurden acht potentielle Gene gewählt, welche der Ursprung einer solchen Degradation des HIV-1 Genoms sein könnten. Um dies zu analysieren, sollten nun diese Proteine bezüglich ihrer antiviralen Aktivität untersucht werden. Dafür ist es zunächst notwendig, die cDNA dieser Gene in lentivirale Expressionsvektoren zu klonieren. Die Vektoren sollten später eine hohe Transduktionseffizienz aufweisen können, um zukünftig auch Experimente in monozytären Zelllinien zu ermöglichen. Durch Stimulierung von Monozyten mit R848 und anschließender RNA-Extraktion mit Umschreiben in cDNA sollen die hochregulierten Gene mit einer PCR aus der cDNA amplifiziert werden. Dabei sollen die Gene mit einem *human influenza hemagglutinin* (HA)-Tag versehen werden, um die Proteinexpression in einem Western-Blot nachweisen zu können. Um zukünftig stabile monozytäre Zelllinien in U937 Zellen herzustellen, sollen die Gene in ein pLenti-Vektorkonstrukt kloniert werden, welches die Herstellung von lentiviralen Gentransfervektoren ermöglicht. Entscheidendes Ziel dieser Arbeit soll sein, in einem ersten Infektionsversuch mit pseudotypisierten VSV-g (*vesicular stomatitis virus glykoprotein*) Reporterviren in HEK-293T Zellen durchzuführen, die zuvor mit den Expressionsvektoren der verschiedenen Kandidatengene transfiziert wurden. Damit sollten erste Erkenntnisse über eine mögliche antivirale Aktivität dieser Proteine aufgezeigt werden.

2 Material

2.1 Antibiotika

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antibiotika und der entsprechenden Bezugsquellen

| Antibiotikum | Bezugsquelle |
|--|------------------------|
| Ampicillin | Carl Roth, Deutschland |
| Carbencillin | Carl Roth, Deutschland |
| HyClone Penicillin/Streptomycin-Lösung | GE Healthcare, UK |
| Puromycin | InvivoGen, USA |

2.2 Antikörper

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Antikörper und der entsprechenden Bezugsquelle

| Antikörper | Organismus | Bezugsquelle |
|---|------------|--------------------|
| Anti-GAPDH Antibody G9545 | Hase | Sigma-Aldrich, USA |
| IRDye® 680LT Donkey anti-Mouse IgG | Maus | LI-COR, USA |
| IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG | Hase | LI-COR, USA |
| Monoclonal Anti- α -Tubulin antibody T9026 | Maus | Sigma-Aldrich, USA |
| Purified anti-HA. 11 Epitope Tag Antibody | Maus | BioLegend, USA |

2.3 Bakterienstamm

Es wurden mit One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* von der Firma Thermo Fisher Scientific gearbeitet. Es wurde sich für diese Zellen entschieden, da sie für die Transformation von Lentiviralvektoren besonders geeignet sind. Sie versprechen zudem eine hohe Ausbeute des Plasmids. Zudem soll in ihnen keine Rekombination der Vektoren vorkommen, wofür Lentiviralevektoren anfällig sind.

2.4 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und der entsprechenden Hersteller

| Chemikalien | Hersteller |
|---------------------------------|------------------------|
| Acrylamid | Carl Roth, Deutschland |
| Agarose | Peglab, Deutschland |
| APS | Carl Roth, Deutschland |
| DTT | Carl Roth, Deutschland |
| EDTA | Sigma-Aldrich, USA |
| Ethanol | Carl Roth, Deutschland |
| Ethidiumbromid | Roche, Schweiz |
| Glycerin | Carl Roth, Deutschland |
| Isopropanol | Carl Roth, Deutschland |
| Methanol | Carl Roth, Deutschland |
| Milchpulver, fettarm | Carl Roth, Deutschland |
| Nevirapin | Sigma-Aldrich, USA |
| PEI | Sigma-Aldrich, USA |
| PMA | Sigma-Aldrich, USA |
| Protease-Inhibitor (Tabletten) | Roche, Schweiz |
| SDS-Pellets | Carl Roth, Deutschland |
| TEMED | Carl Roth, Deutschland |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | Carl Roth, Deutschland |
| Triton X-100 (NP40) | Carl Roth, Deutschland |
| Tween 20 | Carl Roth, Deutschland |

2.5 Enzyme

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Enzyme und der entsprechenden Bezugsquelle

| Enzyme | Bezugsquelle |
|---|-------------------------------|
| BamHI | New England Biolabs, USA |
| CloneAmp™ HiFi PCR Premix | TAKARA BIO, Japan |
| FastDigest BamHI | Thermo Fisher Scientific, USA |
| FastDigest EcoRI | Thermo Fisher Scientific, USA |
| FastDigest Sall | Thermo Fisher Scientific, USA |
| FastDigest XbaI | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Mung Bean Nuclease | New England Biolabs, USA |
| Phusion High-Fidelity DNA Polymerase | Thermo Fisher Scientific, USA |
| RevertAid H Minus Reverse Transcriptase | Thermo Fisher Scientific, USA |

| | |
|---------------|-------------------------------|
| SalI-HF | New England Biolabs, USA |
| ScaI | New England Biolabs, USA |
| SmaI | New England Biolabs, USA |
| T4-DNA-Ligase | Thermo Fisher Scientific, USA |
| XbaI | New England Biolabs, USA |

2.6 Größenstandards

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Größenstandards und der entsprechenden Hersteller

| Marker | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, USA |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Prestained Plus Protein™ Dual Color Standards | Bio-Rad, USA |

2.7 Kits

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kits und der entsprechenden Hersteller

| Kit | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| GeneJET Gel Extraction Kit | Thermo Fisher Scientific, USA |
| GeneJET Genomic DNA Purification Kit | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Luciferase-Assay | Promega, USA |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | QIAGEN, Deutschland |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | QIAGEN, Deutschland |
| RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Fisher Scientific, USA |
| RNeasy Mini Kit | QIAGEN, Deutschland |

2.8 Laborgeräte

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und der entsprechenden Hersteller

| Gerät | Modell | Hersteller |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Analysewaage | PR803 | Sartorius, Deutschland |
| MJ Mini 48-Well Personal Thermocycler | PTC1148EDU | Bio-Rad, USA |
| Elektrophoresekammer | Mini-Sub Cell GT | Bio-Rad, USA |
| Elektrophoresekammer | Mini-PROTEAN Tetra Cell | Bio-Rad, USA |

| | | |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|
| FACS Calibur | E3476 | Becton Dickinson, USA |
| Filterpapier | Extra thick blot paper | Bio-Rad, USA |
| Geldokumentation | Quantum 1000 | Peqlab, Deutschland |
| Inkubator | HeraCell 240 | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Membrandokumentation | Odyssey | LI-COR, USA |
| Mikroplatten Luminometer | Centro LB 960 | Berthold, Deutschland |
| Mikroskop | Eclipse TS100 | Nikon, Japan |
| Mikrozentrifuge | Galaxy Mini | VWR, USA |
| Mikrozentrifuge | 5415R | Eppendorf, Deutschland |
| Mikrozentrifuge | 5424 | Eppendorf, Deutschland |
| Nitrocellulose-Membran | 0,45 µm | Bio-Rad, USA |
| Pipettierhilfe | Pipet Boy 2 | Integra, Schweiz |
| PowerPac Basic | | Bio-Rad, USA |
| PowerPac HC | | Bio-Rad, USA |
| Schüttelinkubator | Innova 4200 | New Brunswick Scientific, USA |
| Schüttler | 3016 | GFL, Deutschland |
| Spektrophotometer | NanoDrop 1000 | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Sterilwerkbank | Safe 2020 | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Thermomixer | 5436 | Eppendorf, Deutschland |
| Tischkühlzentrifuge | 4K15 | Sigma, Deutschland |
| Tischkühlzentrifuge | Biofuge Primo R | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Tischzentrifuge | Heraeus Pico 17 | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Trans-Blot SD transfer cell | | Bio-Rad, USA |
| Vortex-Schüttler | 444-1372 | VWR, USA |
| Wasserbad | 3043 | Köttermann, Deutschland |
| Zentrifuge | 5804R | Eppendorf, Deutschland |

2.9 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Lösungen, Puffer und Nährmedien und der entsprechenden Zusammensetzung/Hersteller

| Puffer, Lösungen und Medien | Zusammensetzung/Hersteller |
|---|-------------------------------|
| 1% PFA-Lösung | PBS + 1% Formaldehyd |
| 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well 30µl u. 15-well 15µl | Bio-Rad, USA |
| 16% Formaldehyd -Fixierlösung | Thermo Fisher Scientific, USA |
| 5x Phusion GC Buffer | Thermo Fisher Scientific, USA |
| 5x Phusion HF Buffer | Thermo Fisher Scientific, USA |

| | |
|----------------------------------|---|
| 6x Ladepuffer (Western Blot) | Bromphenolblau + Glycerin + DTT (1:20) |
| 10x CutSmart®Buffer | New England Biolabs, USA |
| 10x FastDigest Green Buffer | Thermo Fisher Scientific, USA |
| 10x Laufpuffer | 0,25 M Tris + 1,9 M Glycin + 1 % SDS |
| 10x PBS | Nährbodenzentrale des RKI, Deutschland |
| 10x T4 Ligase Buffer | Thermo Fisher Scientific, USA |
| 10x Transferpuffer | 80% 1x Laufpuffer + 20% Methanol |
| Blocking-Puffer | Waschpuffer + Milchpulver (5 %) |
| DMEM | Nährbodenzentrale des RKI, Deutschland |
| DMEM-Vollmedium | DMEM + FKS (10 %) + Penicillin/Streptomycin-Lösung (1 %) |
| DNA Ladepuffer, 6x (Agarose Gel) | 10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) |
| FACS Buffer | PBS, 1% BSA, 0,1 NaN ₃ , steril filtriert |
| FKS | Biochrom, Deutschland |
| LB-Agar | Nährbodenzentrale des RKI, Deutschland |
| LB-Medium | LB-Medium + Ampicillin (50 µg/ml) |
| Lysepuffer | NP40 (0,5 %) + EDTA (2 mM) + HEPES (50 mM) + KCl (150 mM) + PI (1 Tablette/25 ml) |
| RPMI-1640 | Nährbodenzentrale des RKI, Deutschland |
| RPMI-1640 + Puromycin | RPI-1640 + FKS (10 %) + Penicillin/Streptomycin-Lösung (1 %) + 50 ng/mL Puromycin |
| SOB-Medium | 20 g Trypton, 5 g Bacto Hefe Extract, 0,186 g KCl bzw. 2,5 ml 1 M KCl-Lösung, 0,584 g NaCl bzw. 10 ml 1 M NaCl-Lösung ad. 970 ml H ₂ O, pH 7,0 |
| SOC-Medium | 9,7 Teile SOB, 0,1 Teil Mg-Mix, 0,2 Teile Glukose |
| TAE, 1x | 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2 |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, USA |
| Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) | Biochrom, Deutschland |
| Waschpuffer | 4,5 l ddH ₂ O + 0,5 l 10x PBS + 0,05 l Tween 20 |

2.10 Oligonukleotide (Primer)

Die Anwendung der Oligonukleotide bezog sich auf Sequenzierungen, Amplifikations- und Mutagenese-PCR-Reaktionen. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt. Nach der Lieferung wurden die gefriergetrockneten Primer auf eine Konzentration von 100 μM gebracht und bei 4° C in einem Kühlblock für 15 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden die Primer auf die einsatzfähige Endkonzentration von 10 μM verdünnt und bei - 20° C gelagert. Eine detaillierte Auflistung mit der jeweiligen Primersequenz und Verwendung ist im Anhang (\rightarrow 7.1) zu finden.

2.11 Plasmide/Vektoren und Reporterviren

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Plasmide/Reporterviren und der entsprechenden Bezugsquelle

| Konstruktname | Vektor | Bezugsquelle |
|--|--------|---------------------------|
| CMV GFP puro | pLenti | Addgene, USA |
| CMV HA-CMPK2 Vers. 1 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-CMPK2 Vers. 2 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-HERC5 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-LAP3 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-SAMD9 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-SAMD9L puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-SAMSN1 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-UBE2L6 Vers. 1 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| CMV HA-UBE2L6 Vers. 2 puro | pLenti | Nicolas Arnow |
| empty puro | pLenti | Dr. Henning Hofmann |
| HIV.GFPe ⁻ r ⁻ + VSV-g | pUC19 | Dr. Henning Hofmann |
| NL.luc3.SIVp6.e ⁻ r ⁻ + pcDNA + pVSV-g | pUC19 | Dr. Henning Hofmann |
| rhesusTRIM5 α | pcDNA | Prof. Dr. Thomas Gramberg |

2.12 Software

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software und der entsprechenden Hersteller

| Software | Version | Hersteller |
|-----------------|---------|-------------------------|
| CMU FireCam | V 2.03 | PHASE, Deutschland |
| FLowJo | 9.4.11 | FLOWJO,LLC, USA |
| Geneious | 10.0.5 | Biomatters, Neuseeland |
| Graph Pad Prism | 7.03 | Graph Pad Software, USA |
| Image Studio | V5.2.5 | LI-COR, USA |

| | | |
|------------------|--------|------------------------------------|
| Microsoft Office | 2010 | Microsoft, USA |
| MikroWin2010 | 5.15 | Mikrotek Laborsysteme, Deutschland |
| ND1000 | V3.8.1 | Thermo Fisher Scientific, USA |

2.13 Zellen

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primärzellen/Zellline und der entsprechenden Ursprung

| Primärzellen/Zellline | Organismus | Ursprung |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| HEK 293T | Mensch | Niere |
| Primäre humane Monozyten | Mensch | Anonyme Blutspenden des DRK |
| U937 | Mensch | Histiozytäres Lymphom |

3 Methoden

3.1 DNA-Analytik

3.1.1 RNA-Extraktion

Zur Extraktion von RNA wurde das RNeasy Mini Kit (→2.4) verwendet. Die Arbeitsschritte wurden nach den Vorgaben des Herstellers für $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen durchgeführt. Die RNA wurde aus der RNeasy spin Säule in 50 µl RNase-freies Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.2 Vollängen cDNA-Synthese

Um die isolierte RNA in die stabilere cDNA umzusetzen, ist eine Vollängen cDNA-Synthese vonnöten. Dafür wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Die Arbeitsschritte wurden nach den Vorgaben des Herstellers mit 2,2 µg RNA-Template durchgeführt. Nach der Termination der Reaktion für die Transkriptase sollten nun sämtlich RNA vollständig in cDNA umgeschrieben worden sein. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.1.3 Bestimmung der RNA und DNA-Konzentration

Die RNA und DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer des NanoDrop (→2.8) bestimmt. Die automatische Messung der RNA und DNA erfolgte bei 260 nm. Durch die Messung bei 280 nm (Proteine) und 230 nm (Alkohole) wurde die Reinheit der Probe geprüft. Bei der Messung wurde die Flüssigkeit, in welcher die Probe gelöst wurde, als Referenz genutzt.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein analytisches Trennverfahren, mit dem DNA-Fragmente durch das Anlegen einer elektrischen Spannung der Größe nach aufgetrennt werden. Um ein 1 % (w/v) Agarosegel herzustellen, wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml Endkonzentration) versetzt und bis zur Aushärtung in

eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Anschließend wurden die PCR oder Restriktionsverdau Produkt mit dem Laufpuffer zusammen mit einem DNA-Größenstandard (→2.6) in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 80-100 V für ca. 30-60 Minuten in der Gelkammer (→2.8) mit anliegender Spannung. Die Dauer war abhängig von der Größe der erwarteten Banden. Je größer die erwarteten Banden sind, desto länger ist das Auftrennen der Banden notwendig. Nach Anfertigung eines Fotos mit Hilfe der Geldokumentationskammer (→2.8) erfolgte die Auswertung anhand des verwendeten Größenstandards. Die Banden wurden durch die UV-Strahlung fluoreszierende Ethidiumbromid sichtbar, welches mit der DNA im Agarose Gel interkalierte.

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (engl. *polymerase chain reaction*) dient der *in vitro* Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnitts. Das verwendete Standard-PCR Programm besteht aus sich wiederholenden Zyklen der drei Phasen: Denaturierung, Anneling und Elongation. Bei der Denaturierung trennen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der Doppelhelix und sie teilt sich in zwei einzelne DNA Stränge (Leit- und Matrizenstrang). Beim Anneling binden die spezifischen Forward Primer am Matrizenstrang und der Revers Primer am Leitstrang. In der Elongation bindet die Polymerase an den Primern und synthetisiert, mit Hilfe der umliegenden dNTP's einen komplementären DNA-Strang zu der Vorlage. Die Anzahl der vorliegenden DNA-Stränge verdoppelt sich mit jedem weiteren Zyklus der PCR. Die Amplifikation der Gene aus der cDNA erfolgte mithilfe von dem CloneAmp™ HiFi PCR Premix oder der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Bei der Phusion Polymerase wurde teilweise ein anderer Puffer verwendet, welche speziell für Guanin- und Cytosinreiche Verbindungen geeignet ist. Es wurde je Ansatz 100 ng cDNA verwendet. Die verschiedenen Ansätze für jedes Gen gehen aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten PCR Ansätze und Programm² zur Amplifikation der Gene aus der cDNA

| Gen | Polymerase | | Puffer | | Forward Primer ¹ <i>Finale Konz.</i> 0,5µM | Revers Primer ¹ <i>Finale Konz.</i> 0,25µM | dNTP's (10mM) <i>Finale Konz.</i> 5µM | ddH ₂ O <i>auf 25µL auffüllen</i> | PCR-Programm ² |
|-------------------|------------------------|--------------------------------|--------------|--------------|---|---|--|---|---------------------------|
| | HiFi Premix 12,5 µL | Phusion High-Fidelity 0,5 U | 5x HF Buffer | 5x GC Buffer | | | | | |
| SAMD9 | | x | x | | 72 | 73 | x | x | 2 |
| SAMD9L | | x | x | | 74 | 75 | x | x | 2 |
| SAMSN1 | x | | | | 76 | 77 | | x | 1 |
| LAP3 | x | | | | 78 | 79 | | x | 1 |
| UBE2L6 Vers. 1 | x | | | | 80 | 82 | | x | 1 |
| UBE2L6 Vers. 2 | x | | | | 80 | 82 | | x | 1 |
| CMPK2 Vers. 1 | x | | | | 83 | 84 | | x | 1 |
| CMPK2 Vers. 2 | x | | | | 83 | 85 | | x | 1 |
| CMPK2 Vers. 3 | x | | | | 83 | 86 | | x | 1 |
| HERC5 | | x | | x | 87 | 88 | x | x | 3 |

¹ Die Verwendeten Primer können im Anhang unter Primersequenzen nachgesehen werden

² PCR-Programme aus darunter liegender Tabelle entnehmen

Tabelle13: Auflistung der verwendeten PCR-Programme

| PCR-Phasen | Programm 1 | | Programm 2 | | Programm 3 | |
|---------------|------------|---------|------------|--------|------------|--------|
| Denaturierung | 98°C | | 30 sek | | | |
| Zyklen-Anzahl | 35 | | | | | |
| Denaturierung | 98°C | 10 sek | 98°C | 10 sek | 98°C | 10 sek |
| Anneling | 55°C | 10 sek | 64°C | 30 sek | / | |
| Elongation | 72°C | 2,5 min | 72°C | 3 min | 72°C | 2 min |
| Elongation | 72°C | | | 10 min | | |
| Ende | 4°C | | | | | |

3.1.6 (präparative) Restriktionsverdau

Nach der Plasmidpräparation (→3.1.4) wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Hierbei wurde die Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme gespalten. Zum Kontrollverdau wurden 500ng- 1µg DNA verwendet und ausschließlich Fast Digest Enzyme mit dem 10x Fast Digest (FD) Buffer von Thermo Fisher Scientific benutzt. Die verschiedenen Ansätze wurden zusammengeführt und für 45 Minuten bei 37° C in einem Thermocycler (→2.8) inkubiert. In einer anschließenden Auftrennung der Reaktionsansätze durch Gelelektrophorese kann anhand der erhaltenen DNA-Fragmente und des Größenstandards eine Charakterisierung durchgeführt werden (→3.1.1).

Der präparative Restriktionsverdau ist der erste Schritt des Klonierens. Hierbei wird das ausgesuchte Plasmid zum „Backbone“ und das amplifizierte sowie das durch PCR Purification (→2.7) gereinigte *gene of interest* (GOI) zum Insert durch einen Restriktionsverdau. Dabei wird ein speziell vorgesehener Abschnitt aus dem Plasmid herausgeschnitten und das GOI so geschnitten, dass es in die entstandene Lücke legiert werden kann. Damit dies gelingt, müssen die beiden Edukte genau zueinander passen. Dabei unterscheidet man zwischen zwei verschiedene Schnittenden, die ein Restriktionsenzym hervorbringen kann. Ein "Sticky End“ oder "Blunt End“. Das "Sticky End“ bezeichnet das Ende eines DNA-Abschnitts, wenn einer der Einzelstränge wenige Basen über das Ende hinausragt. Bei dem "Blunt End“ ist dies nicht der Fall. Hier besteht kein Überhang an Basen am Ende der DNA-Schnittstelle. Der Vorteil der "Sticky Ends" ist, dass spezifisch dazu passende Basen-Abschnitte am Ende des GOI abgeschnitten werden können, um so die beiden DNA-Abschnitte genau miteinander zu legieren. Bei zwei "Blunt Ends“ könnte das GOI auch in die entgegengesetzte Leserichtung legiert werden, wodurch aus dem codierenden Abschnitt kein korrektes Protein mehr synthetisiert werden kann. Mit welchem Restriktionsenzym, welches GOI geschnitten wurde, wird aus folgender Tabelle ersichtlich:

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme um die Gen Amplifikate zu Inserts für das Backbone zu schneiden

| Gen Amplifikat | Restriktionsenzym ¹ | | | | |
|----------------|--------------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| | XbaI ² | SmaI ³ | BamHI ² | SaII-HF ² | ScaI ³ |
| SAMD9 | x | | | x | |
| SAMD9L | | x | | x | |
| SAMSN1 | | | x | x | |
| LAP3 | x | | | x | |
| UBE2L6 Vers. 1 | x | | | x | |
| UBE2L6 Vers. 2 | x | | | x | |
| CMPK2 Vers. 1 | x | | | | x |
| CMPK2 Vers. 2 | x | | | | x |
| HERC5 | x | | | x | |

¹ Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammen von New England Biolabs

² Schneidet Sticky End

³ Schneidet Blunt End

Das jeweilig dazugehörige Backbone zu dem Insert wurde aus dem Plasmid pLenti CMV GFP puro (→2.11) präpariert. In der Regel wurde das dazugehörige Backbone genau wie das Insert präpariert. Eine Ausnahme bilden dabei SAMD9L und die CMPK2, da bei ihnen ein "Sticky" und ein "Blunt End" geschnitten wurden. Dem Backbone wurde zunächst nur ein Sticky End geschnitten. Bei SAMD9L's Backbone zunächst mit dem Enzym BamHI und bei CMPK2 SaII-HF. Danach wurden die "Sticky Ends" mit der Mung Bean Nuklease (→2.5) bei 30° C für 30 Minuten inkubiert und so die

Sticky Ends zu "Blunt Ends" geschnitten. Danach wurde das Enzym inaktiviert, indem 0,01% SDS der Reaktionslösung hinzugeben und für fünf Minuten inkubiert wurde. Es folgt wieder eine PCR Purification (→2.7). Nun folgte der letzte Verdau, um ein "Sticky End" dem Backbone hinzuzufügen, wobei GFP aus dem Plasmid geschnitten wird. Bei dem Backbone von SAMD9L wurde mit SalI-HF und bei CMPK2 mit XbaI präpariert. Der nun folgende Schritt wurde mit allen Backbones durchgeführt. Um das nun frei vorliegende Backbone und GFP zu trennen, wurde es mit Hilfe der Gelelektrophorese (→3.1.4) voneinander getrennt. Diese Banden wurden nun aus dem Gel unter UV-Strahlung sichtbar gemacht und aus dem Agarosegel geschnitten. Durch eine Gelextraktion (→3.1.7) wurde nun die enthaltene DNA vom Gel getrennt und gesäubert. Zum Schluss folgte die Ligation (→3.1.8)

3.1.7 Gel-Extraktion

Zur Analyse der präparativen Verdauung wurde ein 1 %-Agarosegel verwendet. Die amplifizierten DNA-Banden konnten anschließend mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Im Folgenden konnte die DNA-Extraktion mittels „GeneJET Gel Extraction Kit“ (→2.7) nach Herstellerangaben erfolgen. Dazu wurde zu dem Gel-DNA-Fragment 1:1 das Volumen des Bindepuffers hinzugegeben und bei 55° C für zehn Minuten im Heizblock erwärmt. Das Gel sollte schmelzen und sich im Bindepuffer lösen. Anschließend sollte die Lösung in eine GeneJET purification-Säule gebunden werden. Daraufhin wurde die Säule einmalig mit einem Waschpuffer gewaschen und anschließend die DNA in 50µl DNase-freiem Wasser eluiert und dessen Konzentration spektroskopisch (→3.1.3) bestimmt.

3.1.8 Ligation

Bei der Ligation wurden mittels der T4-DNA-Ligase (100 Units) die freien 3'-Hydroxy- und die 5'-Phosphat-Enden des Inserts und Vektors verbunden. Bei der Ligation wurden 50 ng Vektor-DNA eingesetzt und ein 3-fach molarer Überschuss an Insert DNA. Dieser wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Insert} = 3 \times \text{molarer überschuss} \ 50 \text{ ng Vektor} \times \frac{\text{Basenpaaranzahl Insert}}{\text{Basenpaaranzahl Vektor}}$$

Die DNA-Konzentrationen wurden mittels Nanodrop (→3.1.3) gemessen. Der Ligationsansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur und danach bei 16° C für zwölf Stunden inkubiert. Die DNA

wurde anschließend in One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* Zellen transformiert und auf Selektionsplatten mit Carbencillien (100µg/mL) ausgestrichen.

3.1.9 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen diente der Übertragung und Amplifizierung von Plasmid-DNA. Die chemisch kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit 10 µL des Ligationsproduktes oder mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, im Anschluss für 45 Sekunden im Heizblock (→2.8) bei 42°C erwärmt und dann für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Jedem Ansatz wurden 200 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt und anschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 225 rpm und 37° C geschüttelt. 50-150 µl der Suspension wurden auf Carbencillin-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C in einem Inkubator (→2.8), auf dem Deckel liegend, inkubiert. Durch die Selektion konnten die Plasmid-tragenden Klone am darauffolgenden Tag zur Plasmidpräparation genutzt werden.

3.1.10 Plasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden Plasmid Mini oder Maxi Präparation Kits (→2.7) verwendet. Die Arbeitsschritte wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Das gereinigte DNA-Pellet wurde in TE-Puffer eluiert, und bei Maxi Präparationen auf 1 µg/µL eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei - 20° C gelagert.

3.2 Protein-Analytik

3.2.1 SDS-PAGE

Durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine durch das Anlegen einer elektrischen Spannung ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Das in Trenn- und Sammelgel enthaltene SDS überlagert positive Ladungen und sorgt dafür, dass die gesamten Proteine negativ geladen sind und nach dem Anlegen der Spannung zur Anode wandern. Da die untersuchten Proteine unterschiedliche Größen aufwiesen, wurden Gradient Gele verwendet (→2.9). Die einzelnen Proteinlysate wurden mit 6x Ladebuffer + 50mM DTT (→2.9) versetzt und für fünf Minuten bei 95° C inkubiert. Das DTT verhindert dabei, dass sich nach der Denaturierung wieder Disulfidbrü-

cken ausbilden können. Das Polyacrylamidgel (→2.9) wurde dann mit den Proben und einem Protein-Marker (→2.6) beladen. Die anschließende Gelelektrophorese wurde für eine Anlaufzeit von ca. 45 Minuten bei 180 V in 1x Laufpuffer (→2.9) durchgeführt.

3.2.2 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren beinhaltet zum einen den Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf eine Membran und zum anderen die Immundetektion von Proteinen. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch das Anlegen einer Spannung über zwei Filterpapiere auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) transferiert. Filterpapier und Membran wurden vorher in 1x Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 20 V geblottet. Die Membran wurde für eine Stunde oder über Nacht in 5 % Milchpuffer (→2.9) geblockt. Zur Immundetektion wurden die primären Antikörper in 5 % Milchpuffer verdünnt (α -HA-mouse: 1:1.000, α -GAPDH-rabbit: 1:5.000; (→2.2)). Die Membran wurde für eine Stunde mit den primären Antikörpern inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten in PBST (→2.9) gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation in 5 % Milchpuffer mit sekundäre Antikörper, die mit einem Fluorophor gekoppelt waren (α -mouse: 1:10.000, α -rabbit: 1:5.000). Anschließend wurde die Membran wieder drei Mal gewaschen. Die Auswertung erfolgte mit dem Odyssey Membrandokumentationssystem (→2.8) anhand des verwendeten Protein-Markers.

3.3 Infektion von HEK-293T Zellen

Die Infektion von dendritischen Zellen, die in unserem Fall verwendeten HEK-293T Zellen (→2.13) wurden für einen ersten Infektionsversuch verwendet, da diese einfach in Kultur zu halten und gut zu transfizieren sind. Jedoch kann ein normales HIV-1 Viruspartikel diese nicht infizieren, daher sind Pseudotyposierte VSVg Viren vonnöten. Um eine Infektion überhaupt nachweisen zu können, wurden GFP und Luciferase Reporterviren (→2.11) verwendet. Der Grund dafür ist, dass bei einer erfolgreichen Infektion die Zelle statt ein Proviralessgenom GFP oder Luciferase synthetisiert. Beides kann genutzt werden, um quantitativ Infektiosität zu messen.

Der GFP Reportervirus Versuch: Nachdem wie 3.5.5 beschrieben, die Zellen transfiziert wurden, sind die Zellen zwei Tage danach 2×10^5 Zellen/ml in 2 ml DMEM-Vollmedium in vier 6 Wells ausplattiert worden. Somit war es möglich, eine Platte vor der Infektion zu lysieren, eine nicht und zwei zu infizieren. Einen Tag danach wurde eine Stunde vor der Infektion je ein Well eines der transfizierten GOI mit 10 µM Nevirapine (NVP) (→2.4) behandelt. Es blockiert durch Binden an einer katalytischen Bindestelle die Reversetranskriptase des Virus. Danach wurden zwei der 6-Wells je GOI durch einen

HIV.GFPe⁻r + VSV-g Reportervirus (→2.11) mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 1:1 infiziert. Der verwendete Virus hatte einen Titer von 10^8 /ml und es wurde von 5×10^5 Zellen im Well ausgegangen. Von der errechneten Menge pro Well wurde noch eine 1:10 Verdünnung vorgenommen, da vorhergegangene Versuche eine zu hohe Zahl an infizierten Zellen zeigte, die eine mögliche Restriktion überdecken könnte. Am dritten Tag der Infektion wurden die eine Hälfte der Zellen für ein Western Blot lysiert (→3.5.3) und die andere zu einer FACS-Analyse (→3.4.1) fixiert.

Der Luciferase Reportervirus Versuch: Am Tag des Aufteilens der Zellen in die 6 Well-Platten wurden für diesen Versuch 2×10^5 Zellen/ml in 100µl DMEM-Vollmedium auf 96-Well-Platte ausplattiert. Dabei wurden jedem GOI acht Wells auf der Platte zugewiesen. Einen Tag später werden zwei Wells nicht mit dem NL.luc3.SIVp6.e⁻r + pcDNA + pVSV-g (2.11) Reportervirus infiziert. Die restlichen sechs werden infiziert. Doch drei werden eine Stunde vorher mit 10µM NVP behandelt. Die Virusmenge betrug dabei 10 RLU/Zell (*Relative Light Unit*) (Stock: $5,53 \times 10^6$ RLU/µl). Drei Tage nach der Infektion folgte der Luciferase-Assay (→3.4.2).

3.4 Analyse der Infektion

3.4.1 FACS

Die Durchflusszytometrie bzw. FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) ist eine der führenden immunologischen Methoden zur Trennung von Zellen anhand ihrer Eigenschaften (Größe, Granularität und Oberflächenmoleküle). Dabei werden die Zellen einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt, wodurch anschließend sowohl die Lichtstreuung auf Grund der Oberflächenstruktur und Größe als auch die Fluoreszenz auf Grund der fluoreszenzmarkierten Antikörper oder fluoreszierenden Proteine gemessen werden kann. In dieser Arbeit wurden ausschließlich damit durch GFP grün fluoreszierende Zellen untersucht. Die anschließende Analyse wurde mittels FlowJo Software (→2.12) durchgeführt.

3.4.2 Luciferase-Assay

Die Luciferase ist der Katalysator der oxidativen Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei wird Energie in Form von Licht frei. Bei einer erfolgreichen Infektion von Zellen mit einem Luciferase-Reportervirus wird das Enzym exprimiert (→3.2). Je nachdem, wie viel Luciferase zur Verfügung steht, wird das im Substrat enthaltene Beetle Luciferin unter anderem zu Oxyluciferin und Licht umgesetzt. Die Infektiosität des Reportervirus ist also proportional zur gemessenen Biolumineszenz und gibt Aufschluss darüber, wie stark die Luciferase exprimiert und somit wie effektiv die Zelle

infiziert wurde. 72 Stunden nach einer Infektion wurden die Zellen mit 100 μ L 1x PBS gewaschen und anschließend mit 25 μ l 1x PLB lysiert. 22,5 μ L des Lysats wurden dann in eine 96-Well Luminometer-Platten transferiert. Die Messung der Lichtintensität (RLU) erfolgte mit einem Mikroplattenluminometer (\rightarrow 2.8). Das Messprogramm lief automatisiert wie folgt ab: Injektion von 50 μ l Luciferase-Substrat, Verzögerungszeit von 1 s, Messzeit von 2 s.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Adhärenente Zellen

HEK 293T wurden in *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM; \rightarrow 2.9) kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei Tage je nach Zelldichte in einem Verhältnis von 1:5 – 1:20 passagiert. Hierfür wurde das Medium zunächst abgenommen. Anschließend wurde mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch eine Trypsin/EDTA-Lösung (3 ml) vom Flaschenboden gelöst. Je nach Verhältnis wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und weiter kultiviert.

3.5.2 Isolierung von PBMC aus Buffy Coats

Um PBMC aus frischem Buffy Coat (Blutprobe des Blutspendedienstes, aus der der größte Teil der Erythrozyten und des Plasmas entfernt wurde) zu erhalten, wurde dieser zu Beginn 1:2 mit PBS verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Histopaque geschichtet, welches zuvor in 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt wurden. Histopaque ist ein Sucrose-Polymer, welcher Erythrozyten, tote Zellen und Zellfragmente im Gegensatz zu mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durchdringen kann. Dementsprechend entsteht nach Zentrifugation eine Lösung bestehend aus mehreren Phasen und kann die PBMC aus der Interphase abnehmen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 25 Minuten bei 1420 x g mit der kleinstmöglichen Brems- und Beschleunigungskraft, wodurch der Buffy Coat in drei Phasen unterteilt wurde. Darauffolgend wurde die PBMC aus der Interphase abgenommen und in ein sauberes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, welches anschließend mit PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 840 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml 0,84% NH_4Cl resuspendiert und im Wasserbad bei 37° C inkubiert, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren. 20 Minuten später wurden die Zentrifugenröhrchen abermals auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 840 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Sofern nach der Zentrifugation das Pellet noch stark rot gefärbt war (viele verbliebene Erythrozyten), wurde die 20-minütige Inkubation in 20 ml 0,84% NH_4Cl bei 37° C wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Pellets resuspendiert und bis 50 ml mit PBS aufgefüllt. Der nachfolgende Zentrifugationsschritt bei 200 x

g diente der Entfernung der Blutplättchen. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in 5 ml PBC resuspendiert. Es folgte die Zellzählung und die gewünschte Zellanzahl wurde für weitere Experimente direkt genutzt oder kultiviert.

3.5.3 Lyse von Zellen

Die Lyse von Zellen ist eine elementare Methode zur Analyse von Proteinen. Ziel ist es, das gewünschte Protein aus der Zelle freizulegen. Dafür muss die Zellmembran aufgelöst werden. Zunächst wurden die transfizierten Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und in 1ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde nun in 100µl NP40 Lysepuffer (→2.9) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge (→2.8) für 10 Minuten zentrifugiert. Die zerstörte Zellmembran und der restliche „Zellschrott“ legt sich als ein Pellet nieder. Im Überstand befinden sich unter anderem auch die Proteine aus dem Zytoplasma, welche nun in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei - 20° C gelagert werden.

3.5.4 Suspensionszellen

U937-Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute* Medium 1640 (RPMI-1640; →2.9) kultiviert. Je nach Zelldichte wurden die Zellsuspensionen in einem Verhältnis von 1:10 – 1:20 mit frischem Medium verdünnt und anschließend weiter kultiviert.

3.5.5 Transfektion von Zellen mit PEI

Die Polyethylenimin (PEI) (→2.4)Transfektion gehört zu den chemischen Verfahren der Transfektion, also der Einbringung von Fremd-DNA in Zellen. Das PEI bindet an der Plasmid-DNA und bildet ein Komplex um die Plasmid-DNA, welche nun durch den Vorgang der Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann. Dieses Verfahren wurde genutzt, um HEK-293T Zellen zu transfizieren. Dafür wurden zunächst am Tag vor der Transfektion 4×10^6 Zellen in einer 10 cm Zellkulturplatte mit 10 ml DMEM-Vollmedium ausgesät. Am der Transfektion wird nun in 1 ml pures DMEM-Medium mit 15µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA und 15µg PEI dazugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Das Verhältnis von PEI zu Plasmid-DNA sollte immer 1:1 sein, da PEI in zu hohen Dosen zytotoxisch wirken kann. In der Zeit des Inkubierens wird das Medium auf den Zellen gegen 9 ml neues DMEM-Vollmedium gewechselt. Nach dem Inkubieren wird nun langsam das Transfektionsreagenz in das

Medium der Zellkulturschale dazugegeben und vorsichtig durch Kippen der Platte invertiert. Danach wurden die Zellkulturschalen wieder im Inkubator (→2.8) bei 37° C inkubiert.

3.5.6 Zellfixierung mit PFA

Die Fixierung von Zellen durch Paraformaldehyd (PFA) geschieht grundsätzlich durch die Quervernetzung von Proteinen unter Beteiligung der Aldehydgruppen des Paraformaldehyds. Durch diese Fixierung wird der Proteinstatus der Zelle erhalten. Dies ist für eine Durchflusszytometrie notwendig. Es wurde zunächst die Hälfte der transfizierten und infizierten Zellen mit Trypsin abgenommen und in 1 ml DMEM-Vollmedium in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden für drei Minuten bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge (→2.8) pelletiert und anschließend in PBS gewaschen und erneut pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200µl 1% Paraformaldehyd/PBS-Lösung (→2.9) aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die fixierten Zellen in 200µl FACS-Buffer (→2.9) gewaschen und zuletzt das Pellet in 200µl FACS-Buffer resuspendiert. Bis zur FACS-Analyse wurden die Zellen bei 4° C aufbewahrt.

3.5.7 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm² – 150 cm² großen Zellkulturflaschen bei 37° C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von bis zu 95 % in einem Inkubator (→2.8) kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (→2.8) durchgeführt. Die Konfluenz der Zellen wurde vor den Passagieren mikroskopisch (→2.8) überprüft. Das jeweilige Medium wurde vor dem Einsatz auf 37° C im Wasserbad (→2.8) erwärmt.

3.5.8 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer (→2.8) bestimmt. Die Zellsuspension wurde je nach Zelldichte sinnvoll verdünnt und anschließend mit Trypanblau (Verhältnis 1:2) versetzt. Die Verwendung von Trypanblau (→2.4) gab Aufschluss über die Vitalität der Zellen. Tote Zellen sind permeabel für den Farbstoff und lassen sich beim Mikroskopieren gut von den lebenden Zellen abgrenzen. Die Zellzahl pro ml wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ gezählte Großquadrate}$$

4 Ergebnisse

4.1 Selektion von Gene aus Transkriptom Analyse

Die potentiellen Restriktionsfaktoren sind anhand verschiedenster Kriterien aus der Transkriptom Analyse ausgewählt worden. Im Fokus standen Proteine, denen noch keine Restriktion gegenüber HIV nachgewiesen wurde. Dabei sind insbesondere Proteine anhand ihres Grades der Expressionsinduktion von R848-stimulierten Monozyten ausgewählt worden. Ein Ausschlusskriterium waren Proteine, die aus der Zelle sekretiert werden, wie zum Beispiel eine Vielzahl an Interleukinen (IL-1, IL-6 oder IL-8). Weitere Faktoren waren unter anderem Protein-Domänen, die auch zu bekannten Restriktionsfaktoren gehören. Ein Beispiel hierfür wäre die SAM-Domäne von SAMHD1. Die Restriktion wird beim Eintreten der viralen RNA in die Wirtszelle erwartet, daher waren auch Proteine, die katalytische Funktionen gegenüber RNAs aufweisen und diese verändern oder gar degradieren könnten, von Interesse. Ebenso von Interesse waren Proteine mit einer Ubiquitin Ligase Aktivität, die, ähnlich der TRIM5alpha Aktivität, bei einem vorzeitigen *uncoating* eine Rolle spielen könnten. Im Nachfolgenden werden die einzelnen Gene vollständig mit ihren Besonderheiten genannt, weswegen sie gewählt wurden und einen Überblick über ihre Größe (bp=Basenpaare¹; kDa=Kilo Dalton²) sowie über ihre Spliceformen (V) aufgezeigt.

SAMD9 - *Sterile Alpha Motif Domain Containing 9* (4770 bp/174,9 kDa)

Aufgrund der SAM-Domäne ist SAMD9 von Interesse.

SAMD9L - *Sterile Alpha Motif Domain Containing 9 Like* (4755 bp/174,35 kDa)

Auch bei SAMD9L war die SAM-Domäne der Grund für die Selektion.

SAMSN1 - *Sterile Alpha Motif Domain And Src Homology Domain 3 And Nuclear Localization Signals 1*

(1122 bp/41,14 kDa)

Die SAM-Domäne war auch bei SAMSN1 interessant, jedoch wird dem Protein auch eine Bindung an den polyA-Schwanz der RNA zugeschrieben, weswegen die Idee aufkam, dass dies vielleicht auch bei viraler RNA der Fall ist (53). Es könnte als ein Bindeprotein für eine RNase dienen, welche dann die virale RNA degradiert.

LAP3 - *Leucine Aminopeptidase 3* (1560 bp/ 57,2 kDa)

LAP3 ist aufgrund seiner katalytischen Aktivität aufgefallen. Es entfernt unsubstituierten N-Terminal Aminosäuren von Peptiden (54). Daher könnte es in hoher Konzentration den Abbau von Proteinen beschleunigen, was die Reversetranskriptase von HIV-1 verlangsamen oder gar komplett verhindert.

UBE2L6 - *Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 L6* V1 (462 bp/16,94 kDa); V2 (264 bp/ 9,68 kDa)

Die Ubiquitin-Domäne macht UBE2L6 besonders interessant. Ubiquitin dient dazu, Proteine zu modifizieren. So könnte dies vielleicht, ähnlich wie bei TRIM5 α , eine Bindung an einen der virusbenötigten Bestandteile interagieren, wie das Virus Capsid oder die Reversetranskriptase von HIV modifizieren und unbrauchbar machen. Sie könnte auch in einem Signalprozess der Immunantwort der Zelle beteiligt sein. Es existieren 2 Isoformen von UBE2L6 (55).

CMPK2 - *Cytidine/Uridine Monophosphate Kinase 2* V1 (1350 bp/49,5 kDa); V2 (1230 bp/45,1 kDa); V3 (1101 bp/40,37 kDa)

Die Kinase CMPK2 wurde aufgrund ihrer Beteiligung in katalytischen Prozessen der mitochondrialen dNTP's ausgewählt (56). Sie könnte die virale RNA beim Eintritt in die Zelle degradieren und so die Infektiosität verringern. Es sind bislang drei Isoformen bekannt.

HERC5 - *Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus Domain And Regulator of Chromosome Condensation 1-protein Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 5*

(3075 bp/112,75kDa)

Das Protein HERC5 bildet eine kleine Ausnahme in der Selektion für die Proteine. Es ist ein Teil der HERC Familie, welche zu den Ubiquitin Ligasen zählt. Es vermittelt das Ziel von Proteinen, welche Interferon-abhängig stimuliert sind. HERC5 wird schon eine restriktive Wirkung gegen HIV-1 zugeschrieben. Jedoch wurde diese Restriktion während des *assembly vom Viruszyklus* beschrieben und noch nicht bei dem *uncoating* des Virus (57, 58).

¹Die Basenpaaranzahl stammt von der Gendatenbank " www.genecards.org "

²Der Kilo Dalton Wert wurde anhand eines Molekulargewichtskalkulators auf "www.promega.com/a/apps/biomath/?calc=dnaprotein" berechnet.

4.2 Amplifikation der DNA-Sequenzen aus cDNA

Um die ausgesuchten Gene zu amplifizieren, wurde wie in (→3.5.2) beschrieben, von drei unterschiedlichen Donoren PBMC's isoliert und mit R848 stimuliert. Dadurch sollten unsere potentiellen Gene hochreguliert werden und eine erhöhte Menge der RNA-Template von diesen Genen im Zytoplasma vorhanden sein. Es wurden drei Donoren gewählt, damit drei unterschiedliche biologische Replikate untersucht werden konnten. Nun folgte die RNA Isolation (3.1.1) mit der anschließenden Vollängen Synthese der cDNA (→3.1.2). Die cDNA wurde nach einer Positivkontrolle, einer Amplifizierung des Housekeeping Genes GAPDH, zusammengelegt. Dadurch wurde sichergestellt, dass für alle PCR die gleichen cDNA-Templates verwendet wurden. Anschließend wurden verschiedenste Ansätze an PCR getestet, bis für jedes Amplifikat die richtigen PCR Bedingungen gefunden wurden (→3.1.5). Die Primer waren so designt, dass zu Beginn der Gen Sequenz zum späteren Nachweis des Proteins noch ein HA-Tag hinzugefügt wurde. Wie aus der Abb. 8 hervorgeht, konnten alle Amplifikate bis auf die dritte Variante des CMPK2 Gens erfolgreich amplifiziert werden.

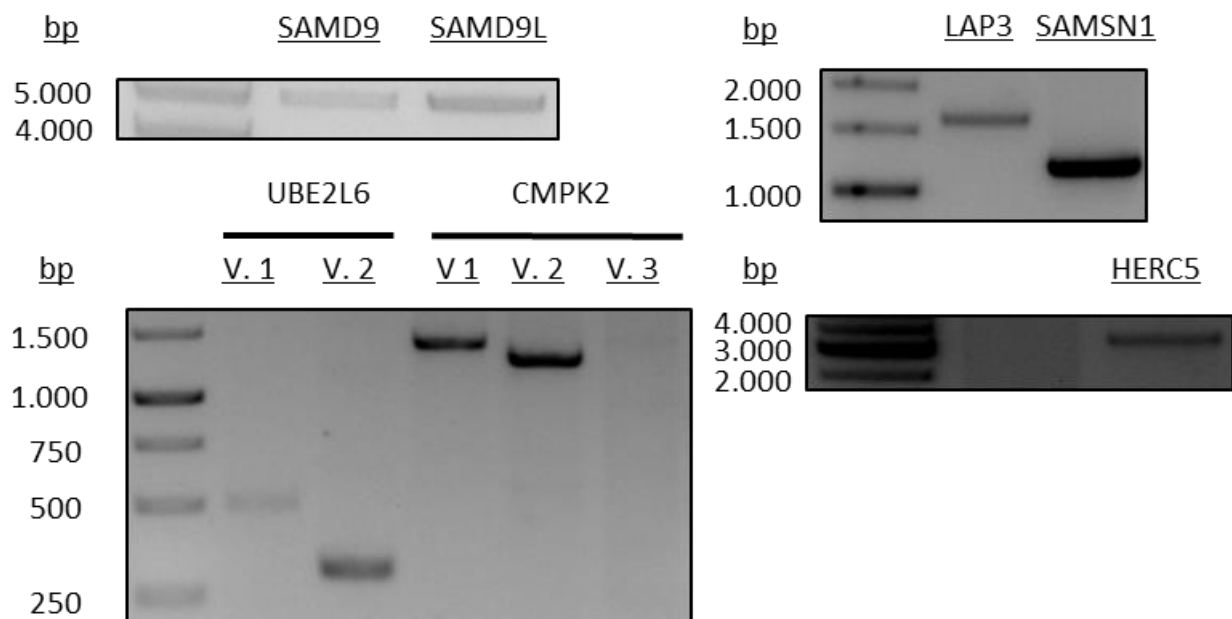


Abbildung 8: Agarosegelbanden der einzelnen positiven Amplifikate

Die einzelnen PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei konnten bis auf die dritte Splice Variante von CMPK2 alle anderen Gene aus der cDNA amplifiziert werden.

4.3 Klonierung in lentiviralem Vektor

Nachdem nun die PCR-Amplifikate von den gewählten Genen vorlagen, mussten diese in einen Vektor kloniert werden. Das „pLenti CMV GFP puro“ Plasmid sollte dafür dienen, denn es ermöglicht durch

die sich darauf befindlichen LTR (→1.2.2) eine Integration in ein Zellgenom. Somit könnte damit die nur sehr schwer transfizierbare U937 Zelllinie (→3.5.4) durch einen Gentransfervektor transduziert werden. Anschließend konnten die Zellen, die erfolgreich transduziert wurden, mit der Puromycin Resistenz selektiert und so stabile monozytäre Zelllinien mit unseren GOI hergestellt werden.

Für das Klonieren aller GOI mussten vier unterschiedliche „Backbones“ aus dem Plasmid präpariert werden. Es konnten nicht alle GOI mit den gleichen Enzymen geschnitten werden, da manche der GOI eine Restriktionsschnittstelle hatten und daher eine andere Präparation von diesen vonnöten war. Es mussten zwei „Backbones“ mit zwei Sticky Ends und zwei mit einem Sticky und einem Blunt End geschnitten werden. Unter (→3.1.6) sind die einzelnen Schritte genau beschrieben. Die Abbildung 9 zeigt ein Schema zur Herstellung der Plasmide.

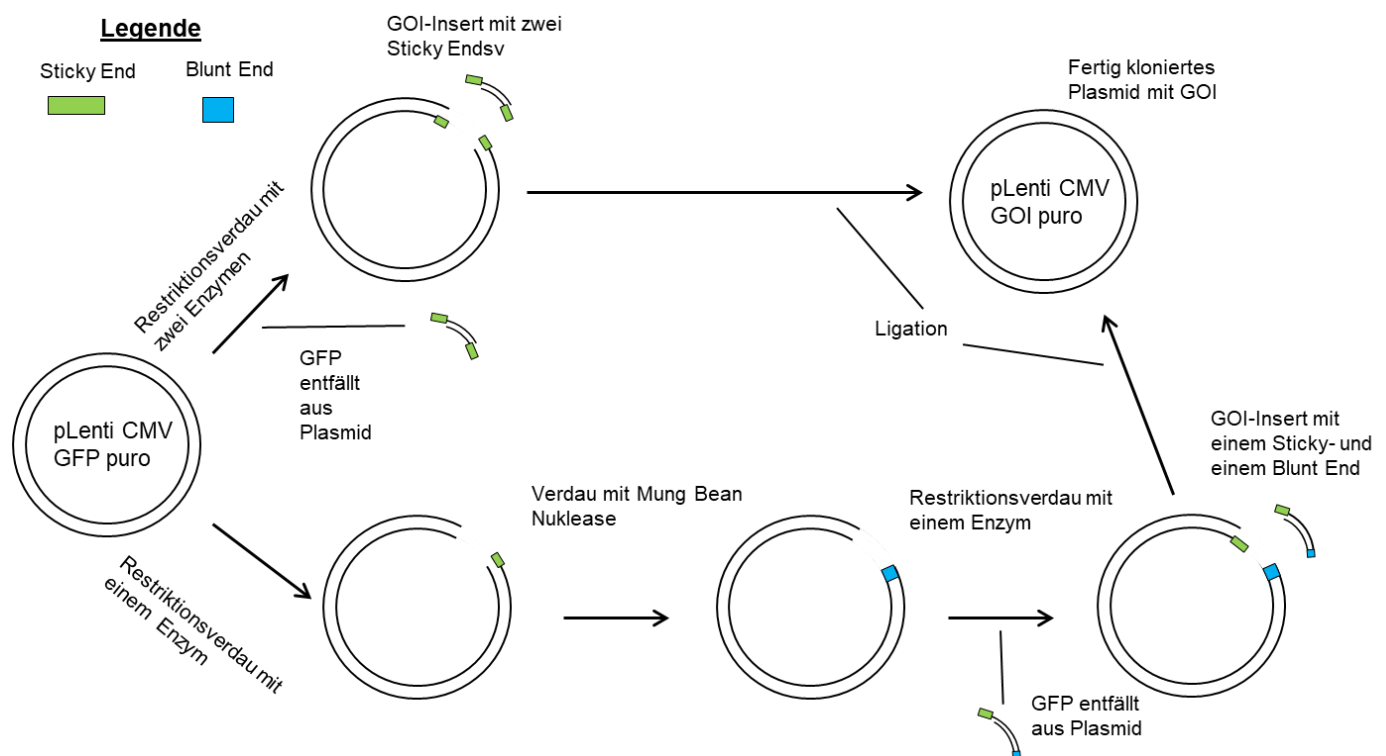


Abbildung 9: Schema zur Herstellung der Vektoren mit enthaltenen GOI

Im Klonierungsprozess der Vektoren wird mit zwei unterschiedlichen präparativen Verdauansätzen das ursprüngliche pLenti CMV GFP puro einmal mit zwei Sticky Ends sowie mit einem Sticky- und Blunt End geschnitten. Anschließend werden die entstandenen Backbones mit den zuvor passend präparierten Inserts zu dem fertigen Vektor ligiert.

Nachdem die Inserts der GOI mit ihren jeweiligen „Backbones“ ligiert wurden (→3.1.8), mussten diese vervielfältigt werden. Dazu wurden diese mittels Hitzeschocktransformation in E.Coli transformiert (→3.1.9) und auf Carbenicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert. Am folgenden Tag konnten gewachsene Kolonien gepickt werden und zu einer Mini Präparation (→3.1.10) in Ampicillin-haltigen

LB –Medium an geimpft werden. Nach dem Eluieren der Plasmid-DNA wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Sollte das erwartete Insert aus dem Plasmid ausfallen, wurde eine 250 ml Maxikultur aus einem zuvor aus der Minikultur angelegten Glycerolstock (500 µl Glycerol+500 µl Minikultur; bei - 80° C gelagert) oder einem zurückgelegten Vorrat der Minikultur zu einer Maxikultur eingepflegt und präpariert (→3.1.10). Nach einem weiteren Kontrollverdau und einer Sequenzierung der gesamten Gensequenz (→7.2) konnten nun Expressionstests der Plasmide folgen.

4.4 Expressionsnachweis in HEK 293T Zellen

Um zu überprüfen, ob die Expression eines Proteins von einem Plasmid möglich ist, muss zunächst ein Zellmodell gewählt werden, in dem die Proteine *in vivo* exprimiert werden können. Die HEK-293T Zellen (→3.5.1) schienen dafür ideal. Sie sind sehr einfach in Kultur zu halten, teilen sich häufig, sind einfach zu transfizieren und sie exprimieren Proteine stark von Plasmiden. Ein Leervektor sollte dabei als negativ Kontrolle und das *housekeeping gene* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als ein Indikator der Vitalität der Zellen dienen. Der nächste Schritt war es, die Zellen zu transfizieren (→3.5.5). Nach zwei bis drei Tagen, je nach Experiment, wurden die Zellen lysiert, um die Proteine freizusetzen und sie anschließend auf einer SDS-Page (→3.2.1) aufzutrennen. Nun konnte ein Western Blot (→3.2.2) durchgeführt werden. Durch die klonierte HA-Tag Sequenz konnten alle Proteine mit einem primären Antikörper nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber, dass nicht alle Proteine exprimiert oder detektiert wurden. Die Sequenzierungen nach der Sanger Methode bestätigten aber eine erfolgreiche Klonierung mit HA-Tag in der Gensequenz (→7.2). So konnte UBE216 V2 und keines der CMPK2 Proteine bisher erfolgreich nachgewiesen werden. Die Expression von LAP 3 konnte hingegen nur bei einem durchgeführten Western Blot gezeigt werden (→7.3). Verwunderlich ist auch, dass der Restriktionsfaktor rhTRIM 5 α nicht exprimiert werden konnte. Doch die Expression der anderen GOI-Proteine (SAMD9, SAMD9L, UBE216 Version 1, SAMS1 und HERC5) konnten regelmäßig erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 10; →7.3). Es zeigte sich jedoch, dass das erwartete Molekulargewicht von SAMS1 nicht 41 kDa, sondern ca. 53 kDa aufzeigt (→4.1).

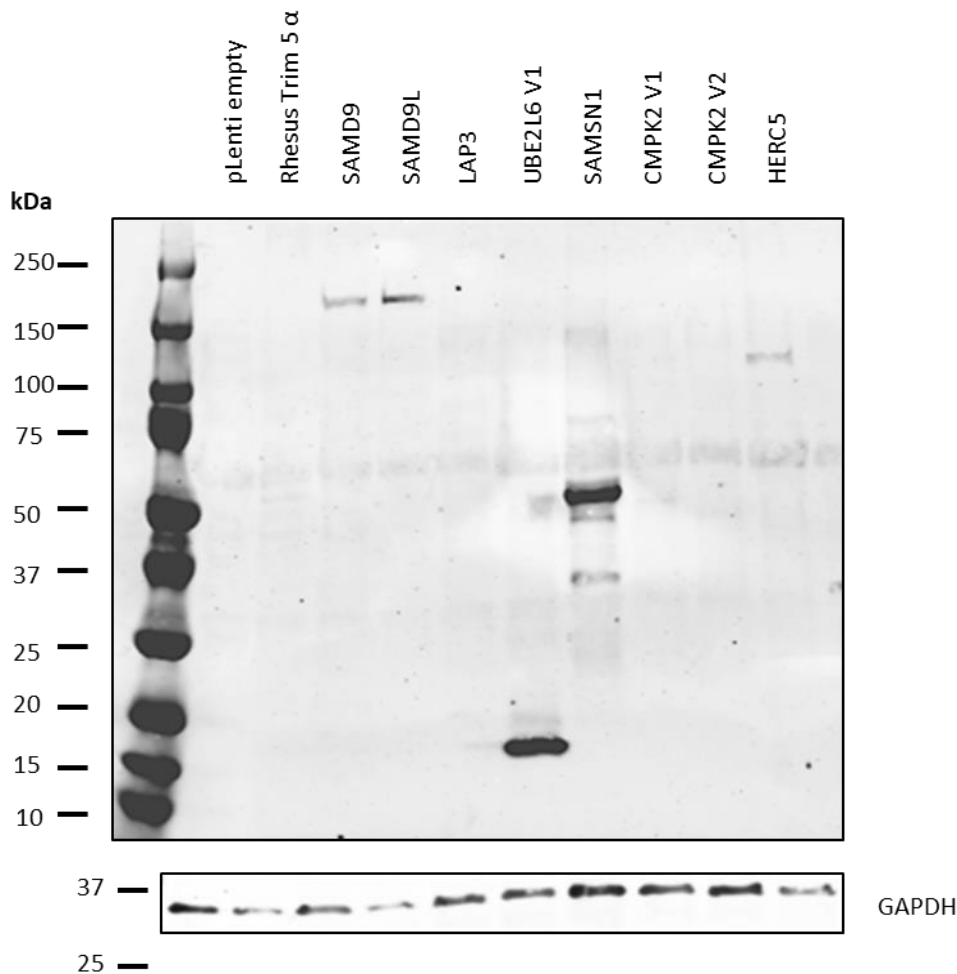


Abbildung 10: Expression von klonierten GOI in HEK-293T Zellen drei Tage nach Transfektion

Western Blot, welches die erfolgreiche Expression von SAMD9, SAMD9L, UBE2L6 V1, SAMS1 und HERC5 in HEK-293T Zellen zeigt. Das *Housekeeping Gen* GAPDH ist dabei Indikator für die Vitalität der Zellen und zeigt einen möglichen toxischen Effekt der transfizierten Proteine in den Zellen. Die Bilder wurden invertiert, um Banden besser erkennen zu können.

4.5 Untersuchung eines antiviralen Effekts durch Infektion mit Reporterviren

Da nun nachgewiesen werden konnte, dass einige der Kandidatenproteine erfolgreich in HEK-293T Zellen exprimiert werden konnten, war nun der nächste Schritt, sie auf einen antiviralen Effekt gegen HIV-1 zu untersuchen. Es wurden auch die Proteine von CMPK2 getestet, obwohl diese bisher nicht im Western Blot detektiert werden konnten. Grund dafür ist, dass die Klonierung erst sehr spät im Verlauf der Arbeit erfolgreich war und daher nur ein einziger Expressionsversuch durchgeführt werden konnte. Ziel war es, die antivirale Aktivität der Kandidatenproteine nach Infektion mit VSV-g pseudotypisierten HIV-1 Reporterviren zu testen. Hierzu wurden sowohl Viren mit einem *firefly luci-*

ferase (Luciferase aus Glühwürmchen) Reporter Gen als auch mit einem GFP Reporter Gen gewählt. Es gab für jedes Plasmid vier Wells an transfizierten Zellen. Im ersten wurde, wie in 4.4 gezeigt, für eine Expressionsanalyse vor der Infektion zum Überprüfen benutzt, ob die Zellen das Protein exprimieren. Das zweite Well diente als Kontrolle und wurde nicht mit dem Virus infiziert (mock). Im dritten wurden die Zellen infiziert. Die Infektion erfolgte mit dem HIV-GFP $e^{-} r^{-} +$ VSV-g bzw. NL.luc3.SIVp6. $e^{-} r^{-} +$ pcDNA + pVSV-g pseudotypisierten Reportervirus (3.3). Das Besondere an diesem Virus ist, dass es ein *single-round virus* ist. Es ist in der Lage, nur eine Zelle zu infizieren, da danach nur Viruspartikel ohne ein env Protein produziert werden. Diese können somit keine weiteren Zellen infizieren, wodurch die verwendete Virusmenge die Infektiosität berechenbar macht. Im letzten Well wurden die Zellen eine Stunde vor der Infektion mit 10 μ M NVP behandelt. NVP ist ein Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor und bindet an dem katalytischen Zentrum der reversen Transkriptase und inhibiert diese. Dadurch kann die virale RNA nicht in DNA umgeschrieben werden. NVP sollte als eine Kontrolle der Experimente dienen, dass es sich bei der Infektion um eine echte Infektion handelt. Soll heißen, dass die GFP und Luciferase Proteine nicht mit dem Virus in die Zelle gebracht wurden, sondern dass die Zelle diese selber hergestellt hat. Weiterhin sollten für die Infektionsexperimente auch zwei Kontrollplasmide transfiziert werden. pLenti empty ist derselbe Vektor wie der Klonierungsvektor, doch trägt er kein Gen in sich, welches in einer eukaryotischen Zelle exprimiert werden kann. Dies sollte dazu dienen, dass die Infektiosität mit gleich behandelten Zellen verglichen werden kann. In ihnen sollte auch kein antiviraler Effekt zu beobachten sein und es sollte der Einfluss im Falle eines antiviralen Effekts der GOI durch den Klonierungsvektor ausgeschlossen werden. RhTRIM5 α (\rightarrow 2.11) sollte genau als Gegenteil dazu dienen. Hier sollte eine Restriktion des Virus erwartet werden, um im Falle eines antiviralen Effekts der GOI diesen mit rhTRIM5 α zu vergleichen.

Beim Infektionsversuch mit dem HIV-GFP $e^{-} r^{-} +$ VSV-g pseudotypisierten Reportervirus konnte nach einer erfolgreichen Integrierung in das Wirtszellgenom die Zellen GFP produziert werden. Dadurch kann anhand der Fluoreszenz von GFP aus den infizierten Zellen, der prozentuale Anteil der infizierten Zellen zu nicht infizierten Zellen durch eine Durchflusszytometrie (FACS) (\rightarrow 3.4.1) bestimmt werden.

Die Abbildung 11 zeigt die entwickelten Rohdaten (\rightarrow 7.4) der FACS-Analyse. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (pLenti empty) fällt dabei auf, dass - wie zu erwarten - kein antiviraler Effekt von rhTrim5 α ausgeht, da es nicht von den Zellen exprimiert wurde (\rightarrow 4.4). Auch die positiv exprimierten Kandidatenproteine zeigen keinen signifikanten Unterschied von dem prozentualen Anteil der infizierten Zellen. Die eine Stunde zuvor mit Nevirapine behandelten Zellen zeigen keine Unterschiede zu den nicht mit Virus behandelten Zellen (mock). Daher ist davon auszugehen, dass der Reportervirus wie erwartet infiziert und auch an seiner Infektion gehindert werden kann.

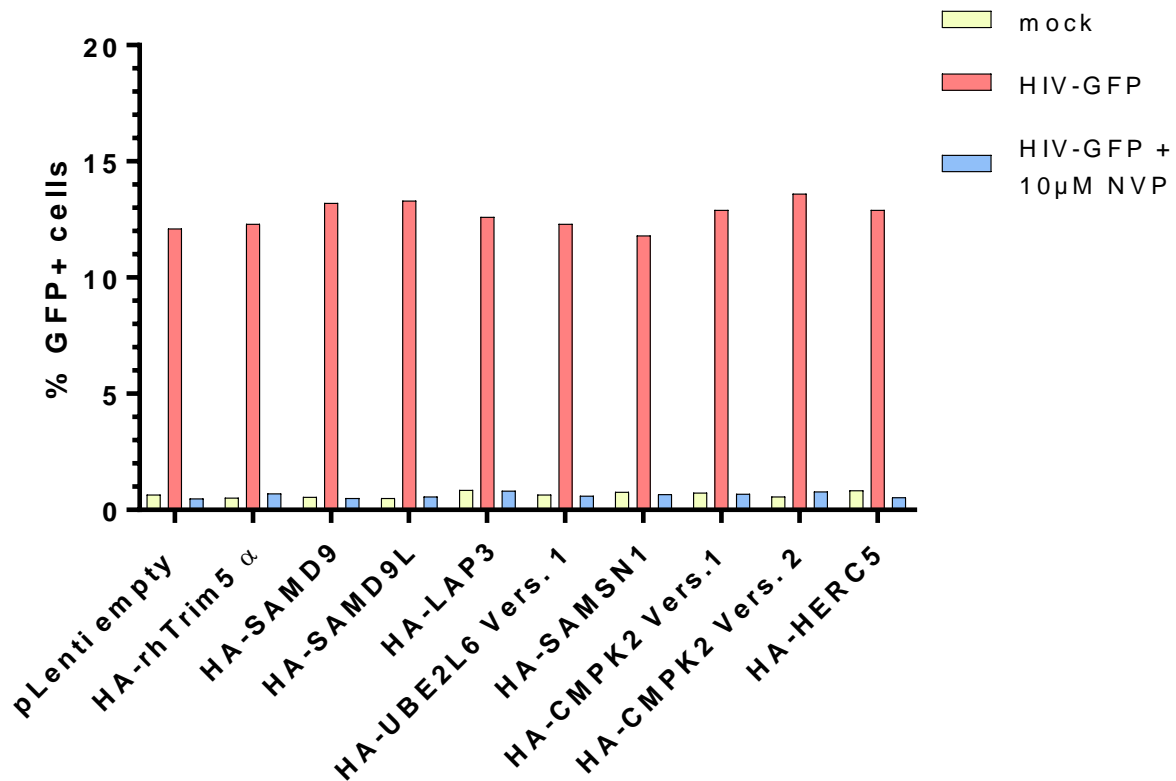


Abbildung 11: Ergebnis des GFP Reportervirus Experiment

Das Diagramm zeigt auf der X-Achse die transfizierten Gene in den HEK-293T Zellen und die Y-Achse den prozentualen Anteil der GFP produzierenden Zellen. Das Diagramm zeigt nicht infizierte Zellen (mock), infizierte (HIV-GFP) und Zellen, welche eine Stunde vor der Infektion mit 10 μ M NVP (HIV-GFP + NVP 10 μ M) behandelt worden sind. Die Zellen wurden mit einer MOI von 1:1 durch einen HIV-GFP $e^{-}r^{-}$ + VSV-g pseudotypisierten Reportervirus infiziert. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede unter den % GFP+cells. Die nicht infizierten und zuvor mit Nevirapine behandelten Zellen zeigen keine Infektion. Für die Abbildung wurden FACS-Rohdaten verwendet (\rightarrow 7.4).

Im zweiten Infektionsversuch wurde ein NL.luc3.SIVp6. $e^{-}r^{-}$ + pcDNA + pVSV-g pseudotypisierten Reportervirus (\rightarrow 3.3) zur Infektion genutzt. Die Infektiosität wird dabei durch das Umsetzen der exprimierten Luciferase, bei erfolgreicher Integrierung ins Genom, welche Beetle Luciferin in Oxluciferin umsetzt und so eine Lichtreaktion hervorruft (\rightarrow 3.4.2). Diese kann gemessen und quantitativ analysiert werden.

Die Abbildung 12 stellt die Ergebnisse des Versuchs dar. Die mit Nevirapine behandelten Zellen zeigen auch hier gegenüber dem normalen Hintergrund der nicht infizierten Zellen (mock) keinen Unterschied. Auch hier zeigt sich, dass rhTrim5 α keinen antiviralen Effekt hat, was darauf zurückzuführen sein kann, dass es nicht exprimiert wurde. Dies gilt auch für alle Zellen, die mit den GOI transfiziert wurden. Somit zeigt sich auch in diesem Infektionsexperiment kein möglicher antiviraler Effekt.

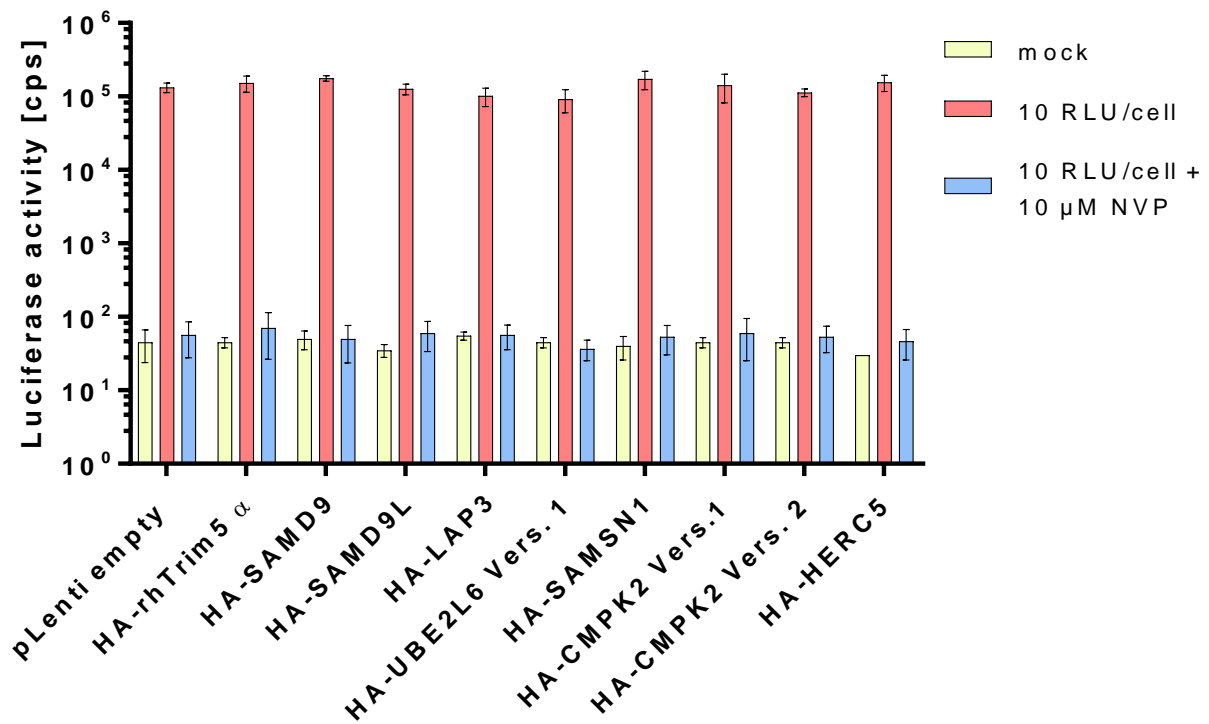


Abbildung 12: Ergebnis des Luciferase Reportervirus Experiment

In dem Diagramm wird die Lichtreaktion, der katalytische Reaktion von Luciferase, welche Beetle Luciferin zu Oxyluciferin umwandelt, dargestellt. Dabei wurden die Luciferase Aktivität anhand der *counts per seconde* (cps) gemessen (Y-Achse). Die X-Achse listet die Zellen mit den transfizierten GOI. Das Diagramm zeigt nicht infizierte Zellen (mock), infizierte (10 RLU/cell) und Zellen, welche eine Stunde vor der Infektion mit 10 μ M NVP (10 RLU/cell + NVP 10 μ M) behandelt worden sind. Die Zellen wurden mit 10 RLU/cell eines NL.luc3.SIVp6.e⁻r⁺ + pcDNA + pVSV-g pseudotypisierten Reportervirus infiziert. Die nicht mit dem Virus behandelten Zellen zeigen keinen Unterschied zu den mit Nevirapine behandelten Zellen. Die infizierten Zellen veranschaulichen eine erfolgreiche Infektion. Es zeigen sich keine Unterschiede in der Aktivität der Luciferase der infizierten Zellen.

5 Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse von potentieller Restriktionsfaktoren, welche der Grund für die ausgelöste Restriktion von HIV-1 bei stimulierten TLR7/8 sein könnten. Grundlage der gesamten Untersuchung war eine Transkriptom-Analyse eines RNA-Tiefen-Sequenz-Screenings, sowohl durchgeführt und basierend auf den Ergebnissen von Herrn Dr. Henning Hofmann (52). Anhand dessen wurden nun die Gene SAMD9, SAMD9L, SAMS1, LAP3, UBE2L6, CMPK2 und HERC5 als mögliche Ursachen dieser Restriktion und somit als Untersuchungsziele dieser Arbeit gewählt. Sie waren in ihrer Expression deutlich hochreguliert und wiesen Merkmale auf, die andere Restriktionsfaktoren aufzeigten oder die eine Interaktion mit RNA darlegte. Denn der unbekannte Restriktionsfaktor ist womöglich für die Destabilisierung des viralen RNA Genoms von HIV-1 bei der TLR 7/8 Stimulation verantwortlich (52). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gene aus der isolierten RNA der Monozyten, mit zuvor stimulierten TLR 7/8, amplifiziert wurden. Ausgenommen davon ist die dritte Variante bzw. Splicing Form von CMPK2, welche nicht nachweisbar war. Ob diese allerdings in Monozyten exprimiert wird, ist ungewiss und muss in zukünftigen Experimenten gezeigt werden. Es zeigt auch, dass die Gene in Monozyten dadurch nicht nur nachweisbar sind, sondern auch in einer ausreichenden Menge in der Zelle vorhanden sind, um eine mögliche Rolle in einer Restriktion von HIV-1 spielen zu können.

Nach der Klonierung der Amplifikationsprodukte in ein pLenti Vektorkonstrukt konnten alle Gene erfolgreich in den Vektor ligiert werden. Mittels einer Sanger-Sequenzierung wurde die Richtigkeit der Gensequenz bestätigt (→7.2). Es zeigte sich, dass nicht alle diese klonierten Produkte erfolgreich in HEK-293T Zellen exprimiert werden konnten. So konnte die zweite Variante von UBE2L6 und die V1 sowie V2 des CMPK2 Gens nicht exprimiert werden. Eine mögliche Ursache für das nicht-Exprimieren von UBE2L6 V2 könnte sein, dass es aus in HEK-293T Zellen degradiert wird. Hingegen wird UBE2L6 V.1 sehr gut exprimiert (→4.4). Daher könnten auch Gründe, wie eine defekte CMV-Promoterbindestelle im Plasmid, die Ursache sein. Dies könnten auch die Ursachen für die fehlende CMPK2 Expression sein, jedoch konnte in Rahmen dieser Arbeit und ihrer zeitlichen Begrenzung diese nur zwei Mal getestet werden. CMPK2 ist das einzige Protein aus den gewählten Kandidaten, welches in Mitochondrien lokalisiert ist. Der verwendete NP40 Lysepuffer ist möglicherweise nicht optimal, um eine Doppelmembran aufzuschließen, welche die Mitochondrien besitzen. Daher wäre ein weiterer Expressionsversuch vonnöten, in dem die Zellen, welche mit CMPK2 transfiziert wurden, nicht mit einem NP40-Lysepuffer, sondern mittels Ultraschall aufgeschlossen werden. Diese Methode zeigt sich als deutlich effektiver, schwer zu lysierende Membranen aufzuschließen. Genauso stellt die Expression von LAP3 ein Problem dar. Es konnte einmal erfolgreich nachgewiesen werden, doch war

die Expressionsstärke sehr schwach. Spätere Versuche scheiterten bei den Nachweisen. Somit lässt sich zu dem Infektionsversuch mit den Reporterviren keine Aussage über CMPK2 und LAP3 treffen, da sie dafür exprimiert sein müssten. Doch es besteht die Möglichkeit, dass die in HEK-293T Zellen nicht zu translatierenden Gene in Monozyten zu exprimieren sind.

Die Proteine SAMD9, SAMD9L, SAMSN1, UBE2L6 V1 und HERC5 konnten zuverlässig nachgewiesen werden. SAMSN1 und UBE2L6 V1 zeigten eine besonders hohe Expressionsstärke. In zwei unterschiedlichen Infektionsexperimenten in HEK-293T-Zellen konnte keines der nachweisbaren Proteine einen signifikanten Unterschied zu der Kontrollprobe, dem Leervektor, aufzeigen. Die positiv-Kontrolle des Versuchs, der Restriktionsfaktor rhTRIM5 α , konnte aber auch keinen Unterschied zeigen. Es muss jedoch betrachtet werden, dass dieser nicht im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Somit ist davon auszugehen, dass die Zellen das Protein vom Vektor nicht exprimieren. Denn eine Restriktion in HEK-293T-Zellen ist mit rhTRIM5 α nachgewiesen worden (59). Zudem ist unklar, ob der unbekannte Restriktionsfaktor überhaupt eine Restriktion in HEK-293T-Zellen auslöst. Dem Restriktionsfaktor SAMHD1 ist dies auch nicht möglich, da sich HEK-293T Zellen aktiv teilen (46). Es könnten vielleicht auch wichtige Kofaktoren in den HEK-293T-Zellen fehlen, welche in Monozyten vorhanden sind. Ein weiterer Aspekt, der berücksichtigt werden sollte, ist, dass die HEK-293T-Zellen nie durch ein Wildtyp HI-Virus infiziert werden könnten, da diesen Zellen den benötigten CD4-Rezeptor nicht besitzen. Die Infektion konnte nur mithilfe von pseudotypisierten VSVg Viren vollzogen werden. Um tendenziell eine Restriktion der gewählten Proteine auszuschließen, müsste eine Infektion in hergestellten stabilen monozytären Zelllinien, welche das Proteine in einem gleichen Level exprimieren, erfolgen. Die HEK-293T-Zellen wurden lediglich transfiziert, wodurch in jeder Zelle eine unterschiedliche Menge an Plasmiden und somit Genmaterial der Proteine vorliegt. Das Expressionslevel der einzelnen Proteine könnte einen erheblichen Einfluss auf eine Restriktion gegen HIV haben. Daher sind Experimente in Monozyten noch in jedem Fall erforderlich.

Eine andere Alternative neben des Exprimierens der potentiellen Restriktionsfaktoren, mit dem anschließenden Infizieren und Betrachten eines antiviralen Effekts, könnte der Ansatz eines *knock out* (KO) des Gens sein. Dabei würde in der Zelle die Funktion des Proteins durch das Hinzugeben eines Inhibitors oder durch eine Mutation im Gen blockiert werden. Dadurch wäre bei einem Versuch die Wirkung des KO-Gens ausgeschlossen. Würde man also in Monozyten z.B. SAMD9 KO schalten, diese dann mit R848 stimulieren, HIV infizieren und die Restriktion würde ausbleiben, so könnte SAMD9 auch eine Restriktion zugeschrieben werden. Allerdings ist es deutlich aufwendiger und schwieriger, ein KO in primären Monozyten durchzuführen, als Zelllinien zu transfizieren. Daher wäre

diese Methode erst bei einer Tendenz zur Restriktion durch ein bestimmtes Protein interessant, um diese dann zu bekräftigen.

Eine wichtige weitere Betrachtungsweise ist, dass die gesamte Arbeit auf dem Transkriptom RNA-Tiefen-Sequenz-Screening beruht. Die Ergebnisse daraus zeigen das RNA Expressionslevel eines Gens, welches dann bioinformatisch analysiert wurde. Hier könnten auch Fehler unterlaufen sein, die so erst nicht auffallen. Doch zeigt die Transkriptom-Analyse bei IFN α Stimulation eine hohe Expression vom Restriktionsfaktor APOBEC3A, welcher durch IFN α exprimiert wird (60). Daher erscheint die Transkriptom-Analyse ein doch glaubwürdiges Ergebnis zu liefern. Doch werden dabei immer noch hunderte verschiedene RNA's für die Analyse verwendet. Es gibt damit also nur eine Tendenz, welche Gene interessant sein könnten. Eine Möglichkeit, die daraus gewonnene Information zu verbessern, könnte ein *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (Crispr)/Cas9-Screen sein (61, 62). Dabei wird gezielt ein Gen-KO durchgeführt. Würde man ein KO in Monozyten durchführen, diese dann mit R848 stimulieren sowie mit einem HIV-Reportervirus infizieren und keine Restriktion nachgewiesen werden können, so wäre der potentielle Restriktionsfaktor gefunden. Das Problem dabei wäre allerdings, dass CRISPR/Cas9 in Monozyten nur sehr schwer anzuwenden ist und ein Zelllinien Model, welches den R848 Effekt in Monozyten darstellt, denn bisher existiert dieses noch nicht (63).

Den letzten Gesichtspunkt, den ich aufzeigen möchte ist, dass die Restriktion durch TLR 7/8 vielleicht nicht die Expression des unbekanntes Restriktionsfaktors induziert. Sie könnten auch den Auslöser einer posttranslationalen Modifikation für den Restriktionsfaktor sein. Dabei würde z.B. die Stimulation der TLR 7/8 zu einer Signalkaskade führen, welche den unbekanntes Restriktionsfaktor phosphoryliert und dadurch aktiviert. Der Restriktionsfaktor würde also immer konstant in der Zelle exprimiert sein und durch die Modifikation aktiviert werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass unter Anbetracht der aufgezeigten Aspekte die verwendete Vorgehensweise keine Fehlentscheidung war. In jedem Fall werden noch weitere Untersuchungen der gewählten Proteine vonnöten sein, um einen möglichen antiviralen Effekt ihrerseits auszuschließen. Doch lässt sich weiterhin festhalten, dass die Untersuchung der unbekanntes Restriktion von HIV-1 durch die Stimulation von TLR 7/8 auch noch zukünftig vielversprechenden Ansatz für weitere Forschung im Bereich von HIV bieten wird.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit konnte gezeigt werden, dass die RNA der gewählten Gene, SAMD9, SAMD9L, SAMS1, LAP3, UBE2L6, CMPK2 und HERC5 erfolgreich aus Monozyten, welche mit R848 stimuliert wurden, isoliert und aus der cDNA amplifiziert werden konnten. Zudem konnten die Amplifikate erfolgreich mit einem HA-Tag in ein pLenti-Vektorkonstrukt kloniert und einige der Gene auch in HEK-293T-Zellen exprimiert werden. In Folge dessen konnte ein funktionierendes Infektionsexperiment mit pseudotypisierten Luci- und GFP-Reporterviren durchgeführt werden. Dabei konnte kein antiviraler Effekt von den untersuchten Genen bestätigt werden.

Der nächste Schritt zukünftiger Experimente wird es sein, Gentransfervektoren mit den hergestellten pLenti-Konstrukten herzustellen und U937 Zellen damit zu transduzieren. Durch die Puromycinresistenz würden erfolgreich transduzierte U937 Zellen selektiert und anschließend auf 96-Wellplatten zu Einzelzellklonen verdünnt werden. Von den Einzelzellklonen könnte man nun verschiedene Klone auf ihr Expressionslevel des Kandidatenproteins testen und so verschiedenste Zellmodelle für unterschiedliche Expressionslevel eines Gens zu haben. Mit diesen könnten nun auch ein Infektionsversuch mit Reportervirus durchgeführt werden. Sollte sich hierbei eine Restriktion eines der Proteine nachweisen lassen, so würde das nächste Ziel ein KO-Experiment mit dem Gen sein. Dies würde bekräftigen, dass es sich um den unbekanntesten Restriktionsfaktor handelt.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide

7.1.1 Klonierungsprimer

Tabelle 15: Klonierungsprimer mit den jeweiligen Nummer und Sequenzangaben.

| Nr. | Name | Sequenz (5' → 3') |
|-----|---|---|
| 72 | SAMD9: HeHo72 fw HA.SAMD9 | CGA TCT AGA ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GCA AAG CAA CTT AAC CTT C |
| 73 | HeHo73 rev SAMD9 | CGA GTC GAC TCA AAC AAT TTC AAT GTC ATA |
| 74 | SAMD9L: HeHo74 fw HA.SAMD9L | CGA CCC GGG ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT AGT AAA CAA GTA TCT CTA C |
| 75 | HeHo75 rev SAMD9L | CGA GTC GAC TCA AAT TAC TTC TAT ATC ATA |
| 76 | SAMSN1: HeHo76 fw HA.SAMSN1 | CGA GGA TCC ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT CTC AAG AGA AAG CCA TCC AA |
| 77 | HeHo76 fw HA.SAMSN1 | CGA GTC GAC TCA GTC ACT TGG CTC TGT GAT AA |
| 78 | LAP3: HeHo78 fw HA.LAP3 | CGA TCT AGA ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TTC TTG CTG CCT CTT CCG G |
| 79 | HeHo79 rev LAP3 | CGA GTC GAC TCA AGC ATT GTC TTG ACT GAA |
| 80 | UBE2L6 (Version 1 u. 2): HeHo80 fw HA.UBE2L6v1 | CGA TCT AGA ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT ATG GCG AGC ATG CGA GTG G |
| 81 | HeHo81 fw HA.UBE2L6v2 | CGA TCT AGA ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT ATG GCG AGC ATG CGA GTG G |
| 82 | HeHo82 rev UBE2L6 | CGA GTC GAC TCA GGA GGG CCG GTC CAC TCC GA |
| 83 | CMPK2 (Version 1-3): HeHo83 fw HA.CMPK2 | CGA TCT AGA ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GCC TTC GCC CGC CGG CTC C |
| 84 | HeHo84 rev CMPK2v1 | CGA AGT ACT TCA CGG TTC ACT AAA ACT ATT C |
| 85 | HeHo85 rev CMPK2v2 | CGA AGT ACT TCA CTT TTG ACG AAA CAC ACT G |
| 86 | HeHo86 rev CMPK2v3 | CGA AGT ACT TCA TTC CAG GCC TTG ACT CGA |
| 87 | HERC5: HeHo87 fw HA.HERC5 | CGA TCT AGA ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GAG CGG AGG TCG CGG AGG AA |
| 88 | HeHo88 rev HERC5 | CGA GTC GAC TCA GCC AAA TCC TCT GTT GTT G |

7.1.2 Sequenzierungsprimer

Tabelle 16: Sequenzierungsprimer mit den jeweiligen Nummern und Sequenzangaben.

| Nr. | Name | Sequenz (5' → 3') |
|-----|-----------------------------|------------------------|
| 9 | pLentiCMVGFPPuro Cmv_fwd | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG |
| 95 | Rev_Primer | GCAACATAGTTAAGAATAC |
| | HA-SAMD9: | |
| 100 | SAMD9_F2seq_881 | AAAGTCACCAATGATACCAA |
| 101 | SAMD9_F3seq_1781 | AGATCCCCTCATTGAGACTT |
| 102 | SAMD9_F4seq_2681 | GTATTGCCGTAATACAGCAA |
| 103 | SAMD9_F5seq_3581 | TTGCTCTTTTGGATTAGCA |
| | HA-SAMD9L: | |
| 110 | SAMD9L_F2seq881 | TGCAGAACAATACACCATCT |
| 111 | SAMD9L_F3seq1791 | AATGAAGATGGAAGATGAAC |
| 112 | SAMD9L_F4seq2691 | AATGAAGATGGAAGATGAAC |
| 113 | SAMD9L_F5seq3591 | CTTGGGTGAAATAGAAGTTG |
| | HA-HERC5: | |
| 114 | HERC5_F2seq_881 | GGTATAGAGTGA CT CAGATA |
| 115 | HERC5_F3seq_1800 | CTCAATTTTTTTGTAGAAGT |
| 116 | HERC5_F4seq_1781 | AAGACATTATCAAATTATTC |

7.2 Gensequenzen der klonierten GOI

Im Nachfolgendem sind die Gensequenzen der klonierten Gene, welche mittels Sanger-Sequenzierung ermittelt wurden, aufgezeigt. Ein roter Hintergrund hebt den angefügten HA-Tag, ein gelber eine stille Mutation gegenüber der Referenzsequenz¹ und grün eine Mutation, welche eine Auswirkung auf die Translation hat, hervor. Bei allen Genen wurde dabei gewollt die Abbruchsequenz zu "TGA" geändert.

¹ www.genecards.org

SAMD9

ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGCAAAGCAACTTAACTTCCAGAAAATACAGATGATTGGACAAAAGAGGATGTAAATCAGTGGTTAGAAAATCATAAGAT
 TGACAAAAACACAGGGAATTT(T→C)TGACTGAACAAGACGTGAATGGAGCAGTCTTGAAGTGGTTAAAAAAGAACATCTTGTGATATGGGCATCACATGGACCA
 GCTATTCAAATAGAAGAATATTCAAAGAATTGCGGAAAACAGCCATTGAAGATTTCGATTGACAGATCTAAGATGGGAAAGCCAGTAAAAATGCTCTAAAGACAAA
 CTGTGCTCTAAAAGGAACGTAGAGAAAACCTCAAAGCAAAAACAAAAGGTAAGAGAAACCCAGATATGGCTAATCCGCTGCAATGAGTACAACCTGCTAAAGTTCTAA
 GTCATAAAAAGTTGAGCTCATAGAAGATAAAATAGATTATACAAGGAAAGGCAACCCATAGACCTGACATGTGTATCATATCCATTTGATGAATTCAGTAATCCAT
 ATCGTTACAAGTTGGATTTTAGTCTACAGCCTGAAACAGGACCAGGCAATCTCATTGATCCGATACATGAATTCAAAGCCTTCACAAATACAGCAACAGCCACAGAAGAG
 GATGTCAAGATGAAATTTAGCAATGAGGTTTTCCGATTTGCTTCAGTCTGTATGAATTCACGTACCAATGGCACTATTTCATTTGGAGTCAAAGACAAAACCCATGGGAAA
 ATTTGGTCATCAAAGTCACCAATGATACCAAGGAAGCCCTCATAACCATTTCAATCTGATGATAAACAAGTATTTTGAAGACCATCAAGTCCAACAGCAAAGAAGTG
 CATTGAGAGCAAGATTTGGAAAGTTTACTGCCAAATAGTACTCTATCTGACAGATTTGTTATTGAAAGTGGACATTATCCACAGTTCTCTGAATGCCAATATGATTAT
 TTCCAGATTAATAATGCAAAATTAACAACAACAAAATATGGGAACAAGTAAAAAATTTCTCACTATTTTGTCGAGATGGGACCAGCTCTAAGGACATTACGAAAAATAAAG
 TTGATTTTCAGAGCATTAAAGCAGATTTTAAACACTGGCAGAGTCCAGAAAAGCAGCAGAAGAAAAATTCAGAGCAAAAACAAATAAAAAAGAAAGAGAGGGACCAA
 AGTTGGTTAAATTTGACAGGAAATCAAGATTTGTTAGATAATTCATACTATGAACAGTACATCTTGTAAACAAATAAATGCCACCAGATCAACAAAACACTTAGATT
 TCCTGAAGGAAATTAATGGTTTCTGTATTGGAGTTTGTATCTGAGTCTAACATCAATGGAGTGGTCAAAGTTTACAAGAAAAGCCGAGTACGCAACCTTCACTTTCCA
 AGTGTATATGTAGAACAGAAAACACCAAAATGAGACGATTTACTCTAAATCTTTACCATCAACCCAGCTGGATTTTCTGCAATGGCAGGTTAGACCTTGACAGTGA
 AAAATAAACCCTTTGATCCAAGTTCTGGCAAAGAGAAAGAGCTTCTGATGTCAGGAAACTGATTTCACTTACACATGAAGACATAATGCCAAGAGGGAAGTTTT
 TGGTGGTATTCTATTACTGCTCTGTGGATGACCAAGAGATCCCCTCATTGAGACTTCTGTGCTTCTACCAGGATCTCAAAGGAATGAAAAATATACTGTGATTTG

TGTGCCACCACACATATTTTCAGGGATGGAAAGATCTACTTGAAGCAAGATTAATAAAACACCAAGATGAAATTTCAAGCCAATGTATTTCTGCTTTAAGCCTTGAAGAGA
TCAATGGCACTATTTCTAAACTAAAACTGTGTACTCAATCTTCAAAAAGGCTTTTGGCATCTATTGGTTTATCGACTGTCTTCTGAAAAAGGAAGATATCATGACTG
CTCTGGAAATTTCTGTGAAAATGAAATGTGTAGGGTACACTGTTAGAGAAGCAAAAATAAAATCTTGAATTCAGGCATCAAAAGAGGAAGACTCTATCGAGTGG
CAAAAGTGTCACTGGTGAACCTGTCTCTGAAAAGTTATCTTCCACTTTTGTCAAAAAGGGATAAATATGAAAAGACTTGAAGCAATGATTCAAAAGCTGGCAGATTC
TTCTAAACCAACAAGTACCAAAATTTATCATCTGTATCATCATCCAGGCTGTGGGGAACTACCTTGGCTATGCACATTTCTGGGAACTAAGGAAGAAATTCAGATGTGC
TGTGCTGAAAAACAAGACAGTGGATTTTCTGAAAATGGAGAACAGGTAACAGTTAATCACCTATGGGGCAATGAACCGTCAGGAATACGTACTGTACTACTCTTG
TTGATGATTTTGAAGAACAAGATAATGTCTATCTTGCAGTACTCTATTCAAACAGCTATAGCTAAAAAGTACATTGATATGAAAAACCTCTGGTGTATTCCTAAAT
GTATGAGATCAGAAAATCTGAAAAAGTGAAGGATCCAGACAGTATTGCCGTAATACAGCAACTCTCTCCAAAAGAACAGAGAGCTTTTGTAGCTTAAATGAAAGA
AATCAAGAACAGCATAAAAACCTTTGAGGATTTTATCTTTATGATCATGAAAAACAAATTTAATAAAGAATACATAGAAAATGTGGTCCGGAATATCTGAAAGGGG
AGAATATTTTACCAAGGAAGCAAAAGCTTTTCTTTCTGGCTCTTAAATTCATATGTGCCTGATACCACATTTCACTATCACAGTGTGAAAAATCTTAGGAATGG
AAACAAGAAGGCTTTCTGGGGGCAAGAAAAATTTGAAGACAAGATGGGCACCTACTTCAAAATGAGCTATGATAAAAAACAGAGGTCATCGAATGGGGAAGTACTGTGGAGTA
CGCATCATTACTCTTTGATTGCGAGTCTCACTGGAAGAATTGAAGAAAAGCTATCACCTGAATAAAAAGTCAAATTTGTTGGATATGCTAACTGAGAATTTGTCTTC
GATACTGGTATGGGAAAAAGTAAATTTTGAAGATATGCACACACTCTACTACAAGACACCGCATGAAATGAAAGTGAACAGGAATTTGGTTTCCCATTTAT
TGAAGCATTACATAAAGATGAAGGAAATGAAGCAGTTGAAGCTGTATTGCTTGAAGATCCATCGGTTCAACCAAAATGCATTCTTTGCAAGCGTGGCAAGACATT
TCTACATTAAGAAGGACTTTGGCAATGTCTAAACTGGGCAAAAACAAGCAAAAATCATAGAACCTGACAATTTCTATATCTCAGATACACTGGGTCAGTCTACAAA
AGTAAATAAAGATGGTGGATAGAGGAAAACGGAGGAAACGGGAACATTTTCAGTTGATGATCTAATTTGCTTTTGGATTTAGCAGAATGCCTCAAGTGCATTCAAAGA
ATCTCAACAGCAAGTGAAGATAGAGAGTATGAAGTGAAGGAAAGATTTGATCCGAAGTCAAAAAGGCGGTATGATACATTAACAATAGCTGGTTATCAAGGAGAGATA
GAAGTTGGGCTTTACACAATCCAAATTCAGCTCATTCTTTTGTGATAATAAAAATGAGCTATCTAAAAGATATATGGTCAATTTGTATCAGGAAGTACTGTGGAGTA
CAGGGGATCCAAAATGAATATAAATAGCCCTCAAAAATATATCTTATTTAACTAAATGAAATTTTCTTTGAAAAAGTCTTTGATTTTGTATGAATACTTTGT
CCTGCTAAAACCCAGGAACAATATTAAGCAAAATGAAGAGGCCAAAACCTCGGAGAAAAGTGGCTGGATATTTAAGAAATATGTAGATATATTTGTCTTTAGAAGAAT
CACAAAACACACAGGCTTTGGATCAAAGTTCAGTGAAGCCACTCAAGTAGAGAGATGCGAGAGAACTAGTAGCTTTAAAAGCAGACAAGTTTCTGGGCTCTTGG
ATATCTTATCAAAAGTCAAGAGGATGTATAAGCACTATGAAATGTATAGTGAACGAATATACTTTCTCTTAGAACATGCATGTCAAAATCCAGTCAAAAAGAAAAGC
TAAATTTTCATCTTGGCCAACATTTCTCTCTGTATCCAACCTACCTCCAGATTAGTAAAGCCAGTTGAAAAACTAAAAGATCAGCTTCGAGAAGTCTTGAACCAATAG
GACTGACTATCAGTTTTCAGAACCGTATTTCTAGCTTCCCTCTTATCTGGCCAGAAAATCAACAACCTAGATCAACATTTCTGAACAAATGAAAGAGTATGCTCAAGCAC
TAAAAAATCTTTCAAGGGGCAATATAAACATATGCATCTGACAAAGCAACCAATTCATATTTCTTTCTTGAACAAATGCATGTCAAAATCCAGTCAAAAAGAAAAGC
AAAATTTGACCAGTCTTAAAGAACACAGATATTAATCTTGTGGCAGAGTGGAGATGTGTGGAAGGAGGAAAAAGTCCAAGAATTTTGTCTCGTTTACAAGGTCG
AGCTGAAAAACAATTTTATATAGAAATATGGAATCAATGAAAAATCACAAATCCCATCACTCCCGCTTTTTAGGTCAACTTAGAAGTGGCAGAAAGCATAGAGAAGG
TGCTTTTTACCTGGGATTTCCATTTGGAGGCCACTTGCTTATGACATTTGAAATGTTT(A->G)A

SAMD9L

ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCCTAGTAAACAAGTATCTCTACTGAAATGATTAAGACTGGACCAAAGAGCATGTGAAAAATGGGTAATGAAGACCTTAA
GATTAATGAGCAATACGGGCAAAATCTGCTCAGTGAAGAAGTAACAGGATTAGTCTGCGAGGAATTAAGTGAAGAGCACCTGTAGAAAATGGGGCTACCATGGGGTCCA
GCATTTTGATAAAAACGTTTACACAACAAATTTGAATAGTAAAGTCCCTGAAAGTGACAATCATGATCCGGGACAATTAGATAAATCAAAAACCGTCCAAAACAGAACCCA
GAAAAATCCAAAACACCAAAAAGGAAGAAGAAAATTCATGTCTATTAATTTGATTATGATCCAGAGATCAGAGATATCAAAAAGGAAGTCAATCTTTATG
AAAGAAATGTGTTAGATGAAGTACAAATGTCAAAACAGCAAGAAAAGGGTAAGCTAATTAACATGAAACAATTGACTTGTAGCCATATCTTTTGTAGCAGTCCATGACAG
CCATCGCTACATAGAACATTACTCTACAACCTGAAACAGGAGCACTCAATCTCATTGATCCAATACATGAGTTCAAAGCTCTCACAAAACAGAAACAGCCACGGAAAG
TGGACATTAAGATGAAATTCAGCAATGAAGTCTCCGATTTGCATCAGTTGTATGAATTCACGCCAATGGCACCATCCATTTTGGAGTCAAGGACAAAACCCATGGA
GAAATTTGTTGGTGTGAAATCACCAGTAAAGCTGCCTTCATTGACCCTTCAAT(G->A)TAATGATCAAAAAGTATTTGAAAGAAAGTGAAGTCAATGAAGCCAAGAGT
GTATTCGGGAGCCAAGTTTGTGGAAGTCTTCTGAGAAACAATACACCATCTGACAGATTTGTCAATTGAAAGTTGATACTATTCAAAAACCTCTATATGTAATGATAAGT
ATTTCTACATTCAGATGCAAAATTTGTAAGATAAAAATGGAACAAAACCAAAATCTTCACTGTTTGAAGAGAAGGGGTAGCTTAGGGATATCTGGCCAATTTCC
AAGCAACGGGATGTAGATTTCAAGGCATTTTACAATAAATGAAAGTCACTGGTATGATCTAGAAAAGAGGCTGAAGAAGAGTATGGAATGAAGGCAATGAAGAAGGAGA
GTGAAGGACTAAAGCTGGTTAAACTTCTCATAGAAACCGAGACTCACTGGTAAACTAATCAATCAATGAAACAATTGACTGGTACATTTGTAACAAATAAATGCCATCAAAAACAAATA
AAGCACTTAGATTTTTTAAAAGAAATTAATGGTTGTGTGTTGGAGTTGATCCTGAATCTATGATCAATGGAGTGGTCAAAGCTTACAAGAAAGTCCGGTGGCAAAA
CCTTCACTTTCCAATCAATATGAAGACAAGCAACTAACATGTGGGAGAAGATTTCTACTCTTAATCTTTACCAACAGCCAGCTGGATTTTCTGCAACGGCAGATCAGA
CCTGAAAAGCGAGACATATAACCTCTAGAACCACATTTATGGCAGAGAGAAGAGCTTCAGAAGTCAAGAACTAATTTTATTTCTCAGATGAAAATATAATGACA
AGAGGAAAATTTTGGTAGTGTCTATTACTCTCTCAGTGAAGGCCAGGAGATCCACTCATGAAACTTTCTGGGCTTTCTATCAAGCTCTCAAGGAAATGGAAAAT
ATGTTGTGATCTCTGTAAACTCACATATTTATCAACGATGGAAGATCTACTACAACAAGAATGAAGATGGAAGATGAACAAACCACAGTATTTCCACTTTAAA
TATAGAAGTGGTAAACAGCACTATCTTAAACTAAAATCGGTGACTCGGTCATCAAGAAGGTTTTTGGCCCGCTGGATCTTCTCAGTTATCTAGAGAAAAGAAAAG
AGGATGCTTGAAGTCACTGGAAATCCTCTGTGAAAATGAGTGTACAGAGACAGACATCGAAGAAAGCAAAATCTAAATCTGGAGTTTGAAGAAATCAAAAAGAAAGAAC
CTTTTATCGAGGTGGCAAAGTATCCTGGTGAACCTTCTATTTTCTTCTGAAAACTATCTTCTCAGATTTTGTAAAAGGGACAGTATGAAAAGCTTAAAGATTTAATACAC
TGCTGGGACAGTCTCTAAACCAATATTTGCAAAAATCATCAATCTTATCATCATCCAGGCTGTGGAGGTACCACACTGGCTATGCATGTTCTCTGGGACTTAAAGAAA
AACTCAGATGTGCTGTGTTAAAAACAAGACAAGTATTTGCGAGAAATGCAGAGCAAGTATCAATCTGGTCACTATAGGGCAAAGAGCCATCAGGATTACATCC
TGTGCTTCTCTTGGGATGATTTTGAAGAAACAAGAAAATGTCTACTTTCTACAAAATGCCATCCATTCGGTTTTAGCAGAAAAGGATTTGGGATATGAAAAACATTGGT
AATATCTTAAACTGCATGAGATCCCGAATCCAGATGAAAAGTGAAGAAATGGCAGACAGTATTGCACTAAAATACCAACTTTCTTCAAGGAACAAAAGAGCTTTTGGTG
CCAAACTGAAGGAAATTTGAAAAGCAGCACAAGAAGTGTGAAAATCTTTATCTTCAATGATCATGAAAAGCAATTTGATGAAACATATATAGAAAATGTAGTCAGGAAT
ATCTTAAAGGACAGGATGTTGACAGCAAGGAAGCACAACCTTCTTCTGGCTTACTAGCTTATGTTACTGACTTCAATATGTTACTGACTTCAATTTTACAGTGTGAATA
TTTTTGGGAATCATATACACTAGTACACCTGGGAACCTGAAAAGCTTAGAAGACAAGATGGGAACCTTATTCTACACTCTAATAAAAACAGAAAGTTCAGAAATATGGGAG
ATACACAGGTGTGCGTATCATTACCTCTGATTGCCCTGTACTGTCTAAAAGAACTGGAAGAAAGCTATCACTTGGATAAATGTCAAATTTGCAATTTGAATATATTAGAAGA
GAATTTATCTATGATTTCTGGAATAGGAAGAGACAATTTCAACATGATGTTCAAACCTTCTGCTTACAAGACAGCGCAAGGTGTATGGAGATGAAACAGACACTCTGT
TTTCCCATTAATGGAAGCTTACAGAATAAAGACATTTGAAAAGGCTTGTAGTGCAGGAAGTAGACGATTTCCACAAAATGCATTCATTTGTCAAGCTTACGAAAGACAT
TTCTACATTAAGAGAAGGACTTTAACACAGCTTGGACTGGGCACGTCAGGCCAAAATGAAAGCACCTAAAAATCTCTATATTTTCAGATACACTAGGTCAGTCTACAAA
AAGTGAATCAAATGGTGGTTGGATGGGAACAAAACCTGTAGGAGCACTACTGTTAATGACCTAACACATCTCTAGAAAGTGGGAAAAAGCCTCAAGAGCTTTCAA
GAATCCAAAAGCACTGATAGTAAAACTATGAAACCGGAACTGTCCACACAGAAAGTCCAGAGACGATATGACATGATACACAGCTGTTTCTTGGTGGTGA
TAGAAGTTGGTCTTAACTATGACAGATTTCTCAGCTCACTCCCTTTTCCACAAAAGAAAATTAATCAAAAACATATGGTGAACATTTTATCAGGAAAGTGGACCA
TTCTCTCTGATCCAGAAATGAATGTTATTTGGCTTTAGCAAGTTCACATCCACCTAAAAATTTACAATCAGATCTGAAAAGGTGCTTTGACTTTTTTATTGATTATAT
GGTTCTCTGAAAATGAGGTATACCAAAAAGAAATTCAGAAAATCATGTTAAGCAAGAAAGTCACTGTTGTTTCAGGAAATACACAGAACTTTTCTGTCAATTTGGATC

CATGTCTATTACAAAGTAAAGAGAGTCAATTACTCCAGGAGGAGAATTGCAGGAAAAAGCTAGAAGCTCTGAGAGCAGATAGGTTTGTGGACTCTTGGAAATCTTAAAT
 CCAAACACAAAGATGCTACCACCATGGAAAGTATAGTGAATGAATATGCCTTCTACTGCAGCAAACTCAAAAAAGCCCATGACAAATGAGAAAACAAAATTCATTTT
 GGCCAAACATTATTCTGAGTTGTCTAAAGCCCAACTCCAAGTTAATCAACCACTTACCACGCTAAAAAACCACTCCGAGAGGTTTGGCAATTTGTAGGACTAAGTCATCA
 ATATCCAGGTCTTATTTCTTGGCCCTGCCTCTGTCTGGCCAGAAAATCAAGAGCTAGATCAAGATTCCAACTAATAGAAAAGTATGTTTCTATCTTAAATAGATCCTC
 AGGGGACAGTACAAGCGCATGTGCAGGTCCAAGCAGGCAAGCACACTTTTCTATCTGGGCAAAAAGGAAGGGTCTAAACAGTATTGTTTACAAGGCCAAAATAGAGCAGT
 ACTTTGATAAAGCACAAAATACAAATTCCTCTGGCACAGTGGGGATGTGTGGAAAAAAAATGAAGTCAAAGACCTCTCGCTGCTTAACTGGTCAGGCTGAAGGCCAA
 GCTAATCTCTGTAGAATATGGAACAGAGGAAAAATAAAAAATACCAGTAATATCTGTTTATTCAGGTCCACTCAGAAAGTGGTAGGAACATAGAAAAGAGTCTTTCTACC
 TAGGATTTTCCATTGAAGGCCCTTGGCATATGATATAGAAGTAATTT(A→G)A

SAMSN1

ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTCTCAAGAGAAAAGCCATCCAATGTTTCAGAGAAGGAGAAACATCAAAAACCAAGCGAAGCAGCAGTTTTGGGAATTCG
 ATCGTTTTCCGGAATAATTTTATCAAAAACCAGATGATCAACTGAGGCACATGAAGGAGATCCCAAAATGGAAGTGGAGAACAAGTAAAACCTCAATAATGGAGG
 CGGTTTGGGTAATAAATGAGAGCTATTTCAATGGACAATGAAGAAAAAGTGGGTAAAAAGTACATCAAGCCCTTTCTGAGGAAAAAGGATGAGGAAGATGGAGAGAA
 TGCCCCACCATATAGAAAACAGTGACCTGTGATTGGGACCCACACAGAGAAGGTGTCCCTCAAAGCCAGTGACTCCATGGATAGTCTCTACAGTGGACAGAGCTCATCAA
 GTGGCATAACAAGCTGTTCAGATGGTACAAGTAACCGGGACAGCTTTGACTGGATGACGATGGCCCTATTCAAGACCACTTCTGTGGCCGTGCCAGAGTGCATACGGAT
 TTCACGCCAAGTCCCTATGACACTGACTCCCTCAAATCAAGAAAGGAGACATCATAGACATTAATTTGCAAAACCAATGGGGATGTGGACAGGAATGTTGAACAATAA
 AGTGGGAAACTTCAAATTCATTTATGTGGATGTCATCTCAGAAGAGGAAAGCAGCCCAAGAAAATAAAGGCAAAACCGAAGGATTAACAGCAAAAAATCCAAGACTCTG
 CAGGAGTTCCTAGAGAGGATTCATCTGCAGGAATACACCTCAACACTTTTGTCTCAATGGTTATGAGACTCTAGAAGATTTAAAGATATAAAGAGAGTACCTCATTGA
 ATTAATATTGAAAACCCAGATGACAGAGAAGGTTACTATCAGCTGCTGAAAACCTTCTTGAAGAAGAAATTAATCAAGGCAAGAAAATGAACCTGAGCCCTATCCT
 TGAGCTCAGACATCTCCTTAAATAAGTCACAGTTAGATGACTGCCAAGGGACTCTGGTTGCTATATCTCATCAGGAAATTCAGATAATGGCAAGAGGATCTGGAGTCT
 GAAAATCTGTCTGACATGGTACATAAGATTATTATCACAGAGCCAAGTGACTGA

LAP3

ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTTCTTGTCTGCCTCTTCCGGCTGCGGGGCGAGTAGTCTGCTCCGACGCTGTGGCCGTGAGACGTTTCCGGAGCCGGAGTCTCTCC
 ACCGCAGACATGACGAAGGCCCTTGTTTAGGAATCTATTCCAAGAAAAAAGAGATGATGTCCACAGTTCACAAGTGCAGGAGAGAATTTTGATAAATTTAGTCTGG
 AAAGCTGAGAGAGACTTTGAACATATCTGGACCACCTCTGAAGGCAGGGAAGACTCGAACCTTTATGGTCTGCATCAGGACTTCCCAAGCCTGGTGTAGTTGGCCCTCG
 GCAAAAGGCAGCTGGAATCGACGAACAGGAAAACCTGGCATGAAGGCAAAAGAAAACATCAGAGCTGCTGTTGTCAGCGGGTGCAGGAGATTCAAGACCTGGAGCTCT
 CGTCTGTGGAGGTGGATCCCTGTGGAGACGCTCAGGCTGCTGCGGAGGGAGCGGTGCTTGGTCTCTATGAATACGATGACCTAAAGCAAAAAAAGAGATGGCTGTGTCT
 GGCAAAGCTCTATGGAAGTGGGATCAGGAGGCTGGCAGAAAGGAGTCTGTTTGTCTTCTGGCAGAACTTGGCAGCCAATGATGGAGAGCCAGCCAATGAGATG
 ACGCCAACCCAGATTGCT(G→C)GAAATTTAGAGAAGATCTCAAAGTGTAGTAGTAAAACCGAGGTCCATATCAGACCAAGTCTTGGATTGAGGAACAGGCAATGG
 GATCATTCTCAGTGTGGCCAAAGGATCTGACGAGCCCCAGTCTTCTTGGAAATCACTACAAAGGCAGCCCAATGCAACGAACCCACCCCTGGTGTGTTGTTGGGAAA
 GGAATTACCTTTGACAGTGGTGGTATCTCCATCAAGGCTTCTGCAAAATATGGACCTCATGAGGGCTGACATGGGAGGAGTGCAACTATATGCTCAGCCATCGTGTCTGCT
 GCAAAGCTTAATTTGCCAATAATATAGGCTGGCCCTCTTTGTGAAAAATATGCCAAGCGGCAAGGCAACAAGCCGGGGATGTTGTTAGAGCAAAAAACGGGAA
 GACCATCCAGGTTGATAAAGCTGATGCTGAGGGGAGGCTCATACTGGCTGATGCGTCTGTTACGCACACAGTTTAAACCCGAAGGTCATCTCAATGCCGCCACCTAAC
 AGGTGCCATGGATGATGTTGGGATCAGGTGCCACTGGGGTCTTACCAATTCATCTGGCTGTGGAACAAACTCTTCGAGGCCAGCATTGAAACAGGGGACCGTGTCT
 GGAGGATGCTCTCTCGAACATTATACAAGACAGGTTGTAGATTGCCAGCTTGTGATGTTAAACATTGAAAAATACAGATCTGCAGGAGCATGTACAGCTGCAGCA
 TTCCTGAAAGAAATTCGTAACATCTCAAGTGGGCACATTAAGATAGACATAGCAGCGGTGATGACCAACAAAGATGAAGTTCCTATCTACGAAAGGCATGACTGGGAGGCC
 CACAAGGACTCTCATTGAGTTCTTACTTCCGTTTCAAGACAATGCTT(A→G),(G→A)

UBE2L6

1. Version

ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGCGAGCATGCGAGTGGTGAAGGAGTGGAGGATCTCAGAAGAAGCCTCCCCATACCTGCGGAACCTGTCCAGCGA
 TGATGCCAATGCTGTTGTGGCAGCTCTCTCTACCCGACCAACCTCCCTACCCTGAAAGCCTTCAACCTGCGCATCAGCTTCCCGCCGAGTATCCGTTCAAGCC
 TCCCATGATCAAATTCACAACCAAGATCTACCAACCAACGTTGGACGAGAAACGGACAGATTTGCTGCCCCATCAGCAGTGAAGAACTGGAAGCCTTGCACCAAGACTT
 GCCAAGTCTGGAGGCCCTCAATGTGCTGGTGAATAGACCGAATATCAGGAGGCCCTGCGGATGGACCTCGTCTGACTGCTGACACAGAATCCGGAGCTGTTCAGAAAAG
 AATGCCGAAGATTCACCTCCGATTCGGAGTGGACCGCCCTCT(A→G)A

2. Version

ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATCAAATTCACAACCAAGATCTACCACCCCAACGTTGGACGAGAACGGACAGATTTGCTGCCATCATCAGCAGTGAGAA
 CTGGAAGCCTTGCACCAAGACTTGCAAAGTCTGGAGGCCCTCAATGTGCTGGTGAATAGACCGAATATCAGGAGGCCCTGCGGATGGACCTCGTCTGACTGCTGACAC
 AGAATCCGGAGCTGTTCAGAAAAGTGCAGGAGTTCACCTCCGATTCGGAGTGGACCGCCCTCT(A→G)A

CMPK2

1. Version

ATGTACCCATACGATGTTCAGATTACGCTGCCTTCGCCCGCCGGCTCCTGCGCGGGCCACTGTCCGGGGCCGCTGCTCGGGCGGCGGGGGTCTGCGCTGGGGCCATGGCT
CCGCGCGCCCGTTCGTCTGGAGCTTCCCGACTGCACCTGGCTCACTTCGCCTAGCGCCGACGCCCCCGGCGACGCAGACGCCCCCGACCCCGCTGGCGGCGCTG
CTGGGGCCCCGGAGCGCAGCTACTCGCTGTGCGTGCCCGTGACCCCGGACGCCGGCTGCGGGGCCCGGGTCCGGGCGGCGGGCTGCACCAGCGCTGCTGCACCAGCT
GCGCGCGGGCCCTTCCAGCGGTGCCAGTGTCTCAGGCTGCTGTACTGTCGCCGGGCGCCAGGCCGGCGGCGCACAGCAAGGCTTCTGCTGCGCGACCCCTGGATG
ACCCTGACACCCGGCAAGCGTGTCTGAGCTGTGGGGCCCTG(T→C)CAGGAGGCACCACGCCCACTTGGGCGAGTTCGAGGCCGACCCCGCGGCCAGCTGTGGCA
GCGCTCTGGGAGGTGCAAGACGGCAGCGGCTGCAGGTGGGCTGCGCACAGGTCGTGCCGTCCCGGAGCCCGCTGCACCCGTTGGTCCAGACTTGCACAGTTCGG
TGGTCTCCCGGACCCGGGAAGCCCGGGCCGTTTGGAGGAGTGTACCTCTTTATTCCTGAAGCCGGGCAGTGTGACCTGGTCGACCAAGTGCACCAAAACAGATCC
AGAAAGGAAAGTTCAGGTTGTGCCATCGAAGGACTGGATGCCACGGTAAAACACGGTGACCCAGTCACTGAGGCAAGTTCACCTAAAGGCTGTCTTAAAGTACCA
CCCTCTGCATTGGCCAGTGGAGGAAGATCTTGTATGATGAACCAACTATCATTAGAAGAGCTTTTACTCTTTGGCAATTATATTGGCTCCGAAATAGCTAAAGAA
TCTGCCAAATCTCTGTGATTGTAGACAGGTAAGTGCACAGCACGGCCACTATGCCATAGCCACTGAGGTGAGTGGGGGTCTCCAGCACCTGCCCCAGCCCATACCC
GTGTACAGTGGCCAGAGGACTGTCAAACCTGACCTTATCTGTGCTCACTGTGAGTCTGAGGAGAGGTTGCAGAGGTCAGGCGCCGGGCATGGAGAAGACCA
GGGAAGAAGCAGAAGTGGAGCAACAGTGTGTTTCGTAAGGTAAGTGTCTACCAGCGGATGGAGAATCTGGCTGCCATGTGGTTGATGCCAGCCCTCCAG
AGAAAAGTCTGCAGACGGTATTAAGCTAATCCAGAAATAGTTTATGTAACCGT(A→G)(G→A)

2. Version

ATGTACCCATACGATGTTCAGATTACGCTGCCTTCGCCCGCCGGCTCCTGCGCGGGCCACTGTCCGGGGCCGCTGCTCGGGCGGCGGGGGTCTGCGCTGGGGCCATGGCT
CCGCGCGCCCGTTCGTCTGGAGCTTCCCGACTGCACCTGGCTCACTTCGCCTAGCGCCGACGCCCCCGGCGACGCAGACGCCCCCGACCCCGCTGGCGGCGCTG
CTGGGGCCCCGGAGCGCAGCTACTCGCTGTGCGTGCCCGTGACCCCGGACGCCGGCTGCGGGGCCCGGGTCCGGGCGGCGGGCTGCACCAGCGCTGCTGCACCAGCT
GCGCGCGCCCGTTCAGCGGTGCCAGTGTCTCAGGCTGCTGTACTGTCGCCGGGCGCCAGGCCGGCGGCGCACAGCAAGGCTTCTGCTGCGCGACCCCTGGATG
ACCCTGACACCCGGCAAGCGTGTCTGAGCTGTGGGGCCCTG(T→C)CAGGAGGCACCACGCCCACTTGGGCGAGTTCGAGGCCGACCCCGCGGCCAGCTGTGGCA
GCGCTCTGGGAGGTGCAAGACGGCAGCGGCTGCAGGTGGGCTGCGCACAGGTCGTGCCGTCCCGGAGCCCGCTGCACCCGTTGGTCCAGACTTGCACAGTTCGG
TGGTCTCCCGGACCCGGGAAGCCCGGGCCGTTTGGAGGAGTGTACCTCTTTATTCCTGAAGCCGGGCAGTGTGACCTGGTCGACCAAGTGCACCAAAACAGATCC
AGAAAGGAAAGTTCAGGTTGTGCCATCGAAGGACTGGATGCCACGGTAAAACACGGTGACCCAGTCACTGAGGCAAGTTCACCTAAAGGCTGTCTTAAAGTACCA
CCCTCTGCATTGGCCAGTGGAGGAAGATCTTGTATGATGAACCAACTATCATTAGAAGAGCTTTTACTCTTTGGCAATTATATTGGCTCCGAAATAGCTAAAGAA
TCTGCCAAATCTCTGTGATTGTAGACAGGTAAGTGCACAGCACGGCCACTATGCCATAGCCACTGAGGTGAGTGGGGGTCTCCAGCACCTGCCCCAGCCCATACCC
GTGTACAGTGGCCAGAGGACTGTCAAACCTGACCTTATCTGTGCTCACTGTGAGTCTGAGGAGAGGTTGCAGAGGTCAGGCGCCGGGCATGGAGAAGACCA
GGGAAGAAGCAGAAGTGGAGCAACAGTGTGTTTCGTAAGGTAAGTGTCTACCAGCGGATGGAGAATCTGGCTGCCATGTGGTTGATGCCAGCCCTCCAG

HERC5

ATGTACCCATACGATGTTCAGATTACGCTGAGCGGAGGTGCGGGAGGAAGTTCGCGCGCAACGGGCGCTCGACCGGGCAAGGCCCGCGACCCAGCCCGCAAGT
CTCCGGGCGCACAGCTCTGGCTCTTCCAGCGCCCGGGCTCCACCGCGCGTCTCCGAGGGTGGAGGTGACGCGCAACTCTGCTGCTCGCGGGGCGCTCGCG
GTCTTGAACGCGCGGGGGCGGCTCCAGTTCCAGCTGCTCGCGGAGCGCGGCCCGCCGACCCGAAATGCATTAATAGGAAAAACATGAAGATACATT
CCGTGGACCAAGGAGCAGACATGCTGATTCTCTCATAGATGAAAAACATTTGAGATGACAACTATAGCATGAAACATCTAAGGTTTGAAGCATTTTACAAGAA
AAAAAATAATTCAGATCACATGTGGAGATTACCACTTCTTGCACCTCTCAAAAGTGGTGAGCTTTTGCCTGGGACAGAACTGCATGGGCGAGCTTGGAGTTGGAAG
GAAATTTCCCTCAACCACACAGATTTGGAGCAGCTCGAGGAGTACCTTGGCTCAGATTTCTGCCGAGAAAGCCACAGCATGGCTTATCCATGTCTGGCA
ACATTTATTCATGGGAAAAAATGAATGTGGCAACTAGGCTGGCCACACTGAGAGTAAAGATGATCCATCCCTTATTGAAGGACTAGACAATCAGAAAGTTGAATTT
GTCCGTTGGTGGCTCTCACAGTGCCTACTCACACAGGATGGGCTGCTGTTTACTTTCGGTGTGGAAAAACATGGGCAACTTGGTATAATCAACACAGAAATGAGCTA
AGACCTGTTTGGTGGCTGAGCTGTTGGGTATAGAGTGACTCAGATAGCATGTGGAAGGTGGCACACACTTGCATATGTTTCTGATTGGGAAAGGCTTTTCTTTGGTT
CTGAAAAAGATGGCAACTGGGAAATGGTGAACACGTGACCAGTGTATCCGCTTCCAGTGAAGATATCATCAAGTGAAGAACTCAAAGTGAAGCCATACCTCAGA
AAAGGAGTTAATAATGATTGCTGGAGGAAATCAAAGCATTTTGCCTGGATAAAGAAAGAGAATTCATATGTTAATCTGAAGAGGACAATCTACTCTGAATGAAGGGA
CTGTAAGAGATGGATTGCTGATGTGGAGACTAAACGGTGGCAGAGCACAAAAAGGGAATCCAAGAGATATTTTCTCTGCTGTCTAACTGGAAGTTTTAAAG
AAAAGAAGAACTACAGAAATGATGCTGTTTATTTGGACTTAAATAAAGCAAGAAACATCTCAAGGAGTTAACCCAAAAGGACTGGATTAACATGATAACCACT
GGAGAGCCTTGGTTCATTTGCAAGGTTGTTGTAATAAGTGAAGTACCAGTCTCACTGGTTCGGAAGAGATTGGGCAACTCTGCAAGAAATCCACTTTTCAGCAAACT
GGTCCAGATGTTTAAACAGCCGTCATATGCCAGTTGGATTACTGGGATGAAAGTGTGAGGAGAATGGTAATGTTCAAGCTCTCTAGAAATGTTGAAGAGCTGCACA
GGGTAACCAGGTGAAATGTCAACTACCTGAAAGTATTTTCAAAGTAGACGAACCTTGCACCGTCTCAATTTTTTGTAGAAGTATGCAGAAGGACTTGTGGAAAATG
ACTGTGGACGCTCAGAAAAATGTACAATGCTGCGTCATATTCAGTCACTTCCATTTATCTTTAATAACTGTCGAAAAATTAACCTACTACATACAGACACACTTTAAAA
ATAGAGAGTAAAAACATAAAGCTTATCTTAGTCCGGCAGCAATGAGGAAGAAAGAGAGTCTGAATTCGCTTTGAGGCCACGTTTGTATCAACAGTCAAGGAATC
ACTTGTATGAGGATGTTTGAATCAGTCAAGTCAATTTGAGAATGAAGACCTGAGGAAAGAGTTATGGGTTTCATTTAGTGGAGAAATGGGTATGACCTCGGAGGAGTC
AAGAAGAGTTCCTACTGTCTGTTTGCAGAGATGATCCAGCCGAATATGGGATGTTATGTTACTCTGAAGGGCTTCTGATGTGGTTTCTGTCAAGCTTAAATTT
GAGAAGAAAGATACTCTTTTGGGGTCTATGTGGACTTCCCTGTCAATGCAATGTTGCAACTGTTGCCAACCTTCTTCCACTGGCACTGTTAAGAAACTTTTGGACCAAA
TGCCATCATTGGAAGACTTGAAGAACTCAGTCTGATTGGGAAAGAAATTTGCAAACTTCTGGATGATGAAGGTGATAACTTTGAGGAAGTATTTTACATCCATTTTA
ATGTGCACTGGGACAGAAACGACAAAACTTAATTCCTAATGGAAGTAGCATAACTGTCAACCAGACTAACAAGAGAGACTATGTTTCTAAGTATATCAATACATTTTC
AACGACTCTGTAAGGGCGGTTTATGAAGAATTTCCGAGAGGATTTTAAAAATGTGGCAGCAAGACATTACAAATATTCCACCCGAAGAACTGAAGGATGTGATTGT
TGAAAAATCAGATTATGATTGGAAGAACTTTGAAAAGAAATGCACGTTATGAACCAGGATATAACAGTTACATCCACCATAGTGATGTTTGGAAAGGCTTCCACAAT
TGACTCTGGAAGAAAGAAAAATTCCTGTATTTCTTACAGGAAGTGCAGACTCAAAATGAAGATTTAAATAATGAAAAAATCAATTTTGTCTGCTGAAAGTGG
AATGAAGAGACCTATAAGAGCACTGACATGTTTCAAGTCTCTCTCCCTAAATTTCTACAATGGAACAGTTGAAGAAGCGCTTCAAGAAGCCATCAACAACA
CAGAGGATTTGGCTGA

7.3 Western-Blots

Im Nachfolgenden werden alle restlichen Western Blots der Arbeit gezeigt, ausgenommen von dem in 4.4 repräsentativen Western Blot. Verwendet wurde ein PageRuler Prestained Protein Ladder als Proteingrößenstandard. Die Bilder stammen von dem Scan des Odyssey (→2.8), welche die fluoreszierenden sekundären Antikörper detektieren kann. Die rot fluoreszierenden Banden sind Proteine, an denen der sekundäre Antikörper (IRDye® 680LT Donkey anti-Mouse IgG; →2.2) gebunden hat. Dies sind die Proteine, an denen der primären Antikörper (Purified anti-HA. 11 Epitope Tag Antibody; →2.2) gebunden hatte. Die grün fluoreszierenden Banden stammen vom sekundären Antikörper (IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG; →2.2), welcher am primären Antikörper (Anti-GAPDH Antibody G9545; →2.2) gebunden hatte.

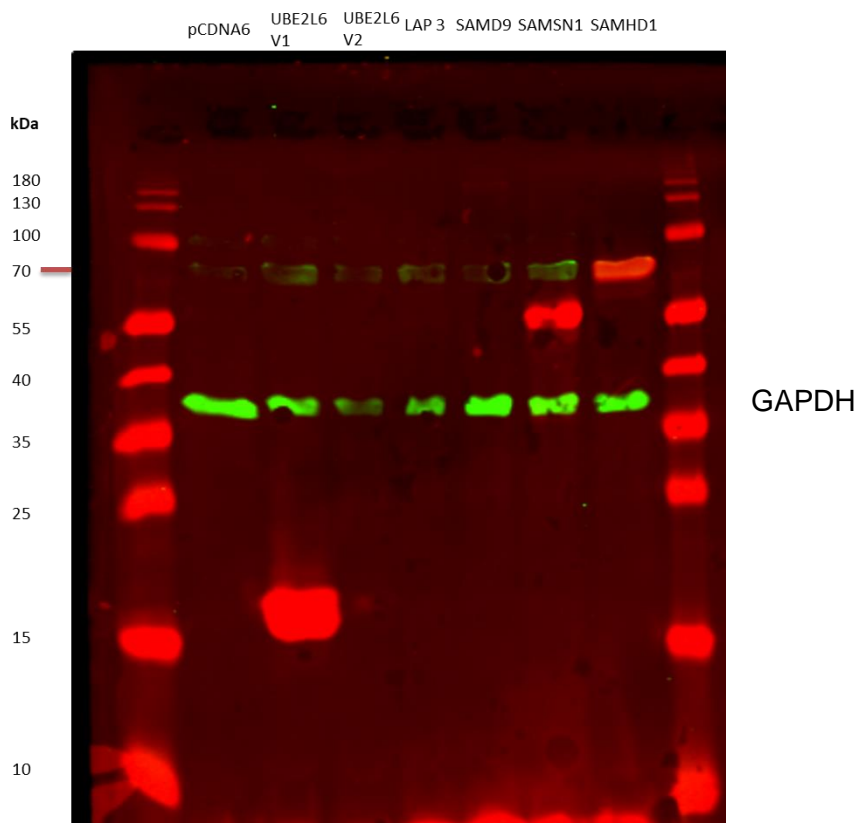


Abbildung 13: 1. Western Blot Expression der GOI in HEK-293T Zellen nach zwei Tagen

Der Western Blot zeigt, an den roten Banden zu erkennen, dass UBE2L6 V1(17kDa), SAMD9 (174 kDa) und SAMS N1 (55 kDa) exprimiert wurden. Die mitgeführte Expressionskontrolle SAMHD1 wurde auch erfolgreich exprimiert. UBE2L6 V2 und LAP3 wurden nicht exprimiert. Der Leervektor ist, wie zu erwarten, auch negativ. Die grüne Reihe an Banden zeigen eine durchweg gleichmäßige vorhanden Expression vom *housekeeping gen* GAPDH. Die grünen Banden zeigen, dass der sekundäre Antikörper an Proteinen unspezifischen bindet.

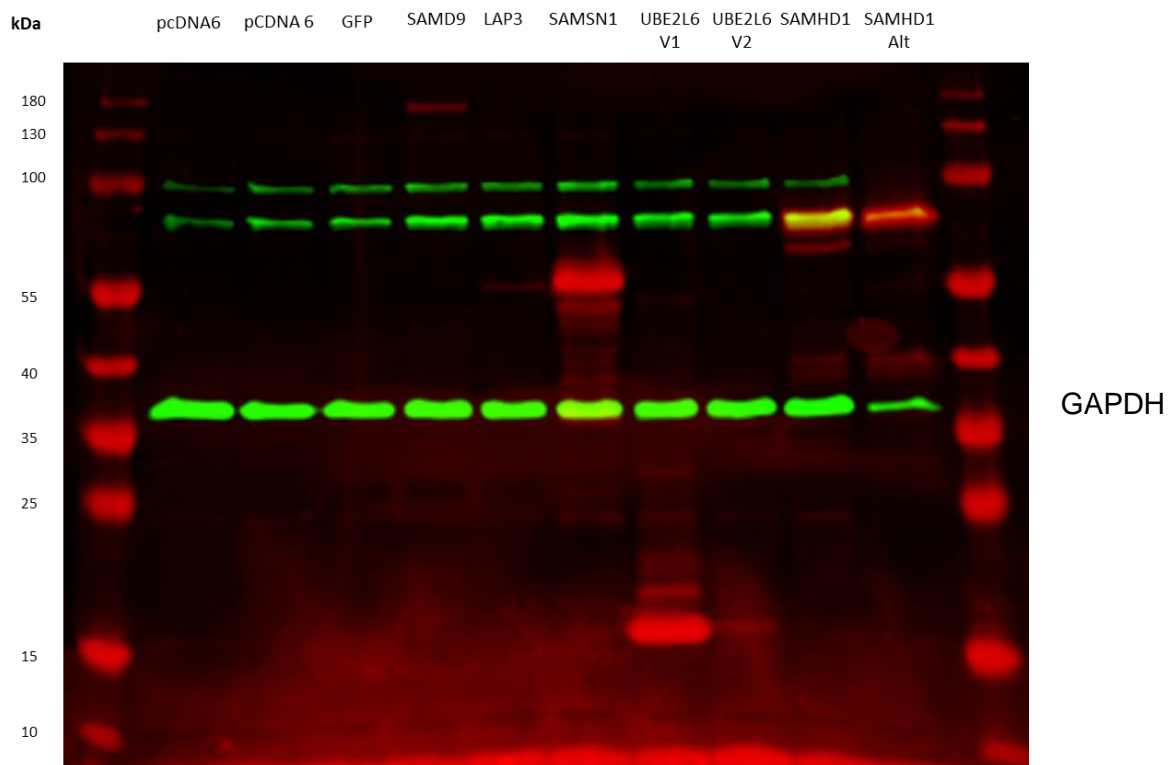


Abbildung 14: 2. Western Blot Expression der GOI in HEK-293T Zellen nach zwei Tagen

Der Western Blot zeigt den Expressionsversuch von einigen der klonierten GOI nach zwei Tagen einer Transfektion in HEK-293T Zellen. An den roten Banden ist zu erkennen, dass SAMD9 (174 kDa), LAP3(54 kDa), SAMS1 (55 kDa) und UBE2L6 V1 (17 kDa) exprimiert wurden. Ob LAP3 sich exprimiert wurde, ist nicht sicher zu sagen, da SAMS1 nahezu auf der gleichen Höhe gelaufen ist und dadurch nicht auszuschließen ist, dass etwas von dem Lysat in die Nachbartasche gelaufen ist. Die mitgeführte Expressionskontrollen SAMHD1 und SAMHD1 Alt wurden auch erfolgreich exprimiert. UBE2L6 V2 wurde nicht exprimiert. Der Leervektor ist, wie zu erwarten, auch negativ. Die grüne Reihe an Banden zeigen eine durchweg gleichmäßige vorhandene Expression vom *housekeeping gen* GAPDH. Die grünen Banden zeigen, dass der sekundäre Antikörper an Proteinen unspezifischen bindet.

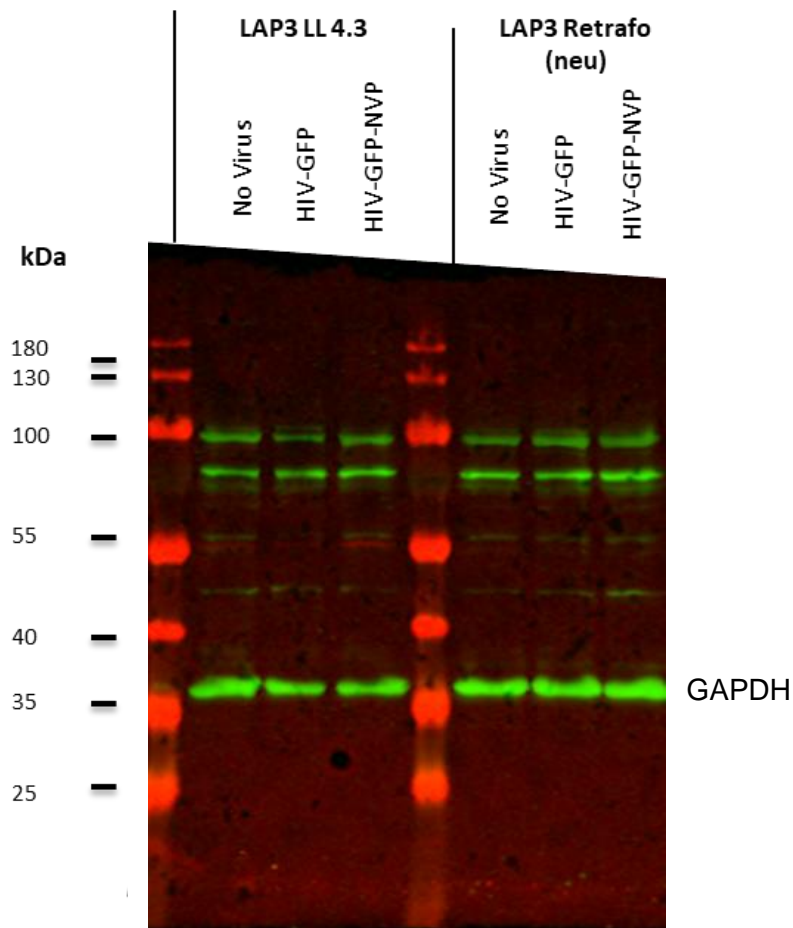


Abbildung 15: 3. Western Blot Expression der GOI in HEK-293T Zellen nach drei Tagen

Der Western Blot zeigt die Expression von LAP3 nach dem HIV-GFP Reportervirus Infektionsversuch (3.3). An den roten Banden zu erkennen ist, dass LAP3 LL 4.3 schwach und LAP3 Retrofo (neu) sehr schwach exprimiert wurden, sowohl in den infiziert wie auch nicht infizierten Zellen. Die grüne Reihe an Banden zeigen eine durchweg gleichmäßige vorhandene Expression vom *housekeeping gen* GAPDH. Die grünen Banden zeigen, dass der sekundäre Antikörper an Proteinen unspezifischen bindet.

7.4 FACS-Rohdaten

Gezeigt sind die Rohdaten der FACS-Analyse, welche mittels FlowJo Software analysiert wurden. Es wurden dazu HEK-293T Zellen von dem FACS-Calibur gezählt, die zuvor transfiziert und danach mit GFP Reportervirus infiziert (3.3) wurden. Als positiv infiziert wurden Zellen gezählt, deren fluoreszierendes GFP gemessen wurde. Eine Zelle, in den GFP detektiert werden konnte, gilt als infiziert. Insgesamt wurden 20.000 Zellen je Probe detektiert. Der *Forward Scatter* (FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts, das auf die Zelle trifft und gibt Auskünfte bezüglich ihres Volumens. Somit können z.,B. zerstörte Zellen von lebendigen Zellen unterschieden werden.

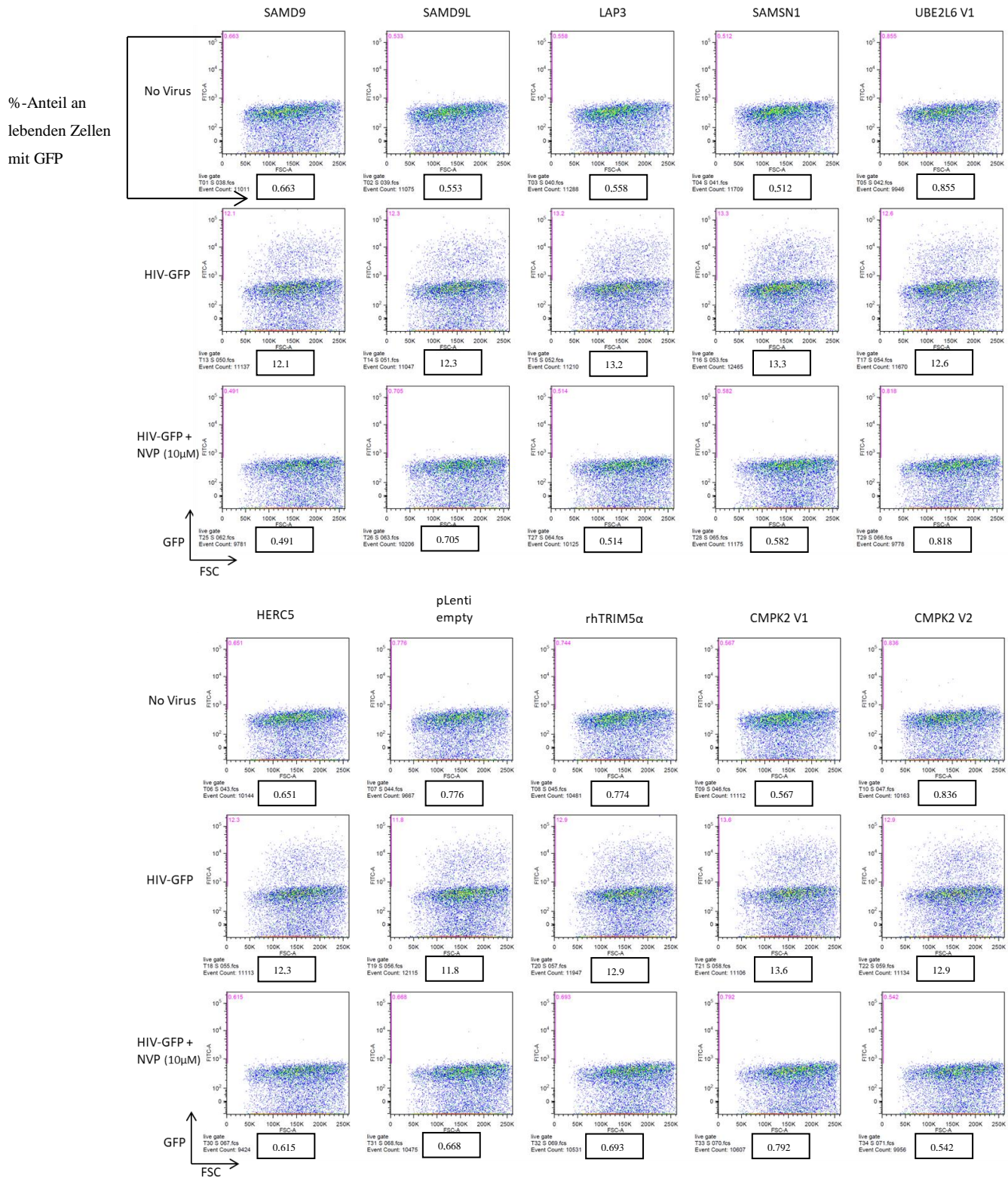


Abbildung 16.1. Rohdatensatz der FACS-Analyse

Ergebnisse der FACS-Analyse, die durch FlowJo Software erstellt wurde. Es werden mit einem HIV-GFP Reportervirus nicht infizierte und infizierte Zellen (ein Satz 1 Stunde vorher mit 10µM NVP behandelt) dargestellt. Die HEK-293T Zellen wurden zuvor mit den Restriktionskandidaten transfiziert. Das Gate, zum Zählen der positiv infizierten Zellen, wurde bei 10^3 gesetzt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede unter den Proben.

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Ausgeschrieben |
|-----------|---|
| AIDS | Acquired immunodeficiency syndrome |
| APOBEC3 | apolipoprotein B editing catalytic polypeptide-like 3 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| CMPK2 | Cytidine/Uridine Monophosphate Kinase 2 |
| CRISPR | clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| env | Envelope |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| FD | Fast Digest |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| gag | gruppenspezifisches Antigen |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GOI | Gen of interest |
| HA | Human influenza hemagglutinin |
| HD | Histidine-Aspartic |
| HEK-293T | Human embryonic kidney; T = Tumor-Antigen |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HERC5 | Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus Domain And Regulator of Chromosome Condensation 1-protein Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 5 |
| HIV | Human immunodeficiency virus |
| IFN | Interferon |
| LAP3 | Leucine Aminopeptidase 3 |
| LB | Lysogeny Broth |
| LTR | Long terminal repeats |
| Luc | Luciferase |
| rh | Rhesusaffe |
| MLV | murine leukemia virus |
| MOI | Multiplizität der Infektion |
| nef | Negative factor |
| NP40 | Nonoxinol 40 |
| NVP | Nevirapin |
| ODN | Oligodeoxynucleotid |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PEI | Polyethylenimin |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acetate |
| pol | Polymerase |
| PRR | Pattern recognition receptor |
| R848 | Resiquimod |

| | |
|----------|---|
| rev | Regulator of expression of virion proteins |
| RLU | Relative light units |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SAM | Sterile alpha motif |
| SAMD9 | Sterile Alpha Motif Domain Containing 9 |
| SAMD9L | Sterile Alpha Motif Domain Containing 9 Like |
| SAMHD1 | SAM domain and HD domain-containing protein 1 |
| SAMSN1 | Sterile Alpha Motif Domain And Src Homology Domain 3 And Nuclear Localization Signals 1 |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SIV | simianen Immundefizienzvirus |
| SOB | Super optimal broth |
| SOC | SOB + 20 mM Glucose |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| tat | Trans-activator of transcription |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNE | Tris-NaCl-EDTA |
| TRIM5 | Tripartite motif-containing protein 5 |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| UBE2L6 | Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 L6 |
| vif | Viral infectivity factor |
| vpr | Viral protein rapid |
| vpu | Viral protein out |
| vpx | Viral protein x |
| VSV-g | Vesicular stomatitis virus glykoprotein |

Literaturverzeichnis

1. S. Palmer, L. Josefsson, J. M. Coffin, HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J Intern Med* **270**, 550-560 (2011).
2. S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, H. Schätzl, *Molekulare Virologie*. (Springer Spektrum, ed. 3rd, 2010), pp. 734.
3. W. C. Greene, A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol* **37 Suppl 1**, S94-102 (2007).
4. F. Barre-Sinoussi *et al.*, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
5. R. C. Gallo *et al.*, Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503 (1984).
6. J. Coffin *et al.*, What to call the AIDS virus? *Nature* **321**, 10 (1986).
7. F. Clavel *et al.*, Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346 (1986).
8. J. O. Wertheim, M. Worobey, Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000377 (2009).
9. B. H. Hahn, G. M. Shaw, K. M. De Cock, P. M. Sharp, AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-614 (2000).
10. UNAIDS, Global AIDS Update 2016. 2016.
11. R. Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin. 2016 (10.17886/EpiBull-2016-066.2).
12. M. T. Mardigan, J. M. Martinko, T. D. Brock, *Biology of microorganisms*. (Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ 2006).
13. C. Hoffmann, J. K. Rockstroh. (Medizin Fokus Verlag, 2013).
14. C. Schütt, B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. (Springer Spektrum, 2011), vol. 3rd.
15. G. Hutter *et al.*, Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **360**, 692-698 (2009).
16. A. Monforte *et al.*, Highlights on HIV eradication in 2013. *AIDS* **28**, 1-7 (2014).
17. A. Lafeuillade, M. Stevenson, The search for a cure for persistent HIV reservoirs. *AIDS Rev* **13**, 63-66 (2011).
18. N. Chomont *et al.*, HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* **15**, 893-900 (2009).
19. T. W. Chun, A. S. Fauci, HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *AIDS* **26**, 1261-1268 (2012).
20. D. Trono *et al.*, HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* **329**, 174-180 (2010).
21. H. C. Yang, Primary cell models of HIV latency. *Curr Opin HIV AIDS* **6**, 62-67 (2011).
22. A. Lafeuillade, Eliminating the HIV reservoir. *Curr HIV/AIDS Rep* **9**, 121-131 (2012).
23. S. G. Deeks, HIV: Shock and kill. *Nature* **487**, 439-440 (2012).
24. D. Boehm *et al.*, SMYD2-Mediated Histone Methylation Contributes to HIV-1 Latency. *Cell Host Microbe* **21**, 569-579 e566 (2017).
25. E. O. Freed, HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15 (1998).
26. M. H. Malim, M. Emerman, HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* **3**, 388-398 (2008).
27. E. O. Freed, HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* **13**, 484-496 (2015).
28. W. I. Sundquist, H. G. Krausslich, HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006924 (2012).
29. C. B. Wilen, J. C. Tilton, R. W. Doms, HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, (2012).
30. F. Barre-Sinoussi, A. L. Ross, J. F. Delfraissy, Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol* **11**, 877-883 (2013).

31. Y. D. Mahnke, T. M. Brodie, F. Sallusto, M. Roederer, E. Lugli, The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* **43**, 2797-2809 (2013).
32. C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216 (2002).
33. K. Takeda, S. Akira, Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14 (2005).
34. X. Wang, W. Chao, M. Saini, M. J. Potash, A common path to innate immunity to HIV-1 induced by Toll-like receptor ligands in primary human macrophages. *PLoS One* **6**, e24193 (2011).
35. S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
36. S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa, Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
37. F. Heil *et al.*, Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
38. H. Hemmi *et al.*, Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200 (2002).
39. J. Lee *et al.*, Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6646-6651 (2003).
40. A. Xagorari, K. Chlichlia, Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. *Open Microbiol J* **2**, 49-59 (2008).
41. R. S. Harris, J. P. Dudley, APOBECs and virus restriction. *Virology* **479-480**, 131-145 (2015).
42. S. J. Neil, T. Zang, P. D. Bieniasz, Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425-430 (2008).
43. H. Lahouassa *et al.*, SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* **13**, 223-228 (2012).
44. M. Soliman, G. Srikrishna, A. Balagopal, Mechanisms of HIV-1 Control. *Curr HIV/AIDS Rep* **14**, 101-109 (2017).
45. K. Hrecka *et al.*, Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* **474**, 658-661 (2011).
46. N. Laguette *et al.*, SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654-657 (2011).
47. N. Sunseri, M. O'Brien, N. Bhardwaj, N. R. Landau, Human immunodeficiency virus type 1 modified to package Simian immunodeficiency virus Vpx efficiently infects macrophages and dendritic cells. *J Virol* **85**, 6263-6274 (2011).
48. J. Sastri, E. M. Campbell, Recent insights into the mechanism and consequences of TRIM5alpha retroviral restriction. *AIDS Res Hum Retroviruses* **27**, 231-238 (2011).
49. S. de Silva, L. Wu, TRIM5 Acts as More Than a Retroviral Restriction Factor. *Viruses-Basel* **3**, 1204-1209 (2011).
50. L. R. Black, C. Aiken, TRIM5alpha disrupts the structure of assembled HIV-1 capsid complexes in vitro. *J Virol* **84**, 6564-6569 (2010).
51. V. Simon, N. Bloch, N. R. Landau, Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol* **16**, 546-553 (2015).
52. H. Hofmann, B. Vanwalscappel, N. Bloch, N. R. Landau, TLR7/8 agonist induces a post-entry SAMHD1-independent block to HIV-1 infection of monocytes. *Retrovirology* **13**, 83 (2016).
53. J. E. Noll *et al.*, SAMS1 is a tumor suppressor gene in multiple myeloma. *Neoplasia* **16**, 572-585 (2014).
54. M. Matsushima *et al.*, Structural and immunological evidence for the identity of prolyl aminopeptidase with leucyl aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* **178**, 1459-1464 (1991).
55. H. C. Ardley *et al.*, Genomic organization of the human ubiquitin-conjugating enzyme gene, UBE2L6 on chromosome 11q12. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 137-140 (2000).
56. Y. Xu, M. Johansson, A. Karlsson, Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem* **283**, 1563-1571 (2008).

57. Y. Tang *et al.*, Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J Immunol* **184**, 5777-5790 (2010).
58. M. W. Woods *et al.*, Human HERC5 restricts an early stage of HIV-1 assembly by a mechanism correlating with the ISGylation of Gag. *Retrovirology* **8**, 95 (2011).
59. T. Y. Lin, M. Emerman, Determinants of cyclophilin A-dependent TRIM5 alpha restriction against HIV-1. *Virology* **379**, 335-341 (2008).
60. S. Stavrou, S. R. Ross, APOBEC3 Proteins in Viral Immunity. *J Immunol* **195**, 4565-4570 (2015).
61. J. P. Shen *et al.*, Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for de novo mapping of genetic interactions. *Nat Methods* **14**, 573-576 (2017).
62. P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* **157**, 1262-1278 (2014).
63. K. Suzuki *et al.*, In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* **540**, 144-149 (2016).

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Nobert Bannert bedanken, dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Bachelorarbeit am Robert Koch-Institut anzufertigen und die Aufgabe des Erstgutachters zu übernehmen. Auch bei Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich mich herzlich bedanken, dass er die Betreuung seitens der Freien Universität und als Zweitgutachter übernommen hat. Zudem, dass sie jederzeit bei Fragen zu der Arbeit mit hilfreichen Antworten zur Verfügung standen.

Auch ein Dank an alle Mitglieder des Fachgebietes 18 des Robert Koch-Instituts für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und interessante Gespräche und Hilfe bei Problemen. Insbesondere möchte ich dabei Frau Anja Richter und Herrn Dr. Steve Norley für die Hilfe bei FACS-Anliegen und Herrn Dr. Oliver Hohn (aka Fox) sowie Frau Anja Wolf, für ihre stets offenen Ohren und ihre Bereitschaft, Probleme zu diskutieren. Besonders großen Dank geht an Frau Adriana Block, Frau Martina Keller und Herrn Hussein Al-Shehabi, die mir stets mit Rat und Tat halfen, mich im Laboralltag zurechtzufinden.

Mein größter Dank gilt aber wohl Herrn Dr. Henning Hofmann. Er half mir, nicht nur bei der Themenfindung zu der Arbeit und unzählige Male im Labor, sondern machte die Zeit der Bachelorarbeit durch seine Hingabe zur Wissenschaft und seine persönliche Begleitung zu einem besonderen Erlebnis.

Dafür Danke!

Abschließend will ich mich noch bei meinen Freunden und meiner Mutter bedanken, die mir stets bei Fragen zu Grammatik und Rechtschreibung und sonstigen sprachlichen Anliegen zur Seite standen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich,

Nicolas Dominik Arnow (Matrikel-Nr.: 4881083), geboren am 07.02.1995 in Berlin (Wilmersdorf),

an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift