

***Analyse der post-entry Prozesse des rekonstituierten
humanen endogenen Retrovirus HERV-K113 im Vergleich
zu weiteren Beta-Retroviren***

MASTERARBEIT

im Studiengang Biologie
der Freien Universität Berlin

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

vorgelegt von

Luise Krüger

Berlin, Januar 2019

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Meinem Vater, in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung	6
1.1 Retroviren.....	6
1.1.1 Struktureller Aufbau der Retroviren am Beispiel von HIV-1	7
1.1.2 Genomischer Aufbau der Retroviren	8
1.1.3 Der Replikationszyklus am Beispiel von HIV-1 und antivirale Restriktionsprozesse	9
1.1.4 Post-Entry Prozesse: von der Reversen Transkription bis zur Integration.....	10
1.2 Beta-Retroviren	13
1.2.1 Das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)	14
1.2.2 Das Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus.....	14
1.2.3 HERV-K als endogenes Retrovirus.....	14
1.2.3.1 Humane endogene Retroviren	14
1.2.3.2 HERV-K(HML-2) und HERV-K113	16
1.2.3.3 Genomische Organisation von HERV-K(HML-2) und Genexpression.....	17
2. Zielsetzung.....	19
3. Material und Methoden.....	21
3.1 Materialien	21
3.1.1 Biologisches Material – Zellen, Bakterienstämme, Antikörper, Enzyme	21
3.1.2 PCR-Komponenten, cDNA Synthese	21
3.1.3 Oligonukleotide (Primer) und Sonden	22
3.1.4 Konstrukte	23
3.1.5 Puffer und Medien.....	24
3.1.6 Chemikalien	25
3.1.7 Kits	25

3.1.8 Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel	26
3.1.9 Verbrauchsmaterialien	27
3.1.10 Software	27
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion	29
3.2.1.2 Primer- und Sonden-Design	32
3.2.1.3 Herstellung von Plasmid-Standardreihen.....	32
3.2.1.4 Mutagenese-PCR.....	32
3.2.1.5 Restriktionsverdau mit Endonukleasen	33
3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.1.7 DNA Extraktion	34
3.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration	34
3.2.1.9 RNA Extraktion und cDNA Synthese.....	35
3.2.1.10 Chemische Transformation	35
3.2.1.11 Plasmidisolierung	35
3.2.1.12 Sequenzierung	36
3.2.1.13 Assays zur Detektion der RT-Aktivität.....	36
3.2.2 Zellbiologische Methoden.....	38
3.2.2.1 Zellkultivierung.....	38
3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	39
3.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels PEI.....	39
3.2.2.4 <i>In vitro</i> Infektionen (Transduktionen).....	40
3.2.3 Protein- und Immunbiochemische Methoden	41
3.2.3.1 Zellyse und Proteinextraktion	41
3.2.3.2 BCA-Assay zur Bestimmung der Protein Konzentration	42
3.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
3.2.3.4 Western Blot.....	42

3.2.3.5 p27 Gag-ELISA.....	43
3.2.3.6 Durchflusszytometrie	43
4 Ergebnisse	44
4.1 Produktion und Charakterisierung geeigneter Reporterviren.....	44
4.1.1 Vergleich der Reportervirussysteme oriHERV und HERV-K _{CON}	44
4.1.2 Generierung und Charakterisierung der Slippery Site Mutanten-VLPs.....	52
4.1.3 Charakterisierung der Viren für Infektionsversuche	59
4.1.4 Etablierung von MMTV- und JSRV-real-time PCR Systemen	64
4.2 Infektionsversuche	69
5. Diskussion.....	82
5.1 Produktion und Charakterisierung von HERV-K Reporterviren	82
5.2 Generierung und Charakterisierung der Slippery Site Mutanten-VLPs.....	84
5.3 Charakterisierung der Viren für Infektionsversuche	87
5.4 Infektionsversuche	89
6. Ausblick.....	94
7. Literaturverzeichnis	95
8. Abbildungsverzeichnis.....	99
9. Tabellenverzeichnis.....	101
Danksagung	102
Eidesstattliche Erklärung	103

Zusammenfassung

Das humane Genom besteht zu etwa 8% aus retroviralen Sequenzen, den Humanen Endogenen Retroviren (HERV). Davon umfasst die HERV-K(HML-2) Familie die jüngst integrierten Elemente und ist die einzige Gruppe, welche humanspezifische Proviren enthält. Mit HERV-K113 wurde ein Provirus entdeckt, welches vollständige offene Leserahmen für alle viralen Proteine enthält, jedoch aufgrund post-insertionaler Mutationen keine infektiösen Viruspartikel mehr bilden kann. Trotz zahlreicher Nachforschungen konnte bisher kein replikationskompetentes Provirus im Menschen nachgewiesen werden. Das Verschwinden der exogenen Vorläufer kann unter anderem auf zelluläre Restriktionsprozesse, die offenbar während des post-entry/ pre-Integrationsprozesses stattfinden, zurückgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur genaueren Charakterisierung der post-entry Inhibition von HERV-K(HML-2) und auch für die eng verwandten Beta-Retroviren MMTV und JSRV geeignete Methoden etabliert und Infektionsversuche mit Detektion von Zwischenprodukten der Reversen Transkription durchgeführt. Dafür wurden zunächst zwei verschiedene, auf rekonstituierten HERV-K113 Sequenzen basierte Reportervirussysteme zur Produktion von „virus-like particles“ (VLPs) in verschiedenen Kombinationen eingesetzt und hinsichtlich ihrer viralen RNA Kopien, dem p27 Gehalt und der RT-Aktivität charakterisiert und verglichen. Aufgrund der gewonnenen Daten wurden oriHERV-GFP und HERV-KCON, zusammen mit dem Verpackungsplasmid oricoGPP, für die VLP Produktion ausgewählt.

Weiterhin wurden sogenannte Slippery Site Mutanten generiert, welche durch Mutation der Slippery Sequenz(en) eine bzw. beide ribosomale Leserahmenverschiebungen nicht mehr für die Synthese der Vorläuferproteine benötigen. In diesen VLP-Mutanten sollte sich das Verhältnis der Vorläuferproteine zueinander verschieben lassen, sodass VLPs mit einem optimierten Partikel-zu-RT-Aktivität Verhältnis entstehen. Nach Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die Gag-Pro-Pol Doppelmutante zur stärksten RT-Aktivität in den enthaltenen VLPs führte, während die Menge an VLPs bezüglich p27 zu gering war. Für die Infektionsversuche wurden diese Mutanten aus diesem Grund nicht verwendet.

Zusätzlich zu den HERV-K(HML-2) Reporterviren erfolgte die Produktion und Charakterisierung von MMTV- und JSRV-Partikeln, welche ebenfalls in die Infektion eingesetzt wurden. Dazu wurde für MMTV ein bereits publiziertes Vektor-basiertes Reportervirussystem etabliert. Die Etablierung der neuen qPCR Systeme zur Untersuchung der RT-Produkte für MMTV und JSRV war ebenfalls notwendig, während diese für HERV-K schon bestanden. Die ddPCR wurde etabliert und für bestimmte RT-Produkte zur Bestätigung der qPCR eingesetzt.

Nach der Produktion und Charakterisierung der Reporterviren erfolgte die synchronisierte Infektion von CRFK Zellen. Diese wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion geerntet. Die extrahierte DNA der infizierten Zellen wurde sodann auf die verschiedenen RT-Produkte mithilfe spezieller Primer-Sonden Kombinationen in der real-time PCR untersucht.

Anhand der Nachweisbarkeit der early und late RT-Produkte bei den mit HERV-K- sowie MMTV- und JSRV-infizierten Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Reverse Transkription in den infizierten Zellen zunächst einmal bis zum Kernimport stattfindet. In Zellen, die mit MMTV bzw. JSRV infiziert waren, konnte jedoch nicht, wie erwartet, der gesamte post-entry Prozess bis hin zur Integration der Proviren demonstriert werden. Dennoch konnten einzelne Kopien der 2-LTR-circles detektiert werden. Die chromosomale Integration konnte bei keiner der infizierten Zellen nachgewiesen werden. Nicht detektierte RT-Produkte könnten

eine Inhibierung durch zelluläre Restriktionsfaktoren bedeuten, was bei HERV-K(HML-2) wahrscheinlich ist.

Abstract

The human genome consists of about 8 % of retroviral sequences, the Human Endogenous Retroviruses (HERV). Of these, the HERV-K (HML-2) family includes the most recently integrated elements and is the only group containing human-specific proviruses. HERV-K113 is a provirus, which contains complete open reading frames for all viral proteins, but can no longer form infectious virus particles due to post-insertional mutations. Despite of numerous investigations, no replication-competent provirus has been detected in humans so far. The vanishing of the exogenous precursors can, among others, be attributed to cellular restriction processes that appear to occur during the post-entry/ pre-integration process.

In the present work new methods were established and used for infection experiments, resulting in the detection of early and late products of reverse transcription to further characterize the post-entry inhibition of HERV-K(HML-2). For comparison, the closely related beta-retroviruses MMTV and JSRV were included in these experiments.

At first, two different reporter virus systems based on reconstituted HERV-K113 sequences were used in various combinations for the production of virus-like particles (VLPs) and characterized and compared in terms of their viral RNA copies, p27 content and RT-activity. Due to the obtained data, oriHERV-GFP and HERV-KCON in combination with the packaging plasmid oricoGPP were selected for the VLP production.

Furthermore, so-called slippery site mutants were generated, which, by mutation of the slippery sequence(s), no longer require one or both ribosomal frameshifts for the synthesis of the precursor proteins. In these VLP mutants, the ratio of precursor proteins should get shifted, resulting in VLPs with an optimized particle-to-RT-activity ratio. After characterization it could be shown that the Gag-Pro-Pol double mutant led to the highest RT-activity in the VLPs, while the amount of VLPs was too low with respect to p27. For this reason, the slippery site mutants were not used for the infection experiments.

In addition to the HERV-K(HML-2) reporter viruses, the production and characterization of MMTV and JSRV particles was carried out. For this purpose, an already published vector-based reporter virus system was established for MMTV as well as new qPCR systems for the detection of RT products for MMTV and JSRV. Furthermore, ddPCR was established and used to detect certain RT products, confirming the qPCR.

After the production and characterization of the reporter viruses, the synchronized infection of CRFK cells was performed. CRFK cells were harvested at certain time points after infection. The extracted DNA of the infected cells was then analyzed for the different RT products using specific primer-probe combinations in real-time PCR.

Based on the detectability of the early and late RT products in the cells infected with HERV-K as well as MMTV and JSRV, it could be shown in this thesis that the reverse transcription takes place at least up to the nuclear import. Using this strategy it was expected to demonstrate the entire post-entry process including the integration of the provirus in cells infected with MMTV or JSRV, however, this was not possible like published before. Nevertheless, single copies of the 2-LTR circles could be detected. Chromosomal integration could not be detected in any of the infected cells. This could be due to the inhibition of the post-entry process by cellular restriction factors, which is likely in the case of HERV-K(HML-2).

Abkürzungsverzeichnis

xg	Einheit für die Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
APOBEC	apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like
ATL	Adulte T-Zell Leukämie
bp	Basenpaare (Einheit für die Genomgröße)
CA	Capsid Protein
CCR5	<i>chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CRFK	<i>Crandell Rees feline kidney</i> , Zelllinie
C _T	<i>Threshold cycle</i>
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
ddPCR	<i>Droplet digital PCR</i>
DMEM	Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i> (Doppelsträngige DNA)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	<i>Envelope</i> (Bezeichnung für die Virushülle bzw. die Hüllproteine)
ERV	Endogene Retroviren
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
FBS	Fetales Kälberserum (= <i>fetal bovine serum</i>)
Gag	Gruppenspezifische Antigene
gDNA	Genomische DNA
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

h	<i>Hour</i> (Stunde)
HERV	Humane Endogene Retroviren
HEX	Hexachlorfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HML	<i>Human MMTV-like</i>
HTLV	Humanes T-Zell Leukämievirus
JSRV	Jaagsiekte Schaf-Retrovirus
kb	Kilobasenpaare (=1000 bp)
LB _{Amp} – Medium	LB – Medium mit Ampicillin, LB für <i>lysogeny broth</i> (nach G. Bertani)
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
MA	Matrixproteine
MMTV	Maus-Mammatumor Virus
M-PMV	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i> (Mason Pfizer Affenvirus)
mRNA	Messenger RNA
NC	Nucleocapsidproteine
NTC	<i>No template control</i> (Negativkontrolle)
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p.I.	<i>post-infection</i> (nach der Infektion)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
<i>PBS/ PB Region</i>	<i>Primer binding site</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pDNA	Plasmid DNA
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Präintegrations Komplex
Pol	Polymerase
PPT	Polypurintrakt
Pro	Protease
qPCR	Quantitative real-time PCR
R	<i>Redundant Region</i>
RLU	<i>Relative light unit</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure

rpm	<i>rounds/revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute (Einheit für die Drehzahl)
RT	Reverse Transkriptase/ Reverse Transkription
SAMHD1	<i>SAM-and HD-domain-containing protein 1</i>
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
SPA	<i>Sheep pulmonary adenomatosis</i> (Schaf-Lungenadenomatose)
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i> (einzelsträngige RNA)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Schmelztemperatur
TRIM5 α	<i>tripartite motif protein 5α</i>
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
U3/ U5	<i>Unique Region 3/5</i>
vRNA	Virale RNA
VSV-G	Glykoprotein G des Vesikular Stomatitis Virus

1. Einleitung

1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) bezeichnet morphologisch und funktionell unterschiedliche, behüllte Viren, welche als Genom zwei Kopien einzelsträngiger (+)-RNA und als Intermediat in ihrem Replikationszyklus DNA vorweisen. Ein besonderes Merkmal dieser Virusfamilie ist die Reverse Transkription, bei welcher mithilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* (RT) die virale RNA über ein einzelsträngiges DNA-Intermediat in doppelsträngige DNA umgeschrieben wird und somit die Integration ins Wirtsgenom möglich ist. Im Wirtsgenom liegt das integrierte virale Genom dann als „Provirus“ vor. Durch die Reverse Transkription wird der übliche genetische Informationsfluss, von der DNA über RNA hin zu Proteinen, umgekehrt, was für die Benennung dieser Familie (*Retroviridae*; „retro“ = lat.: zurück, rückwärts) ausschlaggebend war [1, 2].

Innerhalb der Familie der *Retroviridae* existieren zwei Unterfamilien: die *Orthoretrovirinae* und *Spumavirinae*. Während die Letzteren nur die Gattung Spumaviren bzw. Foamyviren enthalten, umfassen die *Orthoretrovirinae* sechs Genera: die α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren sowie die Lentiviren [3]. Die Abgrenzung der Genera untereinander erfolgte dabei anhand der Besonderheiten der Infektionsverläufe und den dadurch verursachten Erkrankungsformen sowie der genetischen und morphologischen Unterschiede der Viren. Abbildung 1 zeigt die Phylogenie der Retroviren.

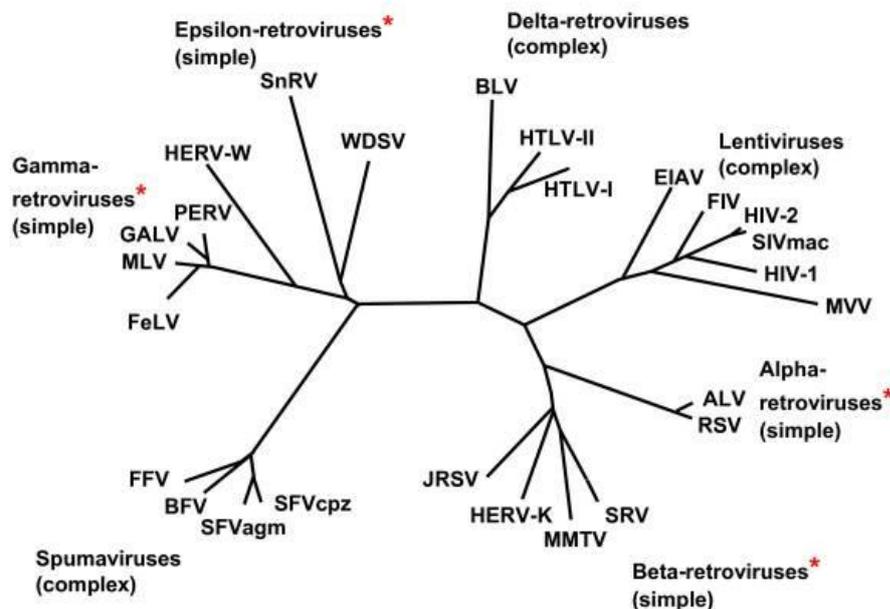


Abb. 1: Phylogenie der Retroviren. Mit einem * markierte Genera enthalten endogene Formen. Die Bezeichnung "simple" (einfach) bei den Beta-Retroviren trifft nicht auf alle Mitglieder der Gattung zu.

Weiterhin kann man zwischen *endogenen* und *exogenen* Retroviren unterscheiden. Dabei besitzen exogene Retroviren in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung infektiöser Viruspartikel benötigt werden. Die Übertragung dieser Viren erfolgt horizontal, d.h. sie können sich als freigesetztes Partikel von Organismus zu Organismus verbreiten. Endogene Retroviren wiederum sind in das Wirtsgenom integriert; sie werden vertikal über die Keimzellbahn übertragen und sind in Folge einer retroviralen

Infektion mit Integration des Virus in die Keimzellen entstanden. Nur unter bestimmten Umständen werden sie zur Produktion von exogenen, infektiösen Partikeln aktiviert. Dies ist jedoch selten der Fall, denn die Mehrheit der endogenen Retroviren ist defekt; für einen produktiven Infektionszyklus fehlen ihnen essentielle genetische Informationen. Endogene Retroviren haben sich durch weitere Reinfektionen und Reintegrationen über lange Zeit im Genom vieler Organismen angesammelt und sind außerordentlich häufig in Säugetieren zu finden [1].

Weit verbreitete Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier werden von Retroviren verursacht. Infiziert werden neben Säugetieren auch andere Wirbeltiere, wie Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische. Zu den bekanntesten Vertretern der Retroviren zählen die *Humanen Immundefizienzviren* (HIV-1/ -2), welche die erworbene Immunschwäche (AIDS; *acquired immune deficiency syndrome*) hervorrufen [4]. Nicht nur das Verursachen von Infektionskrankheiten, sondern auch ihr onkogenes Potential, können eine retrovirale Infektion lebensbedrohlich werden lassen. Als eines der bekanntesten Beispiele für ein onkogenes Retrovirus gilt das *Humane T-Zell Leukämievirus Typ-1* (HTLV-1), welches als Verursacher der Adulten T-Zell-Leukämie (ATL) gilt und maligne Lymphome auslösen kann [5]

1.1.1 Struktureller Aufbau der Retroviren am Beispiel von HIV-1

Die infektiösen Partikel der verschiedenen Retroviren zeigen einen charakteristischen Aufbau mit einem Durchmesser von circa 100 bis 150 nm (s. Abb. 1). Wie zuvor erwähnt umgibt das Capsid der Viruspartikel eine Hüllmembran, welche von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Eingelagert in die Membran sind die viralen Glycoproteine (Hüllproteine), wovon eines als transmembranes (TM; gp41) und das andere als externes bzw. Oberflächen-Glycoprotein (SU; gp120) vorliegt. Beide Glycoproteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet und von der Protease prozessiert. Mithilfe der Glycoproteine ist es dem Virus möglich, sich an die Membran der Wirtszelle zu heften und mit dieser zu verschmelzen. Mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden sind die Matrixproteine (MA). Im Zentrum des Viruspartikels befindet sich als infektiöse Einheit das Capsid (CA), welches bei HIV-1 konisch geformt ist und aus den Capsidproteinen besteht. Innerhalb des Capsids ist die virale ss(+)RNA, komplexiert mit Nucleocapsidproteinen (NC), lokalisiert.

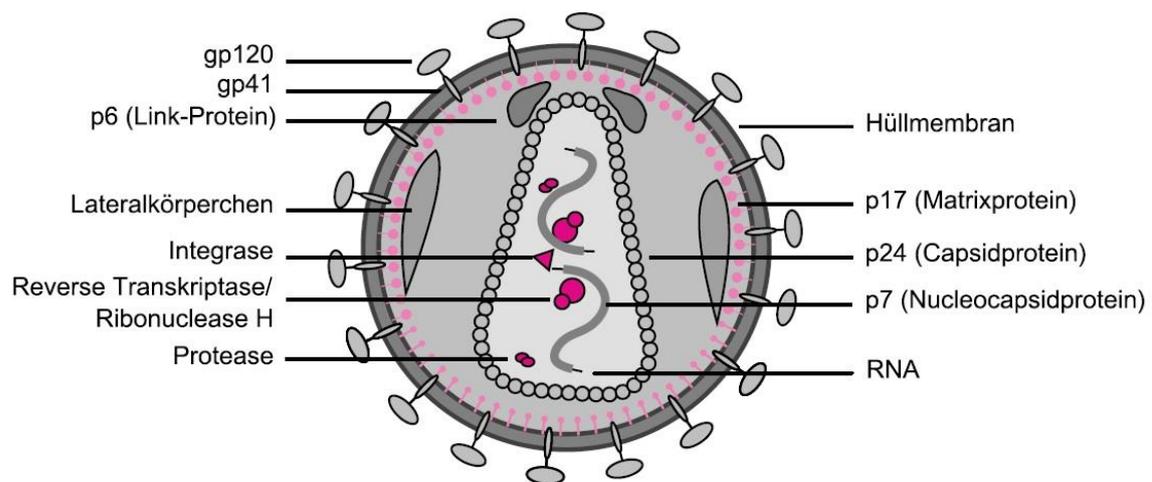


Abb. 2: struktureller Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel von HIV-1[1]

Capsid-, Matrix- Nucleocapsid- und Linkproteine (nur bei HIV) sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (*Gag-Proteine*) und werden als großes Vorläuferprotein vom *gag*-Gen exprimiert und von der Protease in die einzelnen Proteine prozessiert.

Weiterhin sind im Viruscapsid die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease zu finden, welche wichtiger Bestandteil des viralen Replikationszyklus sind.

1.1.2 Genomischer Aufbau der Retroviren

Das retrovirale Genom liegt in Form von zwei Kopien einzelsträngiger (+)RNA mit 5'Cap Struktur und 3'Polyadenylierung im Viruspartikel vor. Je nach Virustyp kann ein RNA Strang dabei ca. 7000 bis 12000 Basen lang sein. Die Genome aller replikationskompetenten Retroviren bestehen grundsätzlich aus den Genen 5'-*gag-pro-pol-env*-3'. Das *gag*-Gen kodiert für das Hauptstrukturpolyprotein Gag (gruppenspezifische Antigene), welches im Reifungsprozess von der Protease in die einzelnen funktionellen Proteine (CA, MA, NC) prozessiert wird. Die virale Protease wird vom *pro*-Gen kodiert. Sie ist verantwortlich für die Partikelreifung, bei der das Gag- Vorläuferprotein in die einzelnen funktionellen Proteine gespalten wird. Das *pol*-Gen kodiert für die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase. Die Glycoproteine der Hüllmembran (*envelope*) werden vom *env*-Gen kodiert. In Abbildung 3 sind das retrovirale Genom und die integrierte Provirus-DNA schematisch dargestellt.

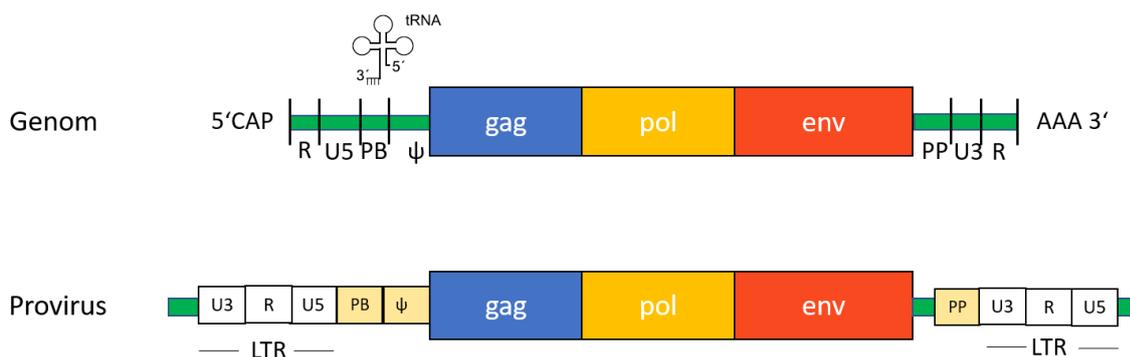


Abb. 3: RNA-Genom eines infektiösen Viruspartikels (oben) und die integrierte Provirus-DNA (unten). Dargestellt sind die Sequenzelemente, die bei allen Retrovirusgenomen zu finden sind. PB = primer binding; PP = Polypurintrakt; U (3/5) = unique Region; R = redundant Region; LTR = long terminal repeat

Das integrierte Provirus flankieren an den Enden jeweils lange, identische Sequenzfolgen; die LTR's (*long terminal repeats*). LTR's sind regulatorische Sequenzen, welche Promotor- und Enhancer-Elemente enthalten und somit für die Kontrolle der Genexpression vonnöten sind. Sie bestehen aus den Bereichen U3, R und U5. Vor allem im U3-Bereich befinden sich *cis*-aktive Sequenzen, die die Genexpression kontrollieren. In der 5'LTR Region befindet sich die *Primer Binding Site* (PBS), an der durch Bindung einer spezifischen tRNA, welche als Primer fungiert, die Reverse Transkription initiiert wird. Außerdem liegt dort auch die ψ-Site, welche als Verpackungssignal der viralen RNA dient.

Zusätzlich zu den hier dargestellten Genen, welche in jedem aktiven Retrovirusgenom zu finden sind, besitzen komplexe Retroviren noch zusätzliche regulatorische bzw. akzessorische Gene, welche unter anderem für die Reverse Transkription und Integration essentiell sind. Bei HIV-1 beispielsweise sind dies die Gene *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu*.

1.1.3 Der Replikationszyklus am Beispiel von HIV-1 und antivirale Restriktionsprozesse

Der Replikationszyklus beginnt mit der rezeptorvermittelten spezifischen Adsorption des Virus an die Membran der Zielzelle (*Attachment*). Dabei bindet das virale Hüllprotein (Env) an den spezifischen zellulären Rezeptor, was im Fall von HIV-1 der CD4 Rezeptor ist. Für eine erfolgreiche Adsorption benötigt HIV-1 CCR5 bzw. CXCR4 als Co-Rezeptor.

Die Bindung an beide Strukturen führt dazu, dass das Nucleocapsid nach Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen wird (*Entry*). Im Cytoplasma folgt das *Uncoating*, bei dem das Viruscapsid teilweise abgebaut und die genetische Information des Virus freigesetzt wird. Mit der viralen RNA werden auch die viralen Enzyme ins Cytoplasma freigesetzt; es erfolgt unmittelbar darauf die Reverse Transkription, wonach das Virusgenom als doppelsträngige DNA vorliegt (s.1.1.4). Als Präintegrationskomplex (PIC) erfolgt dann der Transport in den Zellkern und dort mithilfe der Integrase die Integration als Provirus ins Genom der Wirtszelle. Ehe die Genexpression beginnt, kann das Provirus teilweise über lange Zeit latent bleiben. Bei der Transkription wird die provirale DNA in virale mRNA und virale genomische RNA umgeschrieben, woraufhin diese ins Cytoplasma transportiert werden, wo es zur Translation der viralen mRNA kommt. Die translatierten Gag-Proteine assemblieren sich zu Viruspartikeln und verpacken die ungespleißte, virale genomische RNA, welche zuvor im Cytoplasma angereichert wurde. Durch die Knospung (*Budding*) an der Zellmembran erhält das unreife Viruspartikel seine mit den viralen Glycoproteinen durchsetzte Hüllmembran. Nach der Freisetzung von der Zelle erfolgt die Reifung des Viruspartikels, wobei die Gag-Vorläuferproteine proteolytisch prozessiert werden (*Maturation*).

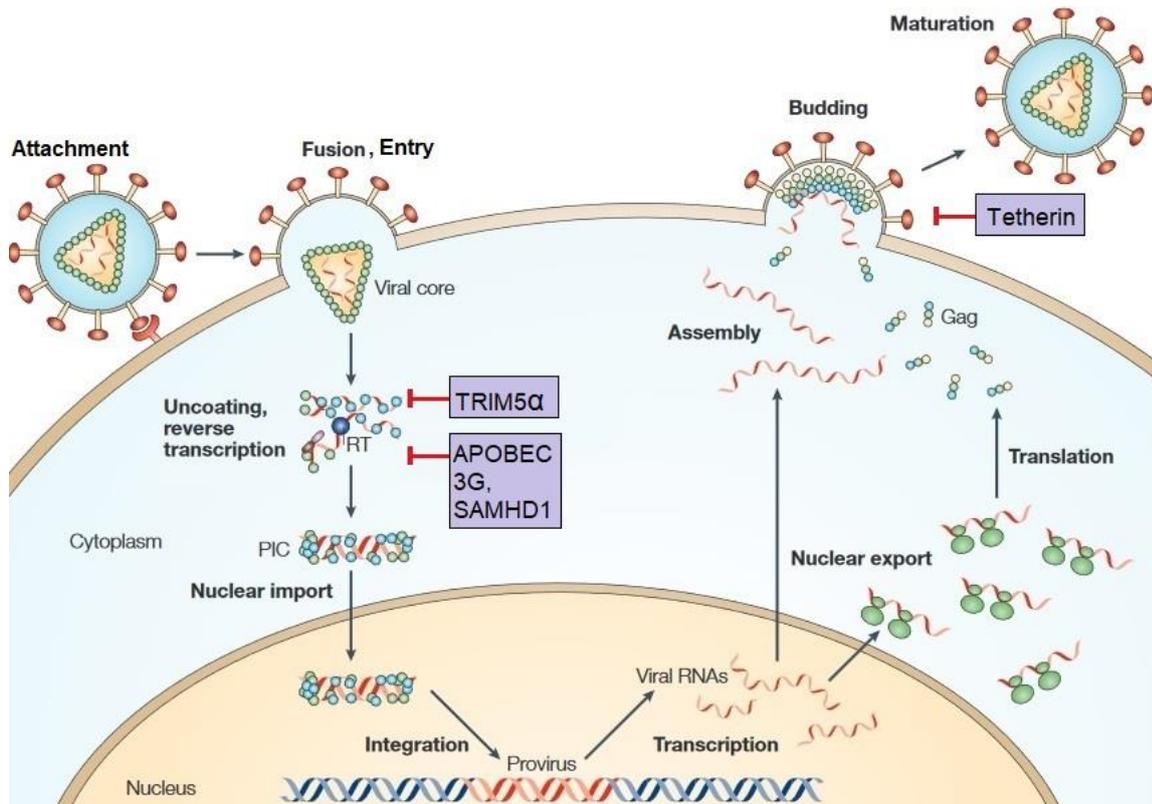


Abb. 4: vereinfachte schematische Darstellung des Replikationszyklus eines Retrovirus mit Wirkungsorten zellulärer Restriktionsfaktoren gegen HIV-1 (aus: Nisole et al. (2005); verändert)

Zur Verteidigung gegen retrovirale Infektionen entwickelten Wirtsorganismen im Laufe der Evolution verschiedene Strategien. Zelluläre Restriktionsfaktoren inhibieren verschiedene Schritte des viralen Replikationszyklus und sind wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort gegenüber Viren [6]. Zu den Restriktionsfaktoren, die bei HIV-1 Infektion zellulär exprimiert werden, gehören unter anderem TRIM5 α , Tetherin, SAMHD1 und APOBEC3G. Infiziert HIV-1 humane Zellen, so wirken die viralen akzessorischen Proteine den jeweiligen zellulären Restriktionsfaktoren entgegen und der Infektionsprozess kann erfolgreich weitergeführt werden. Die Replikation in nicht-humanen Zellen kann jedoch durch spezifische zelluläre Restriktionsfaktoren gestört werden. HIV-1 dringt beispielsweise effizient in die Zellen von Rhesusaffen ein, wird jedoch vor der Reversen Transkription durch den Restriktionsfaktor TRIM5 α inhibiert und kann so den Replikationszyklus nicht weiterführen [7]. Auf der anderen Seite ist es beispielsweise SIV nicht möglich, humane Zellen zu infizieren, da auch dort der zelluläre Restriktionsfaktor TRIM5 α exprimiert wird. TRIM5 α , im Jahr 2004 von Stremlau *et al.* erstmals in dieser Funktion identifiziert [8], ist verantwortlich für die Mehrheit der *post-entry* Restriktionsprozesse in mehreren Säugetierspezies.

1.1.4 Post-Entry Prozesse: von der Reversen Transkription bis zur Integration

Unmittelbar nach dem Entry des viralen RNA Genoms in die Zelle erfolgt die Reverse Transkription. In Abbildung 5 sind die einzelnen Schritte dieses Prozesses schematisch dargestellt.

Initiiert wird die Polymerasereaktion durch die Bindung einer zellulären tRNA (tRNA_{Lys3}), welche als Primer dient, an die PB-Region im 5' Bereich der Virus-RNA. Es folgt die Synthese eines zu den U5- und R-Sequenzen komplementären DNA-Stranges ausgehend von der tRNA

in 5'-3' Richtung. Durch die mit der Reversen Transkriptase assoziierte RNase H-Funktion wird der RNA-Anteil dieses kurzen Hybridteils abgebaut. Die gebildete cDNA, welche die U5- und R-Sequenz enthält, wird nun an das 3'-Ende des Genoms transferiert, wo es an die Repetitive Sequenz (R) bindet und dort als Primer für die weitere cDNA Synthese fungiert. Der RNA-Anteil des gebildeten RNA/DNA-Hybrids wird anschließend durch die RNase H abgebaut, bis auf den PP-Bereich. Es liegt nun ein kompletter cDNA-Einzelstrang komplementär zur Virus-RNA vor. Die Zweitstrang-Synthese beginnt mit der Elongation vom PP-Bereich, welcher als Primer dient, in 3'-Richtung und erstreckt sich bis zur PB-Region, wo noch immer die tRNA gebunden vorliegt. Diese wird im nächsten Schritt von der RNase H abgebaut. Übrig bleibt ein teilweise doppelsträngiges DNA-Molekül mit einer am 3'-Ende überhängenden Sequenz, welche komplementär zur PB-Region ist. Es folgt ein Transfer der synthetisierten cDNA-Sequenz zum 3'-Ende des durchgehenden DNA-Erststranges. Die PB-Region des Zweitstranges dient wiederum als Primer für die nachfolgende Synthese des DNA-Doppelstranges. Schließlich liegt das Virusgenom als doppelsträngige DNA vor, bei der die codierenden Sequenzen von den U3-, R- und U5-Einheiten der LTR-Region flankiert werden.

Das dsDNA-Molekül bleibt auch weiterhin mit den Proteinkomponenten verbunden und wird nun als Präintegrationskomplex (PIC) in den Zellkern transportiert. Durch Beteiligung des Matrixproteins und eines weiteren akzessorischen Proteins (Vpr) ist es den Lentiviren möglich, durch die Kernporen in den Nucleus zu gelangen und so ruhende Zellen zu infizieren. Ansonsten erfolgt die Integration des Virusgenoms aller anderen Retroviren und damit auch die Infektion nur in sich mitotisch teilenden Zellen. Im Zellkern wird die Integration des doppelsträngigen DNA-Moleküls mithilfe der Integrase vermittelt. Sie entfernt je zwei Nukleotide von den 3'-Enden der dsDNA; es entstehen 5'-Überhänge. Ebenfalls schneidet sie die zelluläre DNA an willkürlicher Stelle, wo auch überhängende 5'-Enden entstehen. Es folgt die kovalente Verbindung der DNA-Stränge miteinander. Nun liegt die virale Erbinformation als Provirus im zellulären Genom vor.

Ein kleiner Anteil der viralen DNA's wird nicht integriert und formt daher zirkuläre Produkte, welche für den viralen Lebenszyklus nicht mehr von Gebrauch sind (1-LTR- und 2-LTR-circles). Jedoch können diese Produkte nützlich für den Nachweis der verschiedenen Abschnitte der Reversen Transkription sein. *Scott L. Butler et al.* berichteten in einer Publikation von 2001, dass es mithilfe von real-time PCRs und spezifischen Primer-Sonden-Kombinationen möglich ist, einzelne Schritte des Prozesses der Reversen Transkription bei HIV-1 nachzuweisen und über PCR Produkte zu quantifizieren, sowie auch integrierte provirale DNA nachzuweisen [9]. Die Arbeitsgruppe um *Mbisa et al.* führte die einzelnen Schritte zu einem Gesamtprotokoll zusammen, welches in Abbildung 5 zu sehen ist [10].

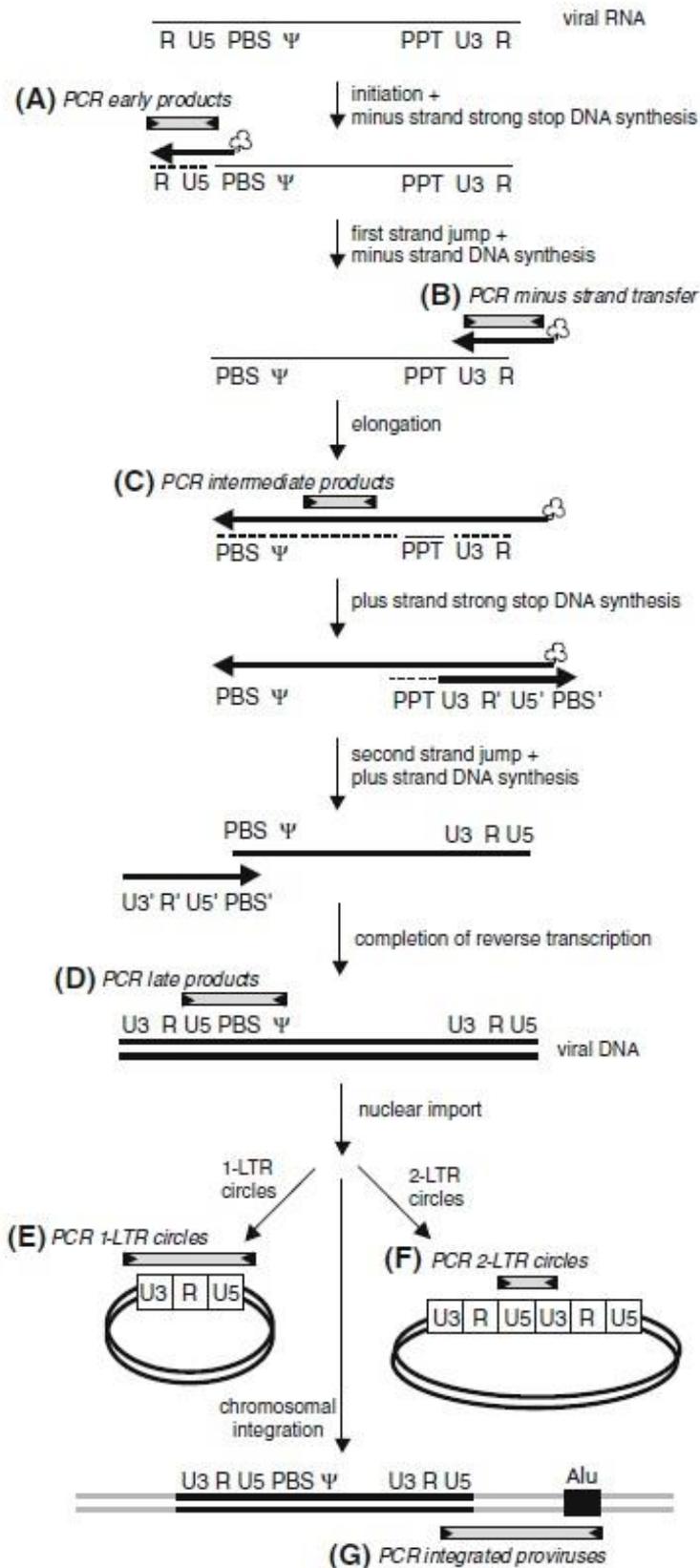


Abb. 5: schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Reversen Transkription am Beispiel von HIV-1. Die grauen Boxen zeigen PCR-Produkte, welche mittels spezifischer Primer-Sonden Kombinationen in der real-time PCR synthetisiert werden können, um early, intermediate und late RT-Produkte zu analysieren und quantifizieren, sowie integrierte und nicht-integrierte (LTR-circles) virale DNA nachzuweisen (Abschnitte A – G).[10]

1.2 Beta-Retroviren

Beta-Retroviren grenzen sich vor Allem durch ihre Genomorganisation von anderen Genera der Retroviren ab (s. Abb. 1). Auch der Assemblierungsprozess verhält sich bei den Beta-Retroviren anders als bei den meisten anderen Retroviren (mit Ausnahme der Delta- und Spumaviren), denn die Zusammensetzung der Capsid-Strukturen erfolgt schon im Cytoplasma und nicht erst beim Budding an der Zellmembran [2]. Alle Beta-Retroviren gebrauchen Varianten einer $tRNA_{Lys}$, welche an der Primerbindestelle (PBS) bindet und kodieren für eine dUTPase innerhalb ihres *pro*-Gens, welche als ein Nucleocapsid-dUTPase-Fusionsprotein fungiert. Morphologisch gesehen gehören zu den Beta-Retroviren Viren des Typs B und D, welche sich hinsichtlich ihrer akzessorischen Faktoren, der Virionmorphologie, der Strategien für den RNA-Kernexport sowie der Länge ihrer LTR-Regionen unterscheiden. Typ-B Beta-Retroviren enthalten sphärische Capside und besitzen LTR's mit einer Länge von ca. 1200 Nukleotiden, während Typ-D Beta-Retroviren zylindrische Capside haben und LTR Regionen von ca. 300 Nukleotiden Länge.

Beta-Retroviren infizieren ein breites Spektrum an Spezies, unter Anderem Primaten, Nager, Wiederkäuer und Beuteltiere. Charakteristische Vertreter der Beta-Retroviren sind das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV), das Jaagsiekt-Schaf-Retrovirus (JSRV) sowie das Mason-Pfizer-Affen-Virus (M-PMV). Auch die Humanen Endogenen Retroviren (HERV-K Familie) gehören zum Genus der Beta-Retroviren.

Abbildung 6 zeigt die typische Genomorganisation eines Beta-Retrovirus am Beispiel von MMTV.

Betaretrovirus: MMTV

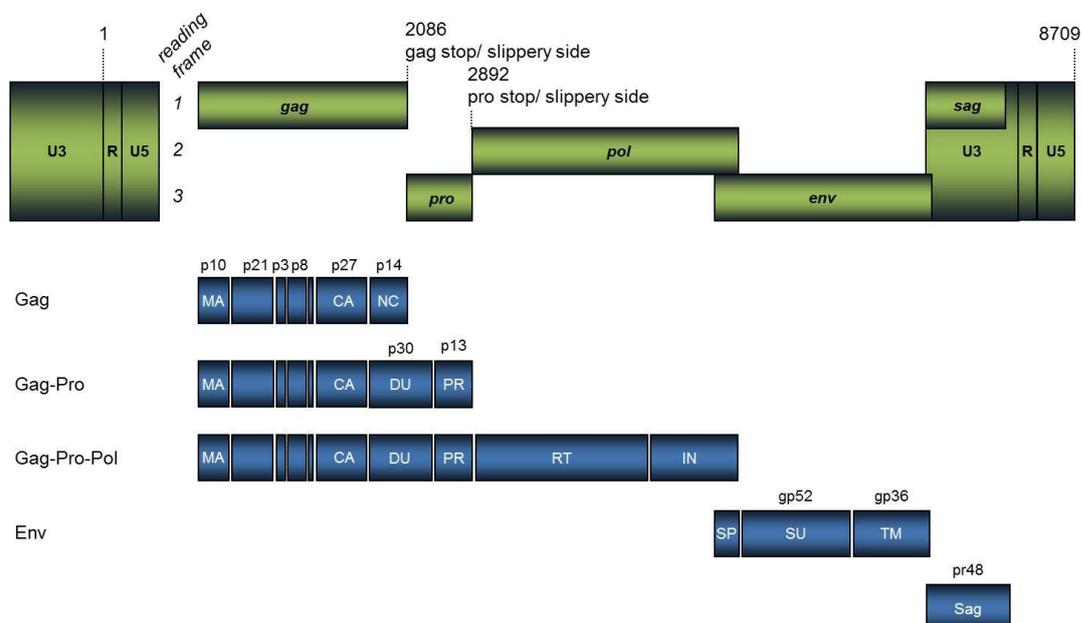


Abb. 6: genomische Organisation der β -Retroviren anhand des Beispiels MMTV. Drei offene Leseraster enthalten die Gene, welche für Gag, Pro, Pol und Env kodieren. Des Weiteren sind die Gag- und Gag-Vorläuferproteine dargestellt, sowie Env. (MA = Matrix, CA = Capsid, NC = Nucleocapsid, DU = dUTPase, PR = Protease, RT = Reverse Transkriptase, IN = Integrase, SP = Signalpeptid, SU = surface / Oberflächenglykoprotein, TM = transmembranes Glykoprotein, Sag = Superantigen)[2]

Der Genomaufbau ist typisch für den eines Retrovirus.

1.2.1 Das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)

MMTV ist bekannt als onkogenes Retrovirus und zählt aufgrund der Morphologie zu den Typ-B β -Retroviren. Es wurde erstmals 1936 von *J. J. Bittner* beschrieben [11] und ist für die Entstehung von malignen Milchdrüsentumoren bei Mäusen verantwortlich. Übertragen wird das Virus über die Milch. *In vivo* zeigt MMTV eine hohe Gewebsspezifität, was für Retroviren eher untypisch ist. Die Expression erfolgt dabei hauptsächlich in den Brustdrüsen, wo die Viren sich extensiv vermehren, vor Allem während der Laktation. Die Replikation des Virus während der Laktation gewährleistet eine effiziente Transmission des Virus von der Mutter zum Nachwuchs.

Im Organismus infiziert MMTV vorzugsweise Dendritische Zellen des gastrointestinalen Traktes sowie T und B Lymphozyten und wird schließlich auf die Brustdrüsen übertragen, wo es Brustepithelzellen infiziert [12]. Durch die Integration ins Genom der Zellen kommt es zur Aktivierung der Expression von Onkogenen, wodurch die Tumorbildung induziert wird. Unklar ist, wie MMTV sich nicht-teilende ausdifferenzierte Zellen (wie Dendritische Zellen) infiziert, was sonst nur den Lentiviren möglich ist.

MMTV kommt als exogenes infektiöses Viruspartikel vor und wird horizontal übertragen. Zusätzlich dazu wurden in vielen Genomen von Mäusen, die aus Inzucht stammten, permanent integrierte *Mtv* Proviren gefunden, welche Relikte einer MMTV Infektion sind und vertikal übertragen werden [13].

Als komplexes Retrovirus kodiert MMTV für weitere akzessorische Proteine. Das *Reg*-Protein (*regulator of export of mRNA*) sowie das *Naf*-Protein (*negative acting factor*) spielen eine Rolle im Export der MMTV mRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma [14]. Des Weiteren kodiert MMTV für einen Virulenzfaktor, dem Superantigen (*Sag*) [15].

1.2.2 Das Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus

JSRV ist ein weiterer bekannter Vertreter der β -Retroviren und gilt als Verursacher der Lungenadenomatose (*sheep/ ovine pulmonary adenomatosis, SPA/ OPA*) bei Schafen [16]. Es zählt morphologisch gesehen zu den Typ-D β -Retroviren und kommt als exogene sowie endogene Form vor. Das Hüllprotein des Virus ist ein Onkoprotein und allein ausreichend, Zelltransformation *in vitro* zu induzieren [17]. Dazu wurde von der Arbeitsgruppe um *M. Palmarini* aus einem an SPA-erkranktem Tier ein proviraler Klon von JSRV isoliert (JSRV₂₁), womit *in vivo* Infektionen durchgeführt wurden, welche zeigten, dass das Virus allein ausreichend ist, um Neoplasien zu induzieren [18].

1.2.3 HERV-K als endogenes Retrovirus

1.2.3.1 Humane endogene Retroviren

Durch groß angelegte Projekte zur Sequenzierung des humanen Genoms wurde bekannt, dass das menschliche Genom zu 8,3 % aus retroviralen Elementen besteht, d.h. aus Retroelementen, welche durch LTR-Regionen charakterisiert sind [19-21]. Sie sind das Ergebnis retroviraler Infektionen und Integration in die Keimzellbahn und wurden durch vertikale Übertragung an die Nachkommen weitergegeben. Integrierte retrovirale Elemente wurden durch Proliferationsarten wie Reinfektion, Retrotransposition und Komplementation *in trans* weitervermehrt und verbreiteten sich so im Laufe der Evolution im gesamten Genom [22].

Einige HERV Familien sind sowohl in Altwelt- als auch in Neuweltaffen zu finden, was bedeutet, dass eine erste Integration ins Genom schon vor etwa 35 Millionen Jahren erfolgte [23]. Es gibt sogar Hinweise darauf, dass die ältesten bekannten Humanen endogenen Retroviren 60 bis 70 Millionen Jahre alt sind [24]. Im Laufe der Zeit führten Rekombinationen und inaktivierende Mutationen wie Deletionen dazu, dass alle bisher bekannten humanen endogenen Retroviren defekt sind, also nicht mehr dazu fähig sind, infektiöse Partikel zu bilden. Exogene Formen sind demnach nicht bekannt. Bei anderen Säugerarten, wie Schafen und Mäusen, ist hingegen bekannt, dass sie sowohl exogene als auch endogene Formen desselben Retrovirus beherbergen.

Das Alter endogener Retroviren kann anhand von Stammbaumanalysen abgeschätzt werden. Eine genauere Abschätzung des Alters kann anhand von Sequenzvergleichen der LTRs vorgenommen werden. Zum Zeitpunkt der Integration des Virus in das humane Genom sind beide LTRs absolut identisch. Pro Jahr können jedoch Mutationen mit einer Rate von $2,3 \times 10^{-9}$ bis 5×10^{-9} im HERV Element auftreten, was bedeutet, dass es statistisch gesehen alle 200.000 bis 450.000 Jahre zu einem Basenaustausch im LTR kommen kann [25]. Je mehr sich also die LTRs voneinander unterscheiden, desto länger liegt der Zeitpunkt der Integration zurück. Der Integrationszeitpunkt der verschiedenen HERVs variiert dabei von 70 Millionen Jahren bis zu 200.000 Jahren.

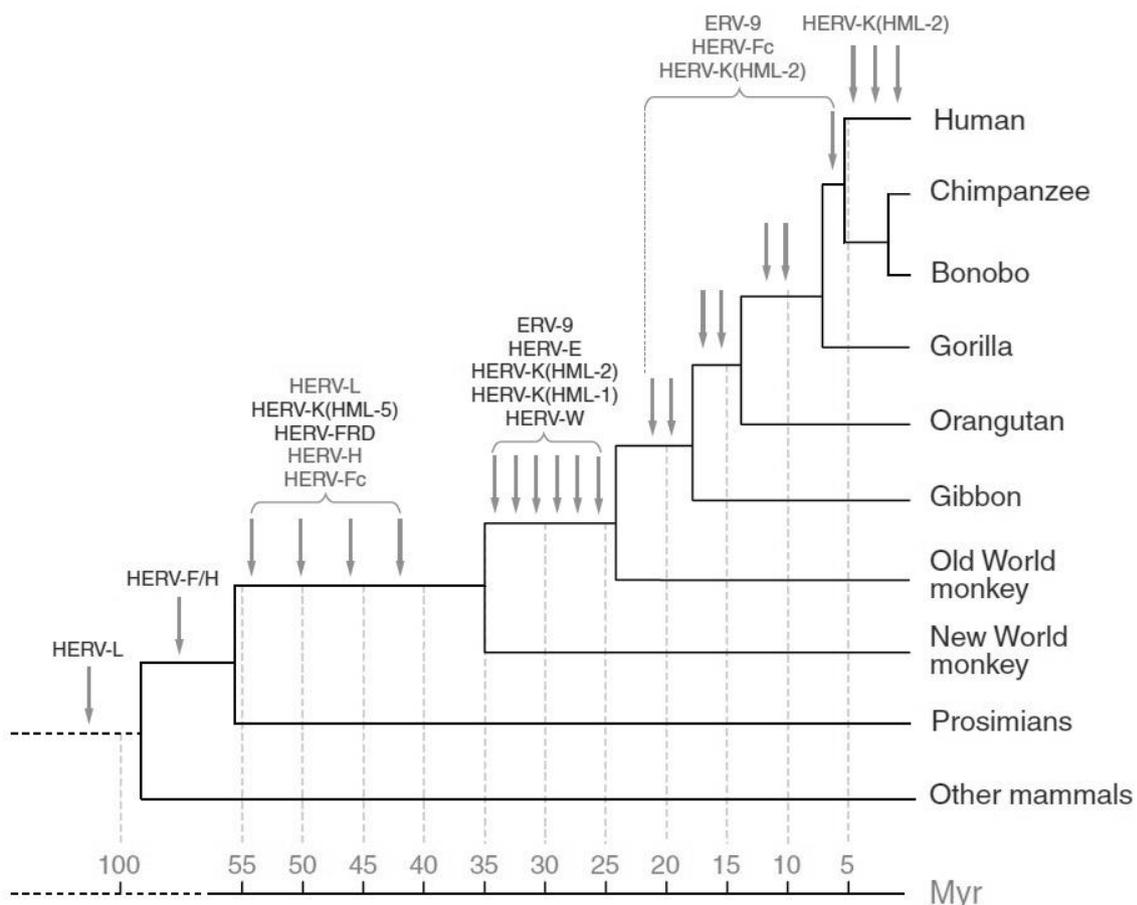


Abb. 7: phylogenetischer Stammbaum der Primaten mit den primären Integrationszeitpunkten ausgewählter HERV Familien. [23]

Anhand ihrer genomischen Ähnlichkeiten zu exogenen Retroviren werden endogene Retroviren in die drei Klassen I, II und III unterteilt. Dabei zeigen die Klasse I ERVs vor Allem

Ähnlichkeiten mit Gamma-Retroviren, Klasse II ERVs mit Beta-Retroviren und Klasse III ERVs zeigen Spumavirus-ähnliche Sequenzen.

Die Namensgebung der Humanen Endogenen Retroviren erfolgte nicht einheitlich, in den meisten Fällen jedoch anhand ihrer spezifischen, zellulären tRNA, welche als Primer für die RT dient. Hierbei wird der Name nach dem Einbuchstabencode der Aminosäuren vergeben. Bei der HERV-K Familie hybridisiert die Primerbindestelle (PBS) eine Lysin-tragende tRNA (Lysin = K), was der Familie ihren Namen gab. Da die Phylogenie dieser Nomenklatur jedoch nicht bedingungslos folgt und auch die PBS Mutationen erfährt, wurden HERVs häufig auch nach anderen Kriterien benannt, wie z.B. nach einem naheliegenden Gen (HERV.ADP), einer Kosmid- oder Klonnummer (HERV-HS49C23) oder Aminosäuremotiven (HERV-FRD).

HERV-K wird aufgrund genomischer Analogie zu den β -Retroviren gezählt bzw. gehört phylogenetisch zur Klasse II der endogenen Retroviren. Die HERV-K Familie umfasst, neben HERV-K(C4) und HERV-K(14C), Mitglieder, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu MMTV als *human MMTV-like* bezeichnet werden (HML-1 bis 10). Auch die Entdeckung der HERV-K Sequenz im menschlichen Genom durch Callahan *et al.* (1982) [26] wird auf die Ähnlichkeit mit MMTV zurückgeführt. Die erstmalige Sequenzierung eines Volllängen-HERV-K Provirus (HERV-K10) erfolgte durch Ono *et al.* (1986) [27], wobei ein sehr gut erhaltenes retrovirales Genom zum Vorschein kam.

1.2.3.2 HERV-K(HML-2) und HERV-K113

HERV-K10 gehört zur Familie der HERV-K(HML-2), welche die jüngsten und am besten erhaltenen, humanspezifischen endogenen Retroviren enthält und von allen HERV-K Sequenzen am besten charakterisiert wurde [28]. HML-2 Elemente integrierten erstmals von 35 Millionen Jahren in das Genom früher Primaten. Die jüngsten Integrationsereignisse fanden nach der Trennung der humanen von der Schimpansen-Linie vor etwa 6 Millionen Jahren statt (s. Abb. 7), wonach über 3000 HERV-K(HML-2) Integrationen ins humane Genom festgestellt werden konnten. Davon liegen etwa 100 hochkonservierte Volllängen- oder nahezu Volllängen-Proviren vor [29].

HERV-K(HML-2) Elemente werden aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in der Sequenz sowie anhand von Merkmalen kodierender Regionen und LTRs in zwei Gruppen aufgeteilt [30]. Typ-I Proviren weisen eine 292-bp lange Deletion in der *pol-env* Schnittstelle auf, wodurch weder Env noch das Rec-Protein gebildet werden können, da auch die für das Rec-Protein benötigte Spleiß-Stelle deletiert ist. Eine alternative Spleiß-Stelle führt jedoch zur Bildung des Np9-Proteins, welches funktionell dem Rec-Protein ähnelt und vornehmlich in Assoziation mit Tumorzellen auftritt [23, 31]. Typ-II Proviren dahingegen besitzen eine vollständige *pol-env* Region, sodass sowohl Env als auch Rec exprimiert werden können. Insgesamt sind etwa 26 % der humanspezifischen HERV-K(HML-2) klassifiziert als Typ-I Proviren, während ca. 74 % als Typ-II Proviren auftraten [29].

Trotz der wenigen Mutationen gegenüber anderen HERV Elementen sind die integrierten HERV-K(HML-2) Elemente defekt und replikationsinkompetent; bis heute konnte kein replikationskompetentes HERV-K gefunden werden. Die bisher erschlossenen Informationen deuten darauf hin, dass seit der Abspaltung der menschlichen Linie von den Schimpansen nur die HERV-K(HML-2) Familie signifikant aktiv war, jedoch ist unklar, ob heute noch neue Integrationen aufgrund fortlaufender Aktivität zu finden sind.

Dennoch besitzen viele der HERV-K(HML-2) Proviren komplette, kodierungsfähige ORFs. HERVs werden, trotz epigenetischer Kontrollmechanismen, konstitutiv in geringem Maße in jedem humanen Gewebe exprimiert. [32] Weiterhin wurden HML-2 Transkripte und Proteine

in embryonischen Zellen und in malignen Geweben gefunden [33-35]. Die Expression von HERV Proteinen in gesunden Geweben deutet darauf hin, dass die dafür kodierenden Gene im Laufe der Zeit konserviert wurden, da ein potenzieller physiologischer Nutzen für die humanen Zellen besteht. Dies wurde für Proteine anderer HERVs schon nachgewiesen: Syncytin-1 und -2, welche zu den Env Proteinen von HERV-W und HERV-FRD gehören, spielen eine wichtige Rolle in der Plazentaentwicklung bei Säugern [36, 37].

HERV-K steht ebenfalls im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen. Eine erhöhte HERV Transkriptionsrate und Proteinexpression konnte in Patienten, welche an Autoimmunkrankheiten, verschiedenen Krebsformen oder neurologischen Erkrankungen litten, festgestellt werden. [32, 35, 38-41] So wurde vor allem in Melanomen und Teratokarzinomen eine erhöhte HERV-K(HML-2) Expression festgestellt [35, 42, 43]. Insbesondere die akzessorischen Proteine Rec und Np9 stehen in Verdacht, einen Einfluss auf die Onkogenese zu haben [44, 45].

HERV-K(HML-2) ist dazu fähig, nicht-infektiöse virusähnliche Partikel (VLPs) zu bilden, welche in verschiedenen Zellen detektiert werden konnten; vor Allem in Teratokarzinomen und Melanomen. Obwohl diese VLPs als nicht-infektiös gelten, konnten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen demonstrieren, dass aus rekonstituierten Sequenzen generierte Proviren infektiöse Partikel produzieren können [46, 47]. Dazu rekonstituierten sie anhand einer Konsensus-Sequenz von HERV-K(HML-2) einen proviralen Klon („*HERV-K_{con}*“, „*Phoenix*“), welcher dem potentiell exogenen Vorläufer von HERV-K(HML-2) ähneln sollte. Die dadurch produzierten virusähnlichen Partikel besitzen „single-round“ Infektiösität und sind in der Lage, Zellen zu infizieren und zu integrieren, weiterhin aber nicht replikationskompetent, d.h. es konnten keine Viruspartikel aus der integrierten proviralen DNA gebildet werden.

Das bisher einzige bekannte Mitglied der HERV-K(HML-2) Familie, welches für alle viralen Proteine vollständige offene Leserahmen besitzt, ist das HERV-K113 Provirus, das zu den Typ-II Proviren zählt. Es wurde 2001 von Turner *et al.* erstmals in einer humanen BAC-Bibliothek mithilfe einer Hybridisierungssonde des HERV-K *pol*-Gens identifiziert [48]. Das Provirus integriert auf dem Chromosom 19p13.11, tritt jedoch mit einem allelen Polymorphismus auf, was bedeutet, dass nicht alle Menschen HERV-K113 in ihrem Genom tragen [49]. Mit bis zu 30% kann man eine besonders hohe Verbreitung dieses Provirus in der afrikanischen Bevölkerung finden, wohingegen die Prävalenz in anderen Bevölkerungsgruppen geringer liegt. Dies lässt vermuten, dass der Ursprung des Virus auf dem afrikanischen Kontinent liegt. Durch Sequenzvergleiche der beiden LTRs wird der Integrationszeitpunkt von HERV-K113 auf circa zwei Millionen Jahre geschätzt; es ist damit eines der jüngsten Proviren der HERV-K Gruppe. Aufgrund des guten Zustandes ist nicht auszuschließen, dass innerhalb der Weltbevölkerung noch replikationskompetente Proviren existieren.

1.2.3.3 Genomische Organisation von HERV-K(HML-2) und Genexpression

Die provirale Organisation sowie die detektierbaren Transkripte von HERV-K113 sind in Abbildung 8 gezeigt. Das Provirus besitzt vier offene Leserahmen (ORFs), welche sich überlappen und ist flankiert durch die 5' und 3'LTR.

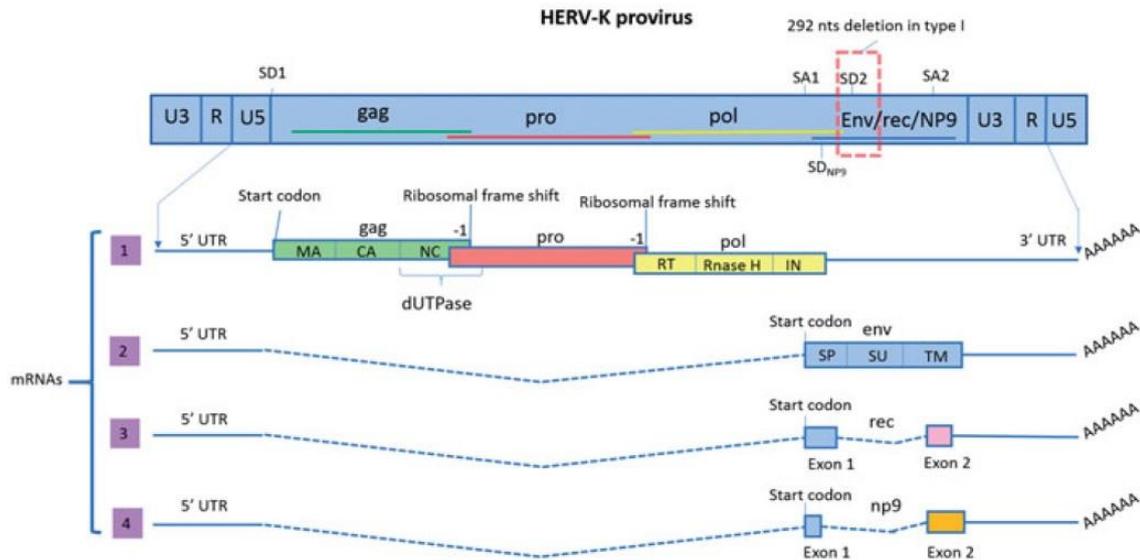


Abb. 8: genomische Organisation eines HERV-K(HML-2) Provirus und dessen Transkripte. Die proviralen Sequenzen aller vier Leserahmen überlappen sich. Die LTRs bestehen aus der U3 und U5 Region, welche durch die R Region separiert sind. Transkript 1 kodiert in drei sich überlappenden offenen Leserahmen für die Proteine Gag, Pro und Pol. Transkript 2 kodiert für das Env Protein. Transkript 3 ist das Produkt alternativen Splicings des Env ORFs und kodiert für das akzessorische Protein Rec. Das 4. Transkript wird nur bei Typ I Proviren produziert und kodiert für das alternative akzessorische Protein Np9. [50]

Als Produkte der Transkription wurden vier mRNAs beschrieben [51]. Das erste Transkript besitzt dabei drei sich überlappende ORFs und kodiert für die Proteine Gag, Protease (Pro) und Polymerase (Pol). In diesem Transkript kann nur *gag* ein Startkodon vorweisen, während die Translation von *pro* und *pol* über ribosomale Leserahmenverschiebungen (-1) vermittelt wird. Gag, Pro und Pol werden als Polyproteine translatiert (Gag, Gag-Pro, Gag-Pro-Pol), welche dann durch Proteolyse in ihre funktionellen Proteine gespalten werden.

Um die Gag-Pro-Pol (160 kDa), Gag-Pro (102 kDa) und Gag (74 kDa) Vorläuferproteine zu translatieren, sind ribosomale Leserahmenverschiebungen um -1 nötig [52, 53]. Ribosomale Leserahmenverschiebungen erlauben eine alternative Translation einer mRNA Sequenz durch Veränderung des offenen Leserahmens. Bei Viren ist diese Art der Kontrolle der Genexpression häufig zu finden; sie ermöglicht dem Virus auf der selben mRNA mehrere Proteine zu kodieren, weshalb das virale Genom nicht sehr groß sein muss. Funktionelle Einheiten, welche für eine ribosomale Leserahmenverschiebung vonnöten sind, sind die sogenannte *Slippery Sequenz* und die Pseudoknoten RNA Struktur. Als Slippery Sequenzen werden Heptanukleotidfolgen bezeichnet, welche typischerweise durch das Motiv XXXYYYZ (wie UUUAAAC) in der Sequenz erkennbar sind [54]. Sechs bis neun Nukleotide hinter der Slippery Sequenz befinden sich die Pseudoknoten. Diese sekundäre RNA-Struktur erhöht die Effizienz der Leserasterverschiebung, indem sie das translatierende Ribosom stoppt. Unter anderem führt dies zu einer veränderten Erkennung der Kodongrenzen durch das Ribosom. Das Ribosom, welches die Aminosäure-tragenden tRNA gebunden hat, gleitet ein Nukleotid *upstream* und fährt mit der Translation der Protease- bzw. Polymerase-Proteine fort [55-57]. Nach Synthese der Vorläuferproteine werden diese von der Protease in die funktionellen Proteine gespalten.

Die ribosomalen Leserahmenverschiebungen dienen dazu, die jeweiligen Proteine und Vorläuferproteine in einem ausgewogenen Verhältnis bereitzustellen. Da die Translation in den

meisten Fällen am Gag-Stoppkodon von den Ribosomen beendet wird, liegen Gag-Proteine in großer Überzahl in der Zelle vor. Nur in wenigen Fällen kommt es zur Leserasterverschiebung und damit zur Translation von Gag-Pro bzw. Gag-Pro-Pol Vorläuferproteinen. Das Verhältnis der Proteine ist für eine effiziente Replikation des Virus von großer Bedeutung. Bei MMTV, einem nahen Verwandten von HERV-K, kommt es in 23% der Fälle zur ersten Leserasterverschiebung und Translation des Gag-Pro Vorläuferproteins [53]. Infolgedessen ist die Menge an synthetisierter Protease über vier Mal kleiner als die von Gag.

2. Zielsetzung

Als Mitglied der HERV-K(HML-2) Familie gehört HERV-K113 zu den retroviralen Proviren im menschlichen Genom, welches vollständig erhalten ist und potentiell dazu fähig ist, Viruspartikel zu bilden. Vermutungen legen jedoch nahe, dass das Virus während des *post-entry/ pre-integration* Prozesses von co-evolutiv entwickelten zellulären Restriktionsfaktoren inhibiert wird, was auch ein Grund für das Verschwinden der exogenen Viren sein kann.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Etablierung geeigneter Methoden zur genaueren Charakterisierung der bereits bekannten *post-entry* Inhibition von HERV-K(HML-2). Weitergehend soll auch im Rahmen dieser Arbeit die Methodik zur Untersuchung der *post-entry/ pre-integration* Prozesse verwandter Betaretroviren, MMTV und JSRV, entwickelt werden.

Zu diesem Zweck sollen zunächst einmal für die nachfolgenden Infektionsversuche geeignete Reporterviren produziert und charakterisiert werden. Es sollen zwei verschiedene, HERV-K(HML-2)-basierte, rekonstituierte Reportervirussysteme in unterschiedlichen Kombinationen zur Produktion von „virus-like particles“ (VLPs) eingesetzt werden und die produzierten VLPs hinsichtlich ihrer viralen RNA Kopien, dem p27 Capsid-Proteingehalt und der RT-Aktivität charakterisiert und verglichen werden. Die Kombination von viralem Genom (backbone) und viralen Strukturproteinen (packaging) in einem optimierten Verhältnis zueinander soll für weitergehende Experimente verwendet werden.

Weiterhin sollen für eine Optimierung der ausgewählten Reporterviren sogenannte *Slippery Site Mutanten* generiert werden. Anhand einer modifizierten Sequenz im Verpackungsplasmid für das Gag-Pro-Pol Vorläuferprotein sollen bei der Produktion der VLPs auch ohne eine oder mehrere Leserasterverschiebungen, wie sie im viralen Genom notwendig sind, die Protease- und Polymerase Proteine translatiert werden. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis der Vorläuferproteine Gag, Gag/Pro und Gag/Pro/Pol und somit auch das Verhältnis der funktionellen Proteine, was einen Effekt auf den Partikelzusammenbau, die Morphologie und die Reverse Transkriptase-Aktivität in der Rezipientenzelle haben kann. Auch diese generierten Reporterviren sollen speziell hinsichtlich ihrer RT-Aktivität, aber auch des p27 Gehaltes sowie der Anzahl der viralen RNA, charakterisiert werden.

Zusätzlich zu den HERV-K Reporterviren soll die Methodik auch mit den verwandten Betaretroviren MMTV und JSRV etabliert werden. Dazu sollen diese VLPs ebenso in 293T Zellen produziert werden und hinsichtlich RT Aktivität und vRNA charakterisiert werden. Es ist notwendig, die bereits für HERV-K(HML-2) bestehenden qPCR Systeme zur Untersuchung der *post-entry* Prozesse für MMTV und JSRV zu etablieren und geeignete Standards herzustellen. Weiterführend soll erstmalig die droplet digital PCR für die Messung bestimmter RT-Produkte etabliert werden.

Nach Charakterisierung und Produktion geeigneter Reporterviren sollen CRFK Zellen, welche aufgrund ihrer Permissivität gegenüber HERV-K(HML-2) als Rezipienten-Zellen dienen, mit den Viren infiziert werden. Im Anschluss an die Infektion soll die DNA der infizierten Zellen, die in regelmäßigen Abständen nach Infektionsbeginn geerntet werden, hinsichtlich der verschiedenen RT Produkte untersucht werden. Dies soll mithilfe spezieller Primer-Sonden Kombinationen in der *TaqMan* real-time PCR geschehen.

Anhand der Nachweisbarkeit der unterschiedlichen RT-Produkte kann analysiert werden, wie weit der Infektionsprozess bei den verschiedenen Viren voranschreitet und an welcher Stelle der Prozess gestoppt wird bzw. nicht mehr weiterverfolgt werden kann. Somit sollen die Grundlagen geschaffen werden, um eine vergleichende Untersuchung der post-entry/pre-integration Prozesse der verschiedenen Betaretroviren zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Biologisches Material – Zellen, Bakterienstämme, Antikörper, Enzyme

<i>Material</i>	<i>Hersteller/ Bezugsquelle</i>
CRFK Zellen	ATCC
goat α -rabbit IgG-peroxidase Konjugat	Sigma
HEK 293T Zellen	ATCC
Herma 7 Antikörper (Maus α -HERV Gag)	Dr. Klaus Boller, PEI
IRDye 680 LT Goat Anti-Rabbit IgG	LI-COR
IRDye 800 CW Goat Anti-Rat IgG Antikörper	LI-COR
OneShot® Stbl 3 chemically competent <i>E.coli</i>	Invitrogen
OneShot® TOP10 chemically competent cells	Invitrogen
Rabbit α –GAPDH Antikörper	Sigma
Rat α -p27 Serum Antikörper	Dr. Oliver Hohn, FG 18, RKI [58]
Restriktionsendonukleasen	NEB/ Thermo Fisher Scientific
VD K140 p5B Antikörper (α -oriHERV p27-CA Kaninchenserum)	Dr. Oliver Hohn, FG 18, RKI

3.1.2 PCR-Komponenten, cDNA Synthese

<i>Komponente</i>	<i>Hersteller</i>
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	Thermo Fisher Scientific
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	Thermo Fisher Scientific
Brilliant II QPCR Master Mix, 2x	Agilent Technologies
DNase Inactivation Reagent	Invitrogen
dNTP Mix (10 mM)	Invitrogen
DTT (0,1 M)	Invitrogen
First-Strand Buffer (cDNA Synthese), 5x	Invitrogen
Maxima Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	Thermo Scientific
Maxima Hot Start <i>Taq</i> Puffer, 10x	Thermo Scientific
MgCl ₂	Thermo Scientific
MS2 RNA Template	Sigma

Random hexamers	Invitrogen
RNase OUT (40 U/μl)	Invitrogen
SuperScript III Reverse Transkriptase (200U/μl)	Invitrogen
TURBO DNase	Invitrogen
TURBO DNase Puffer, 10x	Invitrogen
VeriQuest SYBR Green qPCR Master Mix, 2x	Thermo Fisher Scientific

3.1.3 Oligonukleotide (Primer) und Sonden

Die Oligonukleotide wurden durch die Firmen Invitrogen oder IDT (Integrated DNA Technologies) synthetisiert. Vor Gebrauch wurden die lyophilisierten Primer/ Sonden mit Aqua bidest auf eine Endkonzentration von 100 μM verdünnt.

<i>Primername</i>	<i>Sequenz (5'-3' Richtung)</i>
HERV pFor Primer	CCA ACG TGG AGG CTT TTC TCT AG
HERV Probe (FAM)	6FAM-AGG TAC GCT CGA GCG TGG TCA TTG AGG-BBQ
HERV pVL-Rev1 Primer	ATC ACC CTA GCT TCT TCC GA
Horie2010_PERT-F	TCC TGC TCA ACT TCC TGT CGA G
Horie2010_PERT-R	CAC AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG
JSRV_A Rev	GCA CAA GCA AGA GTC GCA C
JSRV_AF For	GCA GAG TAT CAG CCA TTT TG
JSRV_AF Probe (FAM)	FAM-TCT TAG CGA GGA CGC TCC GTT CT-BHQ1
JSRV_D Probe (FAM)	FAM-CCC ACG TTG GGC GCC ACC TG-BHQ1
JSRV_DE Rev	TGA GAG TAG TGG CGA AGA AA
JSRV_DG For	TGC GAC TCT TGC TTG TGC T
JSRV_E For	TAA AGA GAG GGG AGA TGC GG
JSRV_F Rev	AGC TCC CAG GAC TTA ACC CT
MMTV_A Rev	GGG ACC CTC TGG AAA GTG AA
MMTV_AF For	GCA ACA GTC CTA ACA TTC ACC
MMTV_AF Probe (FAM)	FAM-TCC CGT CTC CGC TCG TCA CTT A-BHQ1
MMTV_E For	AAG AGC CTT GAC CAA GTG CA
MMTV_E Rev	CTT ATC CGA GGG TCC CTG TTC
MMTV_F Rev	GTC GTC CTT GGT GGG AAA CA

MS2 PERT-Horie Probe (FAM)	FAM-TCT TTA GCG AGA CGC TAC CAT GGC TA-BHQ1
Mutslip_gag-prt_f Primer	GGG CAA CCA TTG TCC GGA AAC CGA GCA AAG GGG CCA GCC TCA GG
Mutslip_gag-prt_r Primer	CCT GAG GCT GGC CCC TTT GCT CGG TTT CCG GAC AAT GGT TGC CC
Mutslip_prt-pol_f Primer	GCC CGT GGA GGC TAA AAT AAA TTC AAA AAA GAG AAG GAA TAG GG
Mutslip_prt-pol_r Primer	CCC TAT TCC TTC TCT TTT TTG AAT TTA TTT TAG CCT CCA CGG GC
Orico F2 Sequenzierprimer	CCC GTG AAC ATC GAC GCC
Orico F4 Sequenzierprimer	CCA GGT GTC CGA GAA CCG
qMMTV-L1 / MMTV_DG For	CTC CGC TCG TCA CTT ATC CT
qMMTV-Probe (FAM)	FAM-TCCCTGTTCGGGCGCCAGCT-BHQ1
qMMTV-R1 / MMTV_DE Rev	CCGCTCTTGTGATGATAGCC

3.1.4 Konstrukte

Name	Bezugsquelle/ Publikation
CMV oriEGFP	Kramer <i>et al.</i> [59]
HERV K _{CON} -GFP (CHKCG)	Lee <i>et al.</i> [47]
JSRV coEnv	Kramer <i>et al.</i> [59]
JSRV pCMV2JS ₂₁	Palmarini <i>et al.</i> [18]
K _{CON} -GPP (pCRVI/Gag Pro Pol)	Lee <i>et al.</i> [47]
oricoGPP	Kramer <i>et al.</i> [59]
oricoRec	Hanke <i>et al.</i> [60]
oricoSlippery_gag-pro	In dieser Arbeit konstruiert
oricoSlippery_gag-pro-pol	In dieser Arbeit konstruiert
oricoSlippery_pro-pol	In dieser Arbeit konstruiert
pBSK-oriHERV K113	Chudak <i>et al.</i> [61]
pCMgpRRE17 (MMTV packaging construct)	Konstantoulas and Indik [62]
pCMV-VSV-G	Stewart <i>et al.</i> [63]
pLP2 (Rev-encoding Plasmid)	Invitrogen
pRRpCeGFPWPRED25 (MMTV transfer vector)	Konstantoulas and Indik [62]
psPAX2	Didier Trono Labs
pWPXL-GFP	Didier Trono Labs

3.1.5 Puffer und Medien

<i>Puffer/ Medium</i>	<i>Hersteller/ Zusammensetzung</i>
10x Laufpuffer (SDS-PAGE)	30,3 g/l Tris, 144,1 g/l Glycin, 10 g/l Natriumlaurylsulfat (SDS), ad. 1l Aqua bidest. (pH 8,3)
10x Tris Glycin Puffer	30,3 g/l Tris, 144,1 g/l Glycin, Ad. 1l Aqua bidest.
1x TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
6x DNA Loading Dye	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva), 0,4 % (w/v) Orange G (Sigma) in H ₂ O
Buffer G, Fast Digest Buffer Green	Thermo Fisher Scientific
Carbonat/ Bicarbonat Puffer	Sigma
DMEM	PAA Laboratories GmbH
FBS	Biochrom AG
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad
LB-Agar	LB-Medium mit 20g/l Agar
LB-Medium	Sigma
L-Glutamin	Invitrogen
NEB 10x Puffer 3.1, 1.1, CutSmart	NEB
NP40 Lysis Puffer	Thermo Fisher Scientific
PBS	0,01 M NaH ₂ PO ₄ , 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl in aqua dest., mit HCl auf pH 7,2 einstellen
PBS-T	0,001% Tween 20 in 1x PBS
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
PERT Lysis Puffer, 2x	0,25% Triton X-100, 50 mM KCl, 100 mM TrisHCl pH 7,4, 40% Glycerol
Phosphat-Citrat Puffer	Sigma
S.O.C.-Medium	Thermo Fisher Scientific
Transfer Puffer (Western Blot)	100 ml 10x Tris-Glycin Puffer, 200 ml Methanol, Ad. 1l Aqua bidest.
Tris-HCl 0,5 M	Sigma
Tris-HCl 1,5 M	Sigma
Trypsin/ EDTA	Biochrom AG

3.1.6 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckman Coulter GmbH
DMSO	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Milchpulver	Roth
OPD (5mg)	Sigma
pageRuler Prestained Protein Ladder, 10 – 180 kDa	Thermo Fisher Scientific
PEI (2,5 µg/µl)	Polysciences, Inc.
Polybrene	Sigma
Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid)	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) (5%)	Merck
SDS	Sigma
TEMED	Sigma
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30%)	Merck
B-Mercaptoethanol	Sigma

3.1.7 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
HS-Mg RT Activity Kit	Cavidi
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN

QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen
TURBO DNA-free Kit	Ambion

3.1.8 Laborgeräte, Apparaturen und Hilfsmittel

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Avanti J-20 XP Zentrifuge	Beckmann Coulter
C24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System C1000	Bio-Rad
CO2-Inkubator C 200 für eukaryotische Zellen	Labotect
Coulter Particle Count & Size Analyzer Z2	Coulter Electronics Inc.
DNA Engine® Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Eppendorf research plus (Pipetten)	Eppendorf
FACSCalibur E3476	Becton Dickinson
Gießstand für SDS-Gele	Bio-Rad
Heizblock	Grant Instruments
Heizschrank (klein)	Heraeus
Lichtmikroskop	ZEISS
Multichannel Pipetten	Thermo Scientific
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Molecular Dynamics/ Amersham Bioscience, Nanodrop (jetzt Thermo Fisher)
Nikon Eclipse TS100 Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Nunc Flow AURA PCR (Sterilbank)	Nunc GmbH & Co. KG
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences
Pipetman (Pipetten)	Gilson Inc.
Power Pac 200 (Elektrophorese Stromversorgung)	Bio-Rad
QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR) System	Bio-Rad

Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro
Stratagene Mx 3000P qPCR System	Agilent Technologies
Tabletop Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Tecan Sunrise ELISA reader	Tecan
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Transilluminator GelDoc	PHASE GmbH
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
96-Well Pro Bind Platten (für ELISA)	Thermo Scientific
Microseal ‚B‘ seal	Bio-Rad
Multiplate PCR Plates, 96-well, low-profile	Bio-Rad
PCR SingleCap 8er-SoftStrips (0,2 ml für PCR)	Biozym Scientific
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP
Zellkulturflaschen, 6-Well Platten	TPP
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Sarstedt

3.1.10 Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller/ Entwickler</i>
CFX Maestro	Bio-Rad
EasyReader (ELISA Software)	Entwickelt von Dr. S. Norley, RKI
FireCam Control	PHASE GmbH
FlowJo	FlowJo, LLC
Geneious R11	Biomatters Ltd.
Image Studio	LI-COR Biosciences
MxPro ET Software	Agilent Technologies
NanoDrop® ND-1000	Molecular Dynamics/ Amer-sham Bioscience, Nanodrop
QuantaSoft	Bio-Rad

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wird verwendet, um bestimmte DNA-Sequenzen exponentiell zu amplifizieren. Das Verfahren beruht auf der enzymatischen Aktivität der Polymerase, mithilfe derer einzelne Nukleotide zu einer langen Kette als Kopie der Template-Sequenz polymerisiert werden. Das Hinzufügen einer sequenz-spezifischen Sonde, welche von der Polymerase im Rahmen der Amplifikation gespalten wird, ermöglicht bei der quantitativen real-time PCR zeitgleich mit der Amplifikation die Menge der Produkte durch proportionale Fluoreszenz zu messen.

Konventionelle PCR

Für die Amplifikation ohne Einsatz der fluoreszenz-markierten Sonde wurde folgender Ansatz verwendet:

Tab. 1: Zusammensetzung der Komponenten für einen PCR-Mastermix

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion (µl)	Endkonzentration
10x <i>Maxima Hot Start Taq</i> Buffer	2,5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2	2 mM
dNTPs (10 mM each)	0,5	0,2 mM each
Forward Primer (10 µM)	0,5	200 nM
Reverse Primer (10 µM)	0,5	200 nM
<i>Maxima Hot Start Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl)	0,2	1 U
H ₂ O (nuclease-frei)	Ad. 25 µl	-

Die Menge des zugegebenen Templates richtet sich nach dessen Art: bei Plasmid-DNA können bis zu 1 ng und bei gDNA bis zu 500 ng pro Reaktion eingesetzt werden.

Die anschließende PCR Reaktion besteht aus drei Phasen: Denaturierung, Annealing und Elongation; dementsprechend wurden folgende Bedingungen für das Thermocycler-Programm gewählt:

Tab. 2: Thermocycler-Programm für die konventionelle PCR

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	
Aktivierung der DNA Polymerase	95	10	} 45 x
Denaturierung	95	0:30	
Primer-Annealing	54	1	
Elongation	72	0:30	

Die optimale Annealing Temperatur variiert von Primer zu Primer, wobei die genutzten Primer im Schnitt bei 54°C ein gutes Annealing zeigten. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Templates; der Richtwert dafür ist 1 Minute pro kb.

Zur Auswertung der PCR wurden die Produkte über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Bei der Amplifikation mit Einsatz der fluoreszenz-markierten Hydrolyse-Sonde (real-time PCR) wurde folgender Ansatz für den Mastermix verwendet:

Tab. 3: Komponenten des TaqMan real-time PCR Mastermixes

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion (µl)	Endkonzentration
2x Brilliant II QPCR Master Mix	12,5	1x
Reference Dye (2 µM) ROX	0,375	30 nM
Forward Primer (10 µM)	0,75	300 nM
Reverse Primer (10 µM)	0,75	300 nM
TaqMan Sonde (10 µM) FAM	0,5	200 nM
H ₂ O (nuclease-frei)	Ad. 25 µl	-

Eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Verwendung des DNA-Farbstoffes SYBR Green. Dieser interkaliert in die DNA, was die Fluoreszenz des Farbstoffs ansteigen lässt. In der SYBR Green qPCR wird daher keine Sonde benötigt. Der Nachteil dieser Methode ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse können jedoch im Nachhinein verschiedene Fragmentlängen der PCR-Produkte bestimmt werden. Bei der Schmelzkurvenanalyse werden, am Ende der PCR Zyklen, die DNA Doppelstränge aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (von ca. 55°C bis auf 95°C). In Tabelle 4 ist der Ansatz für eine SYBR Green qPCR dargestellt.

Tab. 4: Komponenten der SYBR Green real-time PCR Mastermixes

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion (µl)	Endkonzentration
VeriQuest SYBR Green MM (2x)	12,5	1x
Forward Primer (10 µM)	1	400 nM
Reverse Primer (10 µM)	1	400 nM
H ₂ O (nuclease-frei)	Ad. 25 µl	-

Die Menge des Templates liegt auch hier bei Plasmid-DNA bei <1ng und bei genomischer DNA bei <500ng pro Reaktion. Die spezifischen Primer wurden für die real-time PCR's mithilfe der Software *Geneious* und *AmplifX* bzw. der Internetplattform *GenScript* designt.

Bei der real-time PCR wurden dieselben PCR-Bedingungen gewählt wie für die konventionelle PCR.

Zur Analyse von real-time PCR Daten werden die Proben absolut oder relativ quantifiziert. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Eingangs-Kopienzahl mithilfe einer Standardreihe mit definierten Kopienzahlen berechnet. Diese Methode wurde in den meisten Fällen angewandt. Die relative Quantifizierung bezieht das PCR-Signal des Zieltranskripts einer behandelten Gruppe auf das einer anderen Probe, wie einer unbehandelten Kontrolle ($\Delta\Delta C_T$ – Methode). Dabei können relative Veränderungen im C_T -Wert und damit in der Menge der Template-DNA Expression festgestellt werden.[64]

Droplet Digital PCR (ddPCR)[65]

Mit der ddPCR ist es möglich, DNA Templates absolut zu quantifizieren, ohne Gebrauch einer Standardkurve. Dabei wird ebenfalls ein PCR Ansatz mit fluoreszierender Sonde genutzt, welcher jedoch mithilfe eines Droplet-Generators in ca. 20000 Wasser-Öl Emulsions-Droplets partitioniert wird. Die PCR Amplifizierung der Template Moleküle findet dann in jedem einzelnen Droplet in der Emulsion statt, sodass am Ende ca. 20000 unabhängige nano-PCRs durchgeführt werden. Nach der PCR Amplifizierung wird die Fluoreszenz eines jeden Droplets gemessen und als positiv oder negativ definiert, je nachdem, ob Template im Droplet vorlag oder nicht. Die absolute Anzahl der Target DNA Moleküle, welche in der Original Probe vor der Partitionierung enthalten waren, kann dann direkt aus dem Verhältnis positiver Events zur Gesamtzahl der Partitionierungen (Droplets) mithilfe binomialer Poisson Statistik errechnet werden.

Um die ddPCR durchzuführen wurde zunächst einmal der Mastermix für die Proben angesetzt. Dieser muss ein Gesamtvolumen von 20 µl inklusive der Template DNA haben. Tabelle 5 zeigt die Komponenten des ddPCR – Mastermixes.

Tab. 5: Reaktionsansatz für die ddPCR

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion (µl)	Endkonzentration
2x <i>ddPCR Supermix for probes (no dUTP)</i>	10	1x
Forward Primer (10 µM)	1,8	900 nM
Reverse Primer (10 µM)	1,8	900 nM
<i>TaqMan</i> Sonde (10 µM) (FAM)	0,5	250 nM
H ₂ O (nuclease-frei)	Ad. 20	

Zum Mastermix wurden je 5 µl des Templates (insgesamt ca. 100 bis 190 ng) gegeben. Die 20µl des Reaktionsmixes wurden im Anschluss in die dafür vorgesehenen Wells der *DG8* Kartusche pipettiert. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen

und kein Well am Ende leer bleibt; übrige Wells wurden mit einem dafür vorgesehenen Puffer-Mix gefüllt. In die unteren Wells wurden jeweils 70µl des *Droplet Generation*-Öls gegeben und die Kartusche dann verschlossen in den Droplet-Generator gestellt.

Nach Generierung der Droplets wurden jeweils 40µl der Droplet-Emulsion vorsichtig in ein Well einer 96-Well Platte überführt. Wichtig dabei war, sehr langsam zu pipettieren, damit die Droplets nicht wieder zerstört werden.

Nachdem alle Proben in die 96-Well Platte überführt wurden, konnte die PCR gestartet werden. Dazu wurde das normale qPCR Protokoll (s. Tab. 2) genutzt.

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben mithilfe des *Droplet Readers* ausgelesen und dann mit der Software „QuantaSoft“ (*Bio-Rad*) analysiert.

3.2.1.2 Primer- und Sonden-Design

Zum Designen von Primern für qPCR Assays sind verschiedene Softwares erhältlich und Internettools nutzbar. Das Hauptziel beim Designen von Primern für eine neue PCR sollte in jedem Falle das Erreichen einer möglichst hohen Effizienz und Sensitivität sein. Die Länge der Oligonukleotide sollte zwischen 15 und 25 Basen liegen, um die Spezifität zu maximieren, gleichzeitig sollten sie einen GC-Gehalt von ungefähr 50% aufweisen. Vermieden werden sollten Primer, die Dimere oder sekundäre Strukturen bilden können, da diese die PCR negativ beeinflussen würden.

Die *TaqMan*-Sonde sollte ebenfalls ein GC-Gehalt von 50% aufweisen und nicht länger als 30 Nukleotide lang sein. Da das Binden der Sonde in der Regel vor der Hybridisierung der Primer passiert, sollte die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde ca. 5-10°C höher liegen als die der Primer. Die Sonde sollte weiterhin nicht zu weit entfernt von den Primern binden.

3.2.1.3 Herstellung von Plasmid-Standardreihen

Um mittels der absoluten Quantifizierung real-time PCR Daten zu analysieren, werden für die Proben spezifische Plasmid-Standardreihen benötigt, die in die PCR als Template neben den unbekanntenen Proben eingesetzt werden. Zur Herstellung einer Plasmid-Standardreihe wurde sich an das Protokoll „*Preparation of tenfold serial dilutions of plasmid*“ von *Malnati et al.* (2008)[66] gehalten.

Die Plasmid-Standardreihen wurden in H₂O- sowie in CRFK gDNA-Background angesetzt. Pro Standardreihe wurden dabei die Verdünnungsstufen von 1×10^6 bis 1×10^0 Kopien/ µl hergestellt. Für eine MMTV Plasmid-Standardreihe wurde das *MMTV transfer vector* – Konstrukt (pRRpCeGFPWP25)[62] verwendet; für die JSRV Plasmid-Standardreihe der Vollängenmoleklarklon *pCMV2JS₂₁*[18]. Das Aliquotieren der Standardreihe in kleinerem Volumen verringert die Möglichkeit einer Kontamination und vermeidet Degeneration der DNA durch wiederholte Frier/Auftau-Zyklen.

3.2.1.4 Mutagenese-PCR

Zur Erstellung der *slippery site Mutanten* mussten in das oricoGPP Konstrukt Mutationen eingebracht werden. Zu diesem Zweck wurde das *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) verwendet, mithilfe dessen es möglich ist, an 5 Stellen gleichzeitig in der dsDNA Basen einzufügen oder auszutauschen. Pro Mutation wurde jeweils

ein Mutagenese-Primer verwendet mit einer Länge von 35-50 Nukleotiden, welcher die mutierte Sequenz möglichst mittig enthielt. Um eine erfolgreiche Mutagenese zu gewährleisten, sollte die Schmelztemperatur (T_m) der Primer bei 75°C liegen.

In den folgenden Tabellen sind die Komponenten eines Mutagenese-Ansatzes sowie die Mutagenese-PCR Bedingungen dargestellt.

Tab. 6: Komponenten des Ansatzes für die Mutagenese-PCR

Komponente	Konzentration	Volumen (25µl Reaktionsansatz)
10x QuikChange Multi Reaction Buffer	1x	2,5 µl
Quik Solution, 25x	0,5x	0,5 µl
Mutagenese Primer	1-3 Primer: 100ng/Primer; 4-5 Primer: 50ng/Primer	0,5 – 1,5 µl (je nach Primerlänge)
dNTP Mix, 25x	1x	1 µl
QuikChange Multi Enzyme Blend	2,5 U	1 µl
dsDNA Template	100 ng	1 µl
H ₂ O bi-dist.		Ad. 25 µl

Tab. 7: Mutagenese-PCR Bedingungen

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Aktivierung der DNA Polymerase	95	1
Denaturierung	95	1
Primer-Annealing	55	1
Elongation	65	2 min/ kb Plasmidlänge

} 30x

Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde jeweils 1 µl Dpn I zum Reaktionsansatz gegeben. Die Dpn I Endonuklease erkennt und schneidet spezifisch methylierte DNA und wurde in dem Fall eingesetzt, um die methylierte, parentale DNA zu verdauen. Anschließend wurden chemisch kompetente *Top 10 E.coli* mit 1,5 µl des Mutagenese-Ansatzes transformiert.

3.2.1.5 Restriktionsverdau mit Endonukleasen

Zur Überprüfung von Plasmiden wurden diese mit spezifisch schneidenden Endonukleasen verdaut. Die Zusammensetzung der Reaktionskomponenten sowie die Reaktionsbedingungen erfolgten je nach Enzym nach Herstellerangaben (*NEB* bzw. *Thermo Fisher Scientific*). Für

den Verdau der slippery site Mutanten-DNA mit Adel (Drall) wurde beispielsweise folgender Ansatz verwendet:

Tab. 8: typischer Reaktionsansatz eines Adel Verdaus

Komponente	Eingesetztes Volumen / Konzentration pro Reaktion
Enzym (Adel)	1 µl
10x Puffer (Buffer G)	2,5 µl
DNA	1 µg
H ₂ O bi-dist.	Ad. 25µl

Der Verdau findet bei 37°C in ca. 60 min statt. Die Qualität des Verdaus wird über die Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode und dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe; demnach ermöglicht sie so eine Kontrolle der Qualität und Größe der DNA. Dazu wurde ein 0,8 % - 2 %-iges Agarosegel hergestellt (je nach Größe der aufzutrennenden DNA; in TAE-Puffer), welchem Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) als Farbstoff zugefügt wurde. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x TAE-Laufpuffer bei 90 V über ca. 60 min. Als Größenstandard wurden, je nach zu erwartender Fragmentgrößen, die DNA-Marker „GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder“ oder „GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder“ (*Thermo Fisher Scientific*) mitgeführt.

Die Dokumentation der Agarosegele erfolgte unter UV-Licht mit dem *Alphamager2200*

3.2.1.7 DNA Extraktion

Zur Extraktion von DNA aus beispielsweise infizierten Zellen wurde das Kit „QIAamp DNA Mini Kit“ (*QIAGEN*) verwendet. Dabei wurde nach dem Protokoll „DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)“ vorgegangen. Abweichend zum Protokoll wurde im ersten Schritt das Zellpellet, dessen Zellzahl 5×10^6 Zellen nicht überschreiten sollte, zunächst einmal in 200µl PBS aufgenommen und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 20µl ProteinaseK hinzugegeben. Die weiteren Aufreinigungsschritte entsprechen denen im Protokoll.

Die extrahierte DNA konnte dann als Template in PCR's verwendet werden.

3.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mittels *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* bestimmt. Dabei wird bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm die Adsorption der eluierten DNA gemessen. Um Aussagen über die Reinheit der gemessenen DNA zu treffen, wurde der

Koeffizient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Proteinfreie Nukleinsäuren weisen einen Koeffizienten zwischen 1,8 – 2,0 auf.

3.2.1.9 RNA Extraktion und cDNA Synthese

Um aus Virusüberständen die virale RNA zu extrahieren, wurde sich des Kits „QIAamp Viral RNA Kit“ von *QIAGEN* bedient. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen (Spin Protocol). Sobald die RNA aus den Viren isoliert war, wurde der Ansatz mit der TURBO DNase (*Invitrogen*) verdaut, um die restliche DNA und Plasmide zu entfernen. Dazu wurde sich an das Protokoll des Kits „TURBO DNA-free Kit“ (*Ambion*) gehalten. Die behandelte RNA konnte dann für die cDNA Synthese weiterverwendet werden.

Die cDNA Synthese erfolgte mithilfe der „SuperScript®III Reverse Transcriptase“ (*Invitrogen*). Für die Prozedur wurde sich an das zugehörige Protokoll des Herstellers gehalten.

Die synthetisierte cDNA konnte dann als Template in PCR's verwendet werden.

3.2.1.10 Chemische Transformation

Bei der chemischen Transformation wird exogenes genetisches Material in chemisch kompetente Bakterienzellen aufgenommen. Die chemische Kompetenz wird ausgebildet, indem die Zellen zuvor einer hohen Ca^{2+} -Konzentration ausgesetzt werden. Die Methode dient hierbei der Vervielfältigung des eingebrachten genetischen Materials. Als kompetente Bakterienzellen wurden in diesem Fall *OneShot® TOP10 chemically competent cells (E. coli)* von *Invitrogen* verwendet, wovon ein 50µl Aliquot auf Eis aufgetaut wurde. Anschließend wurden 1 – 5 µl der zu transformierenden DNA in die Bakterien-Zellsuspension pipettiert und das Bakterien-DNA-Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für exakt 30 Sekunden, bei welchem die Fremd-DNA aufgenommen wird. Gleich darauf wurden die Zellen für kurze Zeit (ca. 2 min) auf Eis gestellt und im nächsten Schritt mit 250µl vorgewärmtem S.O.C. Medium versetzt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler. Ein Teil des Transformationsansatzes (20 – 200 µl) wurde danach auf Selektionsplatten (LB Amp) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Eventuell gewachsene Kolonien konnten dann für die Plasmidisolierung weiterverwendet werden.

3.2.1.11 Plasmidisolierung

Je nach gewünschter DNA-Menge wurden zur Plasmidisolierung das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ und das „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ von *QIAGEN* verwendet. Zur Gewinnung von 50 – 500 ng/µl DNA wurden Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml; LB_{Amp}) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers des *QIAGEN* Miniprep Kits. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl H_2O bi-dest. Um höhere Ausbeuten zu erzielen, wurden die Plasmide mithilfe des Maxiprep Kits isoliert. 2 ml LB_{Amp} -Medium wurden hierfür mit einer Einzelkolonie beimpft und für einige Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Vorkulturen in das Maxi-Volumen (200 ml) LB_{Amp} -Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Auch hier erfolgte die Plasmidisolierung nach dem Herstellerprotokoll. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 200-300 µl H_2O bi-dest. eluiert.

3.2.1.12 Sequenzierung

Zur Überprüfung der isolierten Plasmide erfolgte die Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger[67]. Dabei wurden Sequenzierprimer (s. 3.1.3) eingesetzt, welche aus 18 - 25 Nukleotiden bestehen, einen GC-Gehalt von mindestens 40 % aufweisen und eine Schmelztemperatur von mindestens 51°C besitzen. Neben den Sequenzierprimern wurde für die Sequenzierungs-PCR ein *BigDye-Ready Reaction Mix* (Thermo Fisher Scientific) verwendet, der neben einer AmpliTaq DNA-Polymerase und dNTPs auch einen fluoreszenzmarkierten 2',3'-Didesoxynukleotriphosphat-Mix (ddNTPs) enthält. In Tabelle 9 sind die Komponenten des Reaktionsansatzes dargestellt. Folgende Cycloer-Bedingungen wurden für die Reaktion festgelegt:

PCR-Bedingungen:	2 min 96°C	Aktivierung der DNA Polymerase
	10 sec 96°C	Denaturierung
	45 – 60°C* 5 sec	Primer-Annealing
	60°C 4 min	Elongation

*abhängig von der T_m der eingesetzten Primer

Tab. 9: Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR

Komponente	Eingesetztes Volumen/ Konzentration pro Reaktion
Template DNA (Plasmid-DNA)	150 – 300 ng
Sequenzierprimer (10µM)	0,5 µl
BigDye 3.1	0,5 µl
5x Puffer	2 µl
H ₂ O (HPLC-grade)	Ad. 10 µl

Die Sequenzanalyse wurde im zentralen Sequenzierlabor des RKI durchgeführt und die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software *Geneious*.

3.2.1.13 Assays zur Detektion der RT-Aktivität

Cavidi Assay

Eine Messung der Reversen Transkriptase-Aktivität verschiedener Viruspartikel in Zellkulturüberständen erfolgte mit dem „Cavidi HS-Mg RT Activity Kit“ (*Cavidi AB, Sweden*). Vorgegangen wurde dabei exakt nach dem Protokoll des Herstellers (Protocol B). Dafür wurden HEK 293T Zellen mit den zu untersuchenden Konstrukten transfiziert; die Virus-enthaltenden Zellkulturüberstände wurden 72h danach abgenommen. Zur Detektion wurden je 10µl der Überstände eingesetzt, wobei von jeder Probe mindestens zwei Replikate untersucht wurden, teilweise auch in mehreren Verdünnungsstufen.

Der „Cavidi Assay“ ist für die Detektion und Quantifizierung der Aktivität der Mg²⁺-abhängigen Reverse Transkriptase bei Retroviren vorgesehen. Die Methode beruht auf zwei Reaktionsschritten: der cDNA-Synthese und der DNA-Quantifizierung. Zunächst einmal wird

ein Reaktionsmix, welcher Primer und BrdUTP Nukleotide (= RT Substrat) enthält, zusammen mit der zu untersuchenden Probe (Virusüberstand) auf die Reaktionsplatte gegeben, auf welcher RNA Template gebunden ist. Die RT in der Probe synthetisiert dann einen zur Template RNA komplementären cDNA Strang. Um die DNA quantifizieren zu können wird ein AP¹-gekoppelter Antikörper dem Reaktionsmix hinzugefügt, welcher an das dsDNA/RNA Molekül bindet. Durch Zugabe eines kolorimetrischen Substrats für die AP kann das Produkt quantifiziert werden. Die AP-Aktivität ist hierbei proportional zur Aktivität der Reversen Transkriptase aus der Probe.

qPCR-based product-enhanced RT (PERT) Assay [68]

Eine andere Methode zur Detektion der Aktivität der Reversen Transkriptase ist der PERT Assay; ein qPCR-basierter RT-Assay. Dabei werden zunächst die Retroviren aus dem Zellkulturüberstand lysiert und dann zum Reaktionsmix gegeben, welcher ein MS2 RNA² Template enthält sowie spezifische MS2 Primer und einen *TaqMan* Mastermix. Diese Form des PERT wird auch als F-PERT bezeichnet, aufgrund der fluoreszenzmarkierten Sonde [69]. Während der Reaktion schreibt die retrovirale RT die MS2 Template RNA in cDNA um. Die MS2 cDNA wird dann während der PCR amplifiziert und quantifiziert. Die Menge an synthetisierter MS2 cDNA ist dabei proportional zur RT-Aktivität des zu untersuchenden Virus.

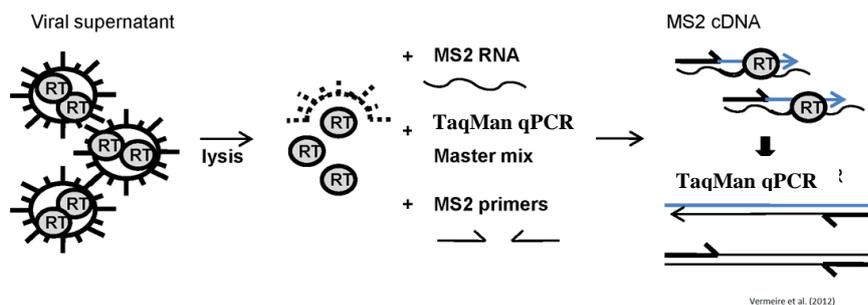


Abb. 9: Prinzip des PERT Assays

Für den PERT Assay wurden von jedem zu untersuchenden Virus jeweils 5 µl des Zellkulturüberstandes transfizierter Zellen pro Reaktion eingesetzt. Als RT-Standard dienten 12 Verdünnungsstufen des *HIV-1 rRT Standard Lenti* aus dem Cavid Kit, welche laut Cavid Protokoll angesetzt wurden, jedoch mit DMEM complete Medium (DMEM c) anstatt des dort angegebenen Base Buffers.

Auf eine vorgekühlte 96-well Platte wurden pro Well 5 µl eines 2x Lysis Puffers vorgelegt. Dieser Lysis Puffer wurde im Voraus 1:50 mit einem RNase Inhibitor versetzt. Im Anschluss wurden zu dem vorgelegten Lysis Puffer dann jeweils 5 µl der Probe bzw. des Standards pipettiert. Zusätzlich zu den Proben und zum Standard wurde DMEM c als Negativkontrolle aufgetragen. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur, in welcher die Viruspartikel lysiert wurden. Währenddessen wurde der Mastermix angesetzt, dessen Komponenten in Tabelle 10 dargestellt sind. In eine neue 96-well Platte, welche dann für die qPCR auch eingesetzt wird, wurden je 11 µl des Mastermixes pro Well pipettiert. Anschließend wurden, nach den 10 Minuten Inkubationszeit, in jedes Well des lysierten Virus bzw. Standard 90 µl H₂O bi-dist. zum Verdünnen des Lysis Puffers gegeben. Zum vorgelegten Mastermix wurden dann je 9 µl des lysierten Virus gegeben, sodass ein Endvolumen von 20 µl erreicht

¹ Alkalische Phosphatase

² Kommerziell erhältliche Bakteriophagen-RNA

wurde. Im Anschluss wurde die Platte in den Thermocycler gestellt und qPCR konnte gestartet werden (s. Tab. 11). Die Auswertung erfolgte über die Software „CFX Maestro“ von *Bio Rad*.

Tab. 10: Komponenten des Mastermixes für den PERT

Komponenten	Eingesetztes Volumen pro Reaktion (µl)	Endkonzentration
2x <i>Brilliant II QPCR Master Mix</i>	10	1x
<i>Reference Dye</i> (2 µM) ROX	0,375	30 nM
RNase Inhibitor, 1:10 verdünnt	0,1	0,02U/µl
Horie2010_PERT-F Primer (10 µM)	1	500 nM
Horie2010_PERT-R Primer (10 µM)	1	500 nM
MS2-PERT_Horie-Probe (10 µM) FAM	0,5	250 nM
MS2 RNA Template	0,1	1,5 ng

Tab. 11: PCR-Bedingungen des PERT Assays

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	
RT Reaktion	42	20	
Aktivierung der DNA Polymerase	95	10	
Denaturierung	95	0:30	} 45x
Primer-Annealing	60	0:30	
Elongation	72	0:15	

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultivierung

Tab. 12: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	verwendetes Medium
HEK 293T	Niere (embryonal), human	DMEM + FKS + L-Glutamin
CRFK	Nierenkortex, Katze	DMEM + FKS + L-Glutamin

In der oben dargestellten Tabelle sind die verwendeten Zelllinien aufgelistet. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Kultiviert wurden diese in DMEM mit

10% FKS, 1% Penicillin/ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin in 150cm² Zellkulturflaschen. Ferner erfolgte die Kultivierung bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 98% und einem CO₂-Gehalt von 5%. Bei einer Konfluenz von ca. 80 – 90% wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 20 ml PBS gewaschen, um verbrauchtes Medium und abgestorbene Zellreste zu entfernen. Durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA Lösung und kurzer Inkubationszeit bei 37°C wurden die Adhäsionsproteine abgebaut, wodurch die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und vereinzelt werden konnten. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und je nach Konfluenz der Zellen 1/5 bis 1/10 der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Zur weiteren Kultivierung wurde die Flasche bis auf 25 ml mit frischem Medium aufgefüllt.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl von Zellen mit einem automatischen Zellzähler bestimmen zu können, müssen diese in einer Elektrolyt-Suspension vorliegen. Zur Zellzahlbestimmung wurde dazu ein Gerät der Firma *Coulter* verwendet. Vor der Zählung wurden die Zellen trypsiniert und in Medium aufgenommen. 10 µl dieser Zellsuspension wurden dann in 10 ml isotonischer Lösung (*Coulter Isoton Diluent*) verdünnt und mittels Coulter Z2 gemessen. Zur Messung der Zellzahl wurden je nach Zellart und -größe bestimmte Parameter im Gerät eingestellt. Anschließend konnten die Zellen je nach gewünschter Zellzahl in ein Kulturgefäß ausgesät werden.

3.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels PEI

Die Transfektion bezeichnet das Einbringen von freier, löslicher DNA in eukaryotische Zellen. Als Transfektionsreagenz wurde dafür das synthetische Polymer PEI (Polyethylenimin) verwendet. Transfektionen erfolgten in 75 cm² Flaschen oder 6-Well Platten, je nach benötigter Virusmenge. In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Transfektionsformate mit den jeweils verwendeten Zellzahlen und eingesetzter DNA-Menge dargestellt.

Tab. 13: verwendete Zellzahlen und eingesetzte DNA-Menge in verschiedenen Transfektionsformaten

	75 cm ² Flasche	6-Well Platte
verwendete Zellzahl (HEK 293T)	5 x 10 ⁶ Zellen	6 x 10 ⁵ Zellen / Well
eingesetzte DNA-Menge	12 µg	3 µg

Das Aussäen der Zellen in die Kulturgefäße erfolgte ca. 16 Stunden vor der Transfektion. Wenn die Zellen zu etwa 60% konfluent waren, konnte die Transfektion der Zellen erfolgen. Dazu wurden zunächst einmal die für die Virusproduktion benötigten Plasmide (s. Tabelle 14) so zusammen pipettiert, dass die insgesamt einzusetzende DNA Menge erreicht wurde. Dazu wurden dann, je nach Format, 0,2 bis 1 ml basal DMEM gegeben. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von PEI im Verhältnis 1:3 zur DNA. Der Transfektionsansatz wurde gevortext und inkubierte dann bei Raumtemperatur über 15 Minuten. Anschließend wurde der Transfektionsansatz mit 2 ml frischem DMEM c auf die Zellen gegeben, von denen man im Voraus das verbrauchte Medium abgenommen hatte. Optimalerweise sollte das Medium ca. 16h nach der Transfektion erneut gewechselt werden, um das PEI zu entfernen, was möglicherweise den Zellen schaden könnte. Nach 2 – 3 Tagen konnte dann der Virusüberstand geerntet werden; d.h. der Überstand wurde abgenommen und in ein

Reaktionsgefäß überführt und bei 200 xg 10 Minuten lang zellfrei zentrifugiert. Die Virusüberstände wurden bei -80°C gelagert.

Tab. 14: Transfektionsprotokoll der verschiedenen Viren

Virusähnliche Partikel (VLP's)	Plasmide	Soll %
Ori HERV	CMV oriEGFP	60
	oricoGPP	16,6
	oricoRec	16,6
	VSV-G	3,3
HERV Kcon	Kcon-GFP	60
	oricoGPP	16,6
	oricoRec	16,6
	VSV-G	3,3
MMTV	MMTV transfer vector (pRRpCeGFPWPRE25)	38,2
	Packaging construct (pCMgpRRE17)	31,8
	pLPII	22,9
	VSV-G	7
JSRV	JSRV pCMV 2JS ₂₁	100

3.2.2.4 *In vitro* Infektionen (Transduktionen)

Das Übertragen von fremder DNA durch Viren auf Zellen wird als Infektion bzw. Transduktion bezeichnet. In diesem Fall wurde die virale RNA der mit den Transfektionen produzierten Viren (VLP's) mithilfe des Infektionsreagens *Polybrene* in CRFK bzw. 293T Zellen eingebracht.

Für die Infektion wurden am Tag vorher zunächst einmal Zellen im geeigneten Maßstab ausgesät. In Tabelle 15 sind die verschiedenen Formate mit den jeweils verwendeten Zellzahlen dargestellt.

Tab. 15: Infektionsformate mit den jeweils eingesetzten Zellzahlen

Zelllinie	6-Well Platte	12-Well Platte
HEK 293T	3 x 10 ⁵ Zellen/ Well	1,5 x 10 ⁵ Zellen/ Well
CRFK	4 x 10 ⁵ Zellen/ Well	2 x 10 ⁵ Zellen/ Well

In den meisten Fällen erfolgten die Infektionsversuche im 6-Well-Maßstab, da dabei genügend Zell- und damit auch DNA-Material entstand. Vor der Infektion wurden die Virusüberstände, welche zum infizieren verwendet wurden, mit DNase behandelt, um eventuell vorhandene Plasmidrückstände zu entfernen. Dazu wurden die Virusüberstände in kleinere Volumina

partitioniert und dann auf 500 µl Virus 50 µl des dazugehörigen 10-fach Puffers und 5 µl der DNase gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten.

Als Negativkontrolle für die Infektion sollte ein Teil der Virusüberstände hitzeinaktiviert werden. Dazu wurden im Anschluss an den DNase Verdau die Proben gleichen Virus wieder vereinigt und dann auf zwei gleiche Teile aufgeteilt. Der eine Teil wurde auf Eis stehen gelassen (=aktives Virus) wohingegen der andere Teil bei 65°C über 40 Minuten hitzeinaktiviert wurde.

Die Zellen wurden vor der Infektion mit frischem Medium versorgt, welches zuvor mit 8µg/ml Polybrene versetzt wurde. Im 6-Well Maßstab mit 2 ml Gesamtvolumen wurden demnach jeweils 1314 µl DMEM c mit 16 µl Polybrene (1 mg/ml) versetzt, um auf eine Endkonzentration von 8 µg/ml zu kommen. Zur Infektion wurden jeweils 670 µl des Virusüberstandes (hitzeinaktiviert oder aktiv) dazugegeben. Die Infektion erfolgte über eine „Spinokulation“ bei 1200 xg für 2 Stunden, mit sehr langsamer Beschleunigung bzw. Bremsen. Zur Synchronisierung der Infektion wurde die Spinokulation bei 4°C durchgeführt, um sämtliche Reaktionen in der Zelle währenddessen zu verhindern.

Im Anschluss an die Spinokulation wurde von allen Wells das Medium abgenommen und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen, die erst nach 6 bzw. 48 Stunden geerntet werden sollten, wurden nach dem Waschen mit PBS mit frischem Medium versetzt und in den Brutschrank gestellt. Die Zellen, welche zum Zeitpunkt 0, d.h. direkt nach der Spinokulation, geerntet werden sollten, wurden mit 200 µl Trypsin versetzt und einige Minuten bei 37°C inkubiert, um die Adhäsion zu lösen. Anschließend wurden diese Zellen dann in ca. 1 ml Medium resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 8000 rpm für 5 Minuten pelletiert. Bis zur DNA Extraktion aus den Zellpellets wurden diese bei -20°C gelagert.

Die Ernte der weiteren Zellen erfolgte, wie beschrieben, nach 6 bzw. 48 Stunden, wobei letztere vor der Ernte noch mithilfe des Fluoreszenzmikroskops auf GFP-fluoreszierende Zellen überprüft wurden, was eine erfolgreiche Infektion bestätigen würde.

3.2.3 Protein- und Immunbiochemische Methoden

3.2.3.1 Zelllyse und Proteinextraktion

Zur Analyse der Proteinexpression transfizierter Zellen mussten die Proteine zunächst aus den Zellen extrahiert werden, nachdem diese lysiert wurden. Für die Lyse der Zellen³ wurden diese, nachdem der Überstand abgenommen wurde, mit eiskaltem PBS gewaschen und 200 µl NP40 Lysis-Puffer (mit Protease-Inhibitor) auf die Zellen gegeben. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der 6-Well Platte abgeschabt und die Suspension in Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Im Anschluss wurden die Proben bei 4°C und 12000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die Proteine befinden, wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet verworfen wurde. Die Proteinextrakte konnten gleich weiterverwendet bzw. für weitere Analysen bei -20°C gelagert werden.

³ Die Transfektion der Zellen erfolgte hier im 6-Well Format.

3.2.3.2 BCA-Assay zur Bestimmung der Protein Konzentration

Um die Protein Konzentration der Lysate zu bestimmen, wurde der BCA-Assay verwendet. Dazu wurde das Kit „Pierce BCA Protein Assay Kit“ (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen (*Microplate Procedure*).

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird verwendet, um Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufzutrennen[70]. Verwendet wurde hierbei ein 5 %iges Sammelgel und ein 12 %iges Trenngel. Dabei war die Acrylamid-Konzentration des Trenngels abhängig von der zu detektierenden Proteingröße; je kleiner ein Protein ist, desto höher sollte der Anteil Acrylamid im Trenngel sein. Im Gegensatz zum Sammelgel zeichnet sich das Trenngel durch eine höhere Salzkonzentration, eine geringere Porenweite sowie einen höheren pH-Wert aus. Die Vernetzung der Acrylamid-Monomere wird durch Ammonium-Persulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. In Tabelle 16 ist die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele aufgelistet.

Tab. 16: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE

	Trenngel 12 %	Sammelgel 5 %
H₂O bi-dest.	5,3 ml	5,7 ml
Acrylamid 30 %	6,4 ml	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	4 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	2,5 ml
10 % SDS	160 µl	100 µl
10 % APS	160 µl	50 µl
TEMED	16 µl	10 µl

Vor dem Auftragen der Proben auf das Sammelgel wurden die Proben 6:1 mit dem 6x Laemmli Puffer, welcher 5 % β -Mercaptoethanol enthält, versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100V im Sammelgel bzw. 180 V im Trenngel. Als Größenstandard wurde die „PageRuler Prestained Protein Ladder 10 – 180 kDa“ (*Thermo Scientific*) verwendet. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Gel für den Western Blot weiter verwendet.

3.2.3.4 Western Blot

Im Western Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und im Anschluss mittels Antikörper spezifisch detektiert.

Zur Vorbereitung auf den Transfer wurde das SDS-Gel zunächst einmal für 20 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte nach dem Semi-Dry Blot-Verfahren. Dazu wurde das SDS-Gel auf die Membran und als Sandwich zwischen zwei dicke, mit Transferpuffer-durchtränkten Filterpapieren, gelegt. Die Membran wurde zuvor für einige Minuten in Methanol aktiviert. Das Blotting erfolgte bei 15 V für 60 Minuten. Anschließend

wurde die Membran mit PBS-T (PBS/ Tween 0,1%) gewaschen und für eine Stunde in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die Inkubation mit dem primären Antikörper⁴ erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper⁵ für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die Detektion der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper konnte mithilfe von Fluoreszenzmessung im *Odyssey Infrared Imaging System* erfolgen. Die verschiedenen Sekundären Antikörper wurden bei 700 nm bzw. 800 nm gemessen.

3.2.3.5 p27 Gag-ELISA

Der ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern. Mithilfe des hier verwendeten p27 antigen-capture ELISA[71] ist es möglich, das p27-CA Protein von HERV-K(HML-2) spezifisch nachzuweisen und somit auch Virus in Überständen zu quantifizieren.

Zunächst wurden dafür 96-Well Mikrotiter Platten mit der zuvor bestimmten optimalen Verdünnung (1:50) des monoklonalen HERMA7 Antikörpers in Bikarbonat Puffer (pH 9,6) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T (PBS + 0,05% Tween20) folgte das Blockieren der Platten für eine Stunde bei 37°C in Blockierungspuffer (PM: 2% Milchpulver in PBS). Nachdem die Proben (Virusüberstände) in 0,2% Tween20 inaktiviert wurden, konnten diese 1:3 in PMT (Blockierungspuffer + 0,05% Tween20) verdünnt und auf der Platte jeweils immer 1:3 seriell heruntertitriert werden. Dabei wurden 100 ng/ml aufgereinigtes rekombinantes p27 Protein, welches auch in PMT verdünnt und titriert wurde, als Standard für die Quantifizierung benutzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten erneut drei Mal in PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Primären Antikörper (anti-oriHERV p27-CA rabbit sera), welcher 1:400 in PMT verdünnt wurde, für eine Stunde bei 37°C. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit PBS-T wurde der sekundäre Antikörper (goat anti-rabbit IgG-peroxidase Konjugat) auf die Wells gegeben, welcher zuvor 1:2500 in PMT verdünnt wurde. Es folgte wiederum eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Schließlich wurden die Platten abermals gewaschen und mit dem Substratpuffer (0,4 mg/ml OPD in Phosphat Citrat-Puffer(pH 6) + 0,025 % H₂O₂) versetzt. Nach Inkubation für 2 – 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 25% H₂SO₄ Lösung gestoppt. Die optische Extinktion wurde gemessen bei einer Wellenlänge von 492 nm und der Referenz-Wellenlänge von 620 nm.

3.2.3.6 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen anhand verschiedener Eigenschaften durch Fluoreszenzmessung analysieren und sortieren. Durch das Binden fluoreszenzmarkierter Antikörper an Oberflächen- oder auch intra-zelluläre Proteine lassen sich beispielsweise verschiedene Zelltypen identifizieren. Es ist jedoch auch möglich, Zellen anhand intrazellulär exprimiertem GFP zu charakterisieren. So können GFP-positive Zellen von GFP-negativen Zellen unterschieden werden. Dies macht unter Anderem nach Transfektionen mit GFP oder Infektionen mit GFP-Reporterviren Sinn, wenn man den Anteil der GFP-positiven Zellen ermitteln möchte.

⁴ Für HERV: Herma 7 anti-gag bzw. rat anti-p27 serum (1:7500); für GAPDH: rabbit anti-GAPDH (1:5000)

⁵ Für HERV: anti-rat (green fluorescence) (1:3000); für GAPDH: goat anti rabbit (red fluorescence) (1:20000)

In dem Fall wurden infizierte Zellen auf GFP-Expression untersucht. Dazu wurden diese nach der Ernte pelletiert und in 250µl Paraformaldehyd (Pfa) zur Fixierung aufgenommen. Die Zellen wurden dann in Micronic Tubes überführt und im Durchflusszytometer hinsichtlich GFP-Expression analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Produktion und Charakterisierung geeigneter Reporterviren

4.1.1 Vergleich der Reportervirussysteme oriHERV und HERV-K_{CON}

Um für die geplanten Infektionsexperimente bestmöglich geeignete Reporterviren benutzen zu können, mussten diese erst einmal produziert und charakterisiert werden. Zur Verfügung standen dazu zwei unterschiedliche, auf HERV-K(HML-2) basierte Reportervirussysteme.

Zum einen wurde dazu ein Expressionsplasmid verwendet, welches als virales Genom die rekonstituierte HERV-K_{CON}-Sequenz (*Lee and Bieniasz, 2007*) enthält. (CHKCG; hier als HERV K_{CON}-Backbone bezeichnet). Das Backbone liefert jeweils immer die zu verpackende virale RNA. Dieses beinhaltet einen CMV Promoter anstelle der 3' U3 Region, die Gene *gag*, *pro* und *pol* sowie anstatt des *env* Gens eine CMV-GFP Kasette. Alternativ dazu wurde ein weiteres, auch von einer rekonstituierten HERV-K Sequenz abgeleitetes Reporterplasmid als Backbone verwendet, welches in der eigenen Arbeitsgruppe entworfen wurde (CMV oriEGFP)⁶. Dieses enthält ebenso einen CMV Promoter und die Gene für das Gag Protein, die Protease und die Polymerase sowie eine EGFP-Kasette anstatt des *env*-Gens. Weiterhin wurden mit den Reporterplasmiden jeweils *Packaging*-Konstrukte transfiziert, welche ebenfalls die Gene *gag*, *pro* und *pol* besitzen. Das *oricoGPP* Konstrukt liegt dabei in kodon-optimierter Form vor, um eine möglichst effiziente Expression der Proteine zu erreichen. Ein weiteres Plasmid kodierte für das akzessorische Rec Protein und liegt ebenfalls in kodon-optimierter Form vor. Dieses wurde für beide Reportervirussysteme verwendet. Als Envelope-Protein diente das VSV-G Env, welches bekannt für seinen breiten Zelltropismus ist. In Abbildung 10 sind die beiden verwendeten Reportervirussysteme gezeigt.

⁶ Kramer et al. (2016)

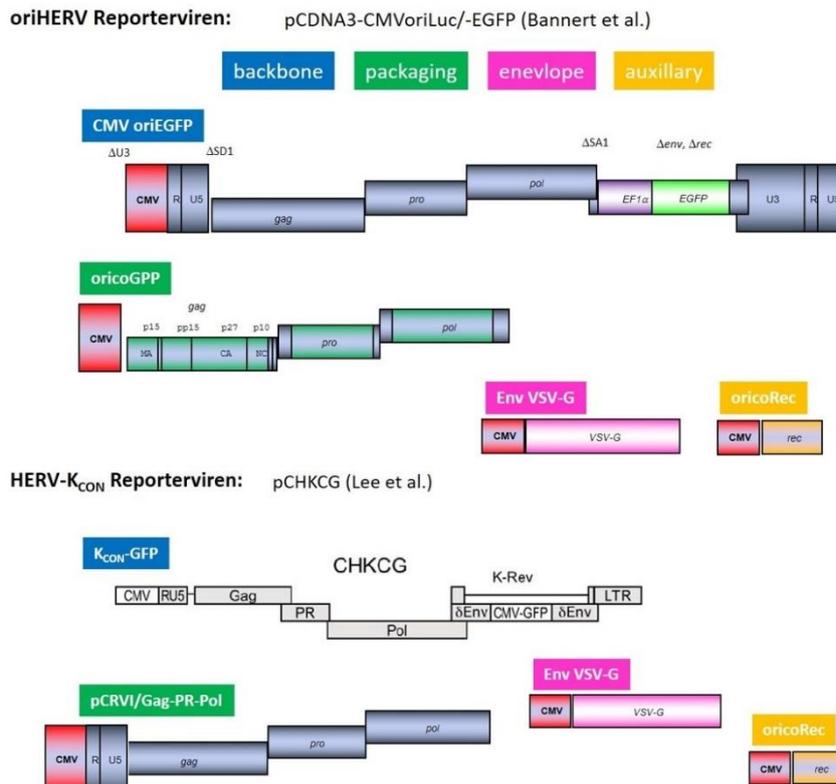


Abb. 10: verschiedene Reportervirussysteme, jeweils aus vier Plasmiden bestehend, welche in einem definierten Verhältnis in HEK 293T Zellen ko-transfiziert wurden. pCRVI/ Gag-PR-Pol in dieser Arbeit als "Kcon-GPP" bezeichnet.

Die Produktion der pseudotypisierten GFP-Reporterviren erfolgte durch Ko-Transfektion der vier Plasmide, welche die Gene für alle benötigten strukturellen Proteine, Enzyme und das virale Genom tragen. Die Plasmide wurden in einem definierten Verhältnis zueinander in HEK 293T Zellen ko-transfiziert, um eine optimale Ausbeute an Viruspartikeln zu erhalten. Der prozentuale Anteil der Konstrukte zueinander wurde, im Fall von den oriHERV Reporterviren, in vorherigen Arbeiten getestet [59] und im Fall der HERV K_{CON} Reporterviren aus der Publikation übernommen.

Zusätzlich zu diesen beiden Reportervirustypen wurde ein dritter Typ produziert, welcher als Backbone die HERV-K_{CON} Sequenz und als Packaging Konstrukt die oricoGPP Sequenz enthielt. Durch den CMV Promoter in den jeweiligen Backbone-Plasmiden war in den Producer-Zellen eine Expression des Reportergens GFP zu erwarten. Somit konnte die Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden.

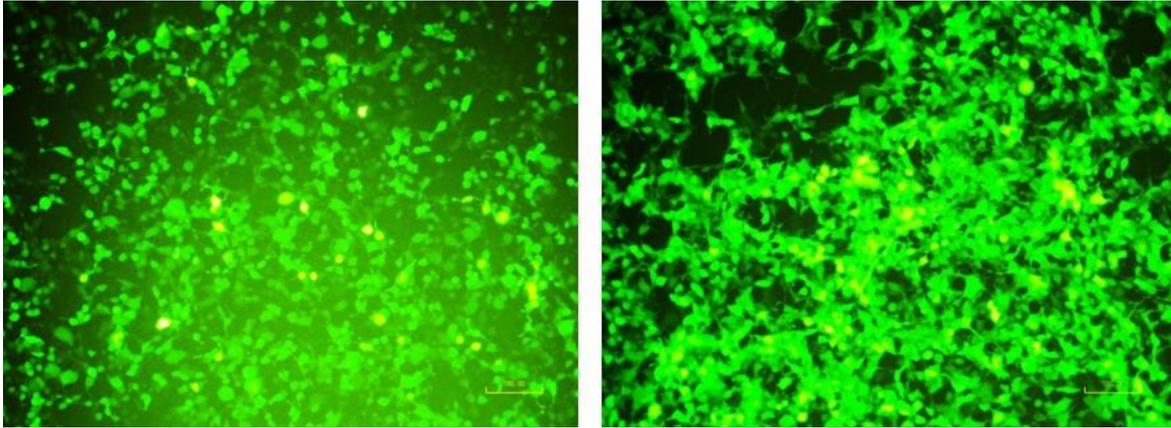


Abb. 11: mit CMV oriEGFP (links) bzw. KCON-GFP (rechts) transfizierte, GFP-exprimierende 293T Zellen, nach 48h

Die Transfektionseffizienz lag hier bei ca. 75 – 100%, je nach Virus, und wurde anhand des Anteils fluoreszierender zu nicht fluoreszierenden Zellen beurteilt.

Um die Reporterviren miteinander vergleichen zu können, wurde jeder Ansatz drei Mal in HEK 293T Zellen transfiziert, sodass drei Replikate der jeweiligen Virusüberstände produziert wurden.

Nach erfolgreicher Produktion der Reporterviren wurden diese anhand ihrer Reverse Transkriptase (RT)-Aktivität, des p27 Gehaltes und der Anzahl viraler RNA Kopien (gemessen als cDNA) charakterisiert. Die Eigenschaften der Reporterviren wurden mit denen von pBSKori K113, einem rekonstituierten, auf HERV-K113 basierten Vollängenmoleklarklon⁷, verglichen. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dieser Vollängenmoleklarklon zwar wenige Viruspartikel produziert, diese jedoch im Verhältnis der Strukturproteine und viralen Enzyme so zusammengesetzt sein sollten, wie der potentielle ehemalige exogene HERV-K Virus.

Nachdem aus den produzierten Viren die RNA extrahiert und die cDNA synthetisiert wurde, konnte diese in eine HERV-spezifische real-time PCR eingesetzt werden, um die cDNA Kopien zu quantifizieren. Das folgende Diagramm zeigt die cDNA Kopien der verschiedenen Reporterviren in einem 25µl Reaktionsansatz. Die cDNA Kopienanzahl entspricht der Anzahl der viralen RNA Kopien.

⁷ Siehe dazu Beimforde et al. (2007) und Hohn et al. (2014)

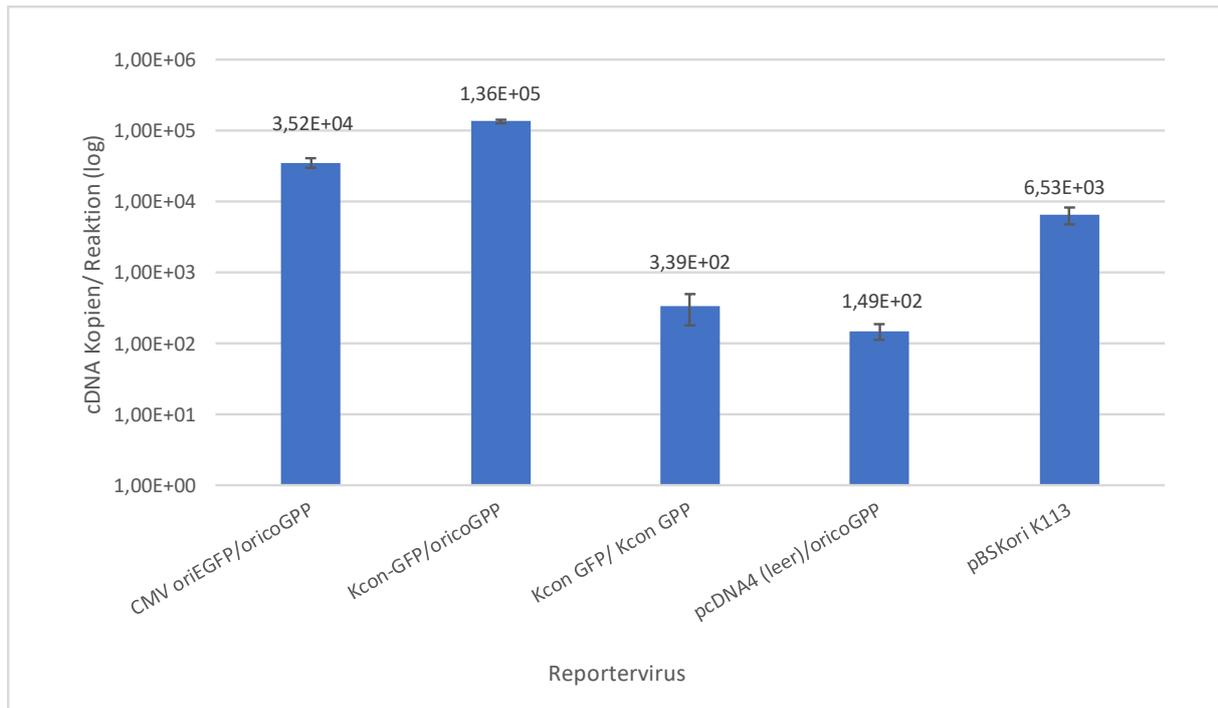


Abb. 12: logarithmische Darstellung der Anzahl der cDNA Kopien verschiedener Reporterviren. Neben dem aufgezeigten Backbone und Packaging-Konstrukt enthalten diese noch die oricoRec und VSV-G Sequenz. Der Leervektor pcDNA4 dient in diesem Fall als Negativkontrolle für das Backbone-Konstrukt; weiterhin wird mit dem Vollängenmoleklarklon pBSKori K113 verglichen. Die Werte setzen sich aus drei einzelnen Transfektionen (als Replikate) zusammen.

Mit $1,36 \times 10^5$ Kopien pro Reaktion kann das K_{CON}-Reportervirus mit zusätzlichem oricoGPP die meisten vRNA Kopien vorweisen, während bei den anderen Reporterviren die Kopienzahl um fast ein bzw. drei Log-Stufen darunter liegt.

Weiterhin wurden die aus den Transfektionen produzierten Virusüberstände auf den p27 Gehalt mittels eines HERV-spezifischen p27 Antigen-Capture ELISA getestet. Die gemessene p27 Konzentration der verschiedenen Reporterviren ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

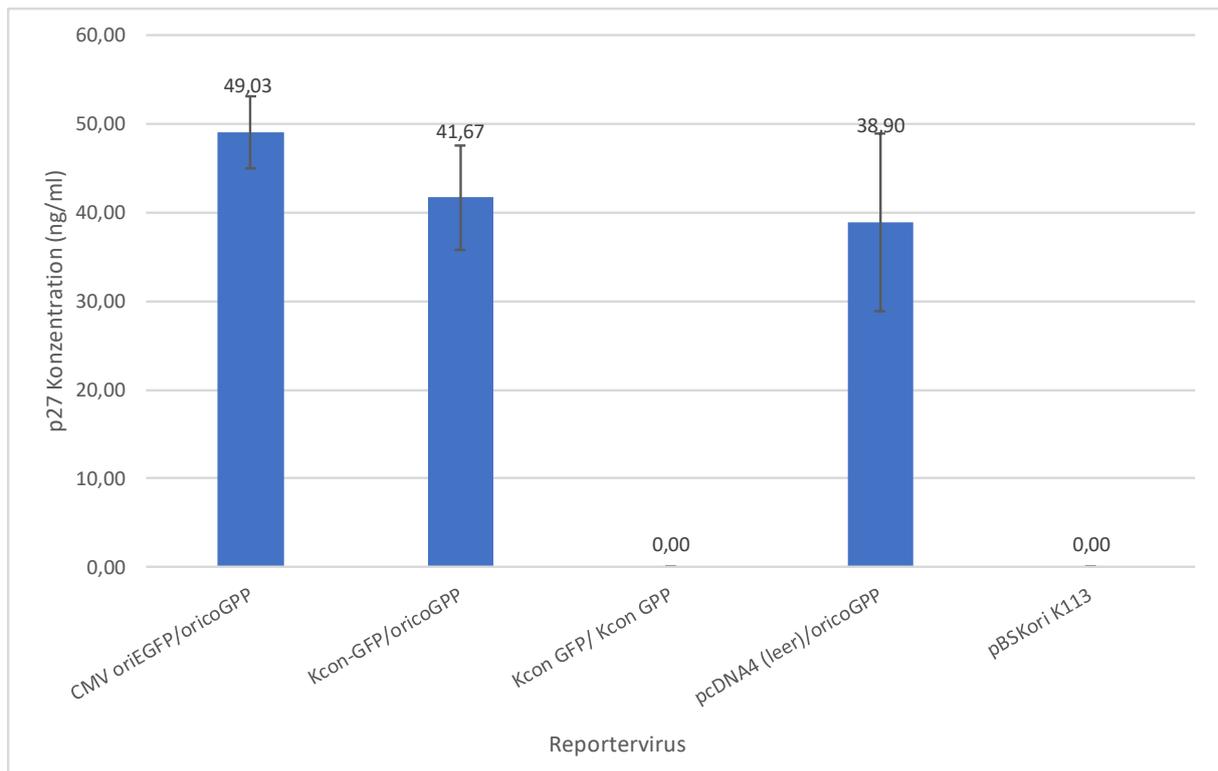


Abb. 13: p27 Konzentration der verschiedenen Reporterviren. Neben dem aufgezeigten Backbone und Packaging-Konstrukt enthalten diese noch die oricoRec und VSV-G Sequenz. Die Werte setzen sich aus drei einzelnen Transfektionen (als Replikate) zusammen.

Mit 49 ng/ml p27 Gehalt produzierten die oriHERV Reporterviren am meisten CA-Proteine im Vergleich zu den anderen Reporterviren und zum Vollängenmoleklarklon, welcher stets kaum im p27 Gehalt messbar war, solange er im unkonzentrierten Zustand eingesetzt wurde. Nachgewiesen werden konnte p27 in diesen Präparationen nur, wenn die virushaltigen Zellkulturüberstände durch UZ um das 100-fache aufkonzentriert wurden. Ebenso konnte in den Reporterviren mit K_{CON}-spezifischem GPP kein Capsid-Protein gemessen werden.

Die RT-Aktivität wurde ebenfalls mit den produzierten Virusüberständen mittels Cavid Assay und PERT-Assay gemessen. Da die Ergebnisse des PERT von denen des kommerziellen Cavid-Assays bestätigt werden konnten, sind in dem Fall nur die Ergebnisse des PERT-Assays dargestellt.

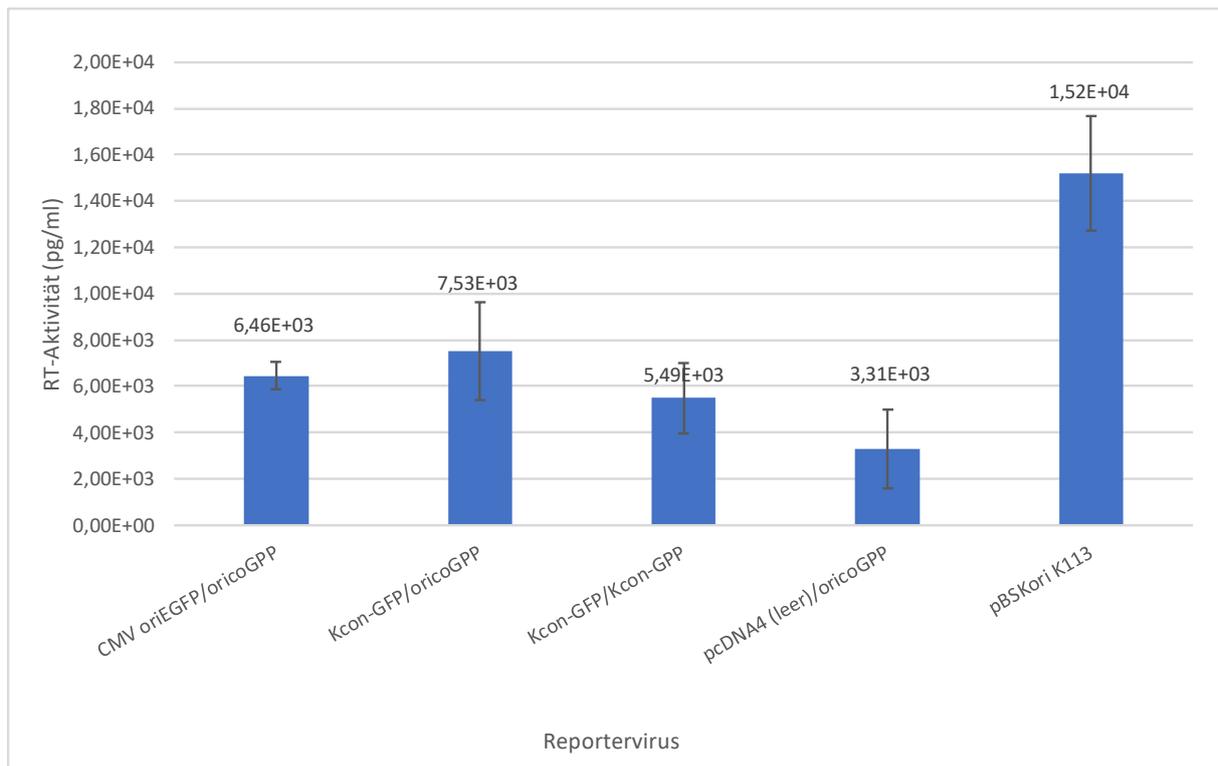


Abb. 14: RT-Aktivität der verschiedenen produzierten Reporterviren. Alle Reporterviren enthalten zusätzlich die oricoRec und VSV-G Sequenz. Der Vollängenmolekularklon pBSKori K113 dient zum Vergleich. Die Werte setzen sich aus drei einzelnen Transfektionen (als Replikate) zusammen.

Die meiste RT-Aktivität wurde hierbei, abgesehen vom Vollängenmolekularklon, im Fall des K_{CON}-Reportervirus mit oricoGPP mit durchschnittlich 7530 pg/ml gemessen. Die anderen zu testenden Reporterviren befinden sich in der RT-Aktivität mit 6460 pg/ml (oriHERV) und 5490 pg/ml (HERV K_{CON} + K_{CON}-GPP) etwas darunter.

OricoGPP Titration

Um sicherzugehen, dass der Anteil an oricoGPP Packaging-Konstrukt optimal für die Virusproduktion ist, wurden erneut 293T Zellen mit den für die Reportervirusproduktion benötigten Plasmiden transfiziert. Dabei wurde sich auf zwei Systeme beschränkt: Zum einen wurde das oriHERV Reportervirussystem verwendet und zum anderen wurde das System, welches als Backbone das HERV-K_{CON}-GFP Plasmid und als Packaging-Plasmid oricoGPP beinhaltet, zur Transfektion benutzt. Im weiteren Verlauf wird dieses System als HERV K_{CON} Reportervirussystem bezeichnet. Das HERV-K_{CON}-Reportervirussystem mit zugehörigen K_{CON}-GPP stellte sich aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse als nicht geeignet für weitere Versuche heraus. Transfiziert wurde mit dem jeweiligen Backbone, den üblichen Anteilen an oricoRec und VSV-G sowie den variierenden Anteilen an oricoGPP bis zu 16,7%. Wurde weniger oricoGPP verwendet, wurde bis zu diesem Wert mit dem pcDNA4 Leervektor aufgefüllt.

Nach Ernte der in 293T Zellen produzierten Reporterviren wurde die RNA extrahiert, woraus die cDNA Synthese folgte. In der folgenden Abbildung ist die Menge der cDNA Kopien (=vRNA) der im oricoGPP-Anteil unterschiedlichen Viren dargestellt.

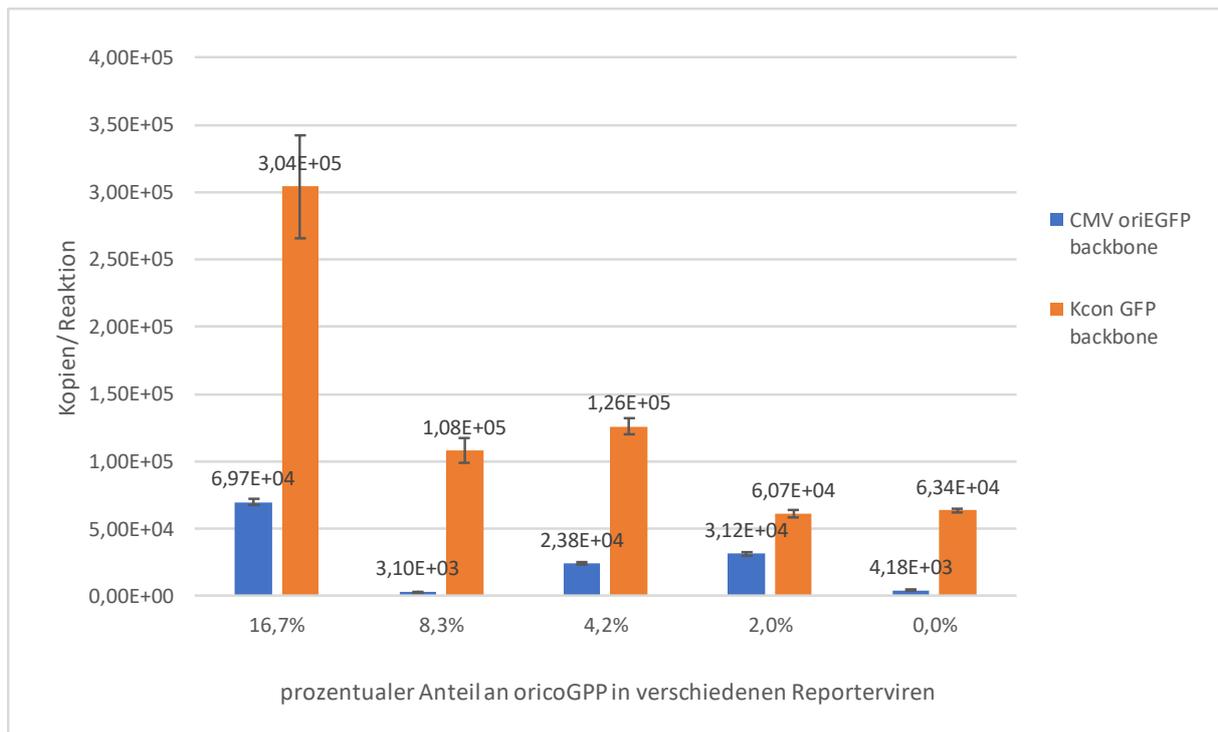


Abb. 15: Anzahl der cDNA Kopien pro Reaktion von oriHERV bzw. HERV Kcon Reporterviren mit variierendem Anteil an oricoGPP. Die angegebenen prozentualen Anteile geben den Anteil an oricoGPP an, welcher in die Transfektion eingesetzt wurde. Aufgefüllt wurde mit dem Leervektor. Alle Reporterviren enthalten zusätzlich die oricoRec und VSV-G Sequenz. Gemessen wurde in Dreifachbestimmung.

Die meisten Kopien konnten dabei in den Reporterviren detektiert werden, welche den standardmäßigen Anteil von 16,7% an oricoGPP beinhalteten; dies gilt für beide Typen von Reporterviren. Mit abnehmendem oricoGPP-Anteil sinkt auch die Anzahl der vRNA Kopien pro Reaktion. Bei den oriHERV Reporterviren mit dem üblichen Anteil an zusätzlichem oricoGPP (16,7%) konnte das 16-fache an vRNA Kopien gemessen werden gegenüber den Reporterviren, die kein zusätzliches oricoGPP enthielten. Die K_{CON}-Reporterviren produzierten knapp 5-mal so viele vRNA Kopien pro Reaktion mit dem standardmäßigen Anteil an oricoGPP als ohne.

Insgesamt können die HERV K_{CON}-Reporterviren mehr vRNA Kopien vorweisen als die oriHERV-Reporterviren; im ersten Fall sind es circa 4 mal so viele Kopien.

Im weiteren Verlauf wurden die gleichen Reporterviren mithilfe des ELISA auf ihren p27 Gehalt getestet. Dies ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

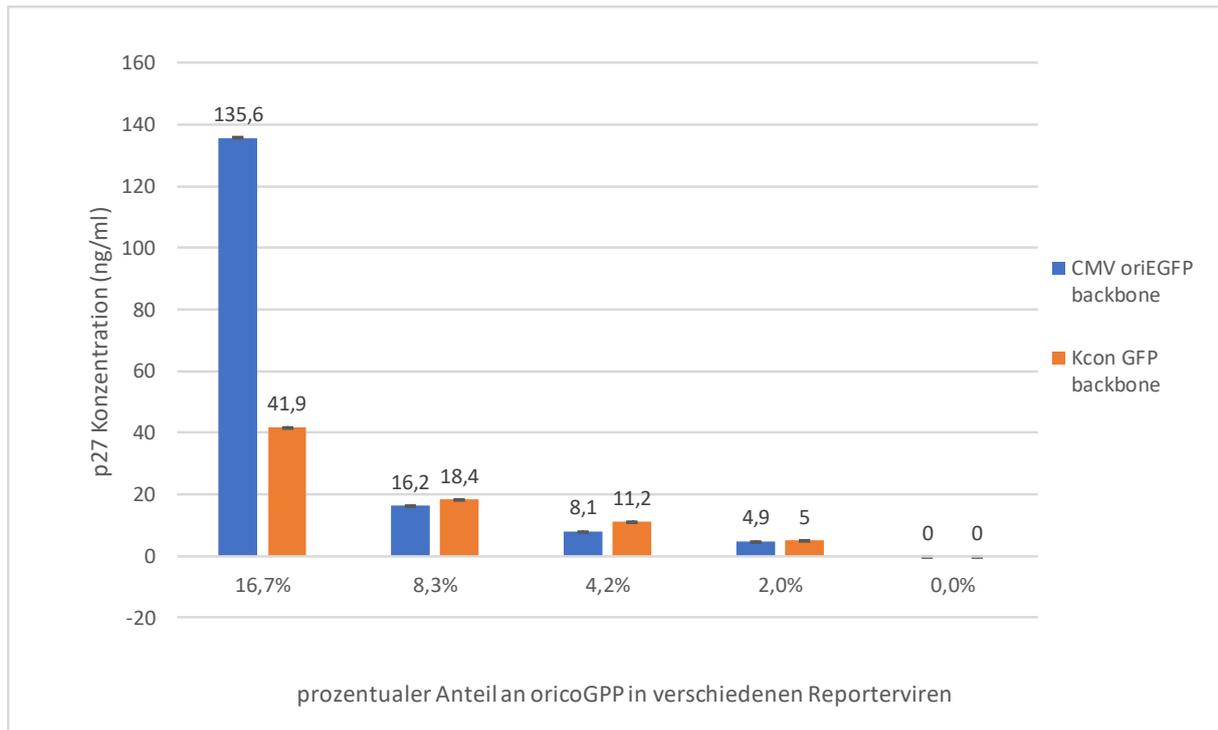


Abb. 16: p27 Konzentration der Reporterviren zwei verschiedener Reportervirussysteme mit variierendem Anteil an zugesetztem oricoGPP. Die angegebenen prozentualen Anteile geben den Anteil an oricoGPP an, welcher in die Transfektion eingesetzt wurde. Aufgefüllt wurde mit dem Leervektor. Alle Reporterviren enthalten zusätzlich die oricoRec und VSV-G Sequenz. Gemessen wurde in Zweifachbestimmung.

Der höchste p27 Gehalt wurde in den Reporterviren mit dem üblichen Anteil an oricoGPP gemessen. Dabei ist bei den oriHERV Reporterviren mit 135,6 ng/ml das dreifache an p27 Protein gemessen worden wie bei den HERV-K_{CON} Reporterviren. Mit sinkendem Anteil an oricoGPP sinkt auch die p27 Konzentration der Reporterviren. Bei beiden Reportervirustypen ist kein p27 Gehalt mehr messbar, wenn kein oricoGPP zugefügt wurde und stattdessen mit dem pcDNA4 Leervektor aufgefüllt wurde.

Um die beiden Reportervirustypen mit jeweils variierendem oricoGPP Anteil weiterhin charakterisieren zu können, wurde zuletzt die RT-Aktivität dieser mittels PERT-Assay gemessen. Die Daten hierzu sind in Abbildung 17 zu sehen.

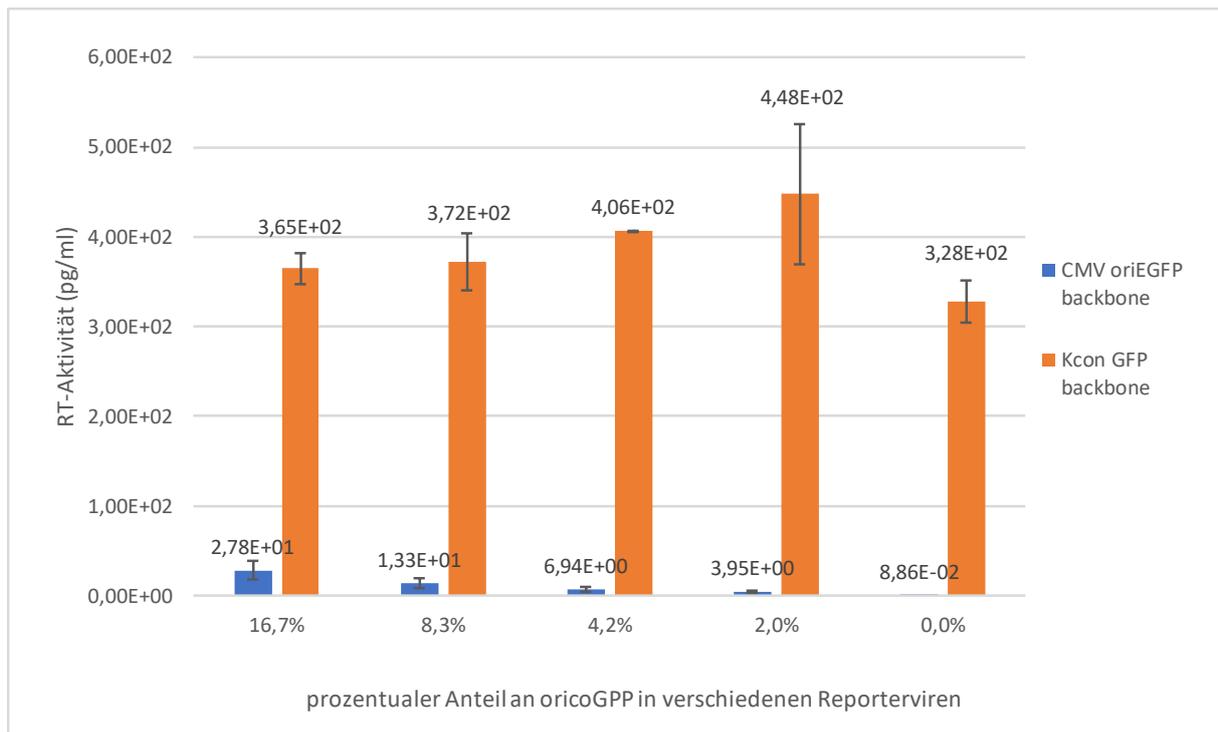


Abb. 17: RT-Aktivität der beiden Reportervirustypen mit variierendem Anteil an zugesetztem oricoGPP. Die angegebenen prozentualen Anteile geben den Anteil an oricoGPP an, welcher in die Transfektion eingesetzt wurde. Aufgefüllt wurde mit dem Leervektor. Alle Reporterviren enthalten zusätzlich die oricoRec und VSV-G Sequenz. Gemessen wurde in Zweifachbestimmung.

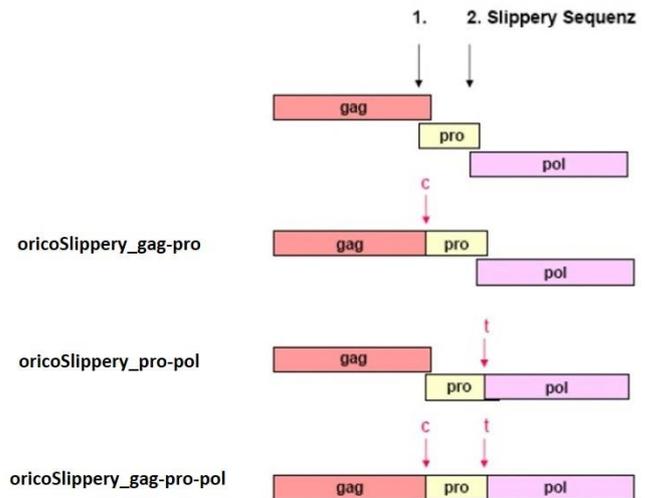
Insgesamt unterscheiden sich die Werte der RT-Aktivität innerhalb der beiden Reportervirussysteme mit variierendem oricoGPP Gehalt nur wenig. Beim oriHERV Reportervirussystem ist mit abfallendem oricoGPP Anteil auch eine sinkende RT-Aktivität zu beobachten. Bei den HERV K_{CON} Reporterviren ist zunächst einmal ein Anstieg der RT-Aktivität zu sehen, welcher jedoch nur sehr leicht ist und den Faktor 1,2 nicht überschreitet bei einem zugesetzten Anteil von 2% oricoGPP. In der Gesamtheit der getesteten Reporterviren ist wiederum ersichtlich, dass die RT-Aktivität der HERV-K_{CON} Reporterviren höher liegt als die der oriHERV Reporterviren.

Die Ergebnisse des oricoGPP-Titrationsexperimentes betrachtend wurde für die weiteren Versuche festgelegt, dass der übliche Anteil von 16,7% oricoGPP bei Transfektionen beibehalten wird.

4.1.2 Generierung und Charakterisierung der Slippery Site Mutanten-VLPs

Die Translation der für den Viruszusammenbau und die Replikation unerlässlichen Enzyme Protease und Polymerase ist nur durch ein bzw. zwei ribosomale Leserahmenverschiebungen an den *Slippery* Sequenzen möglich. Dadurch ist auch das Verhältnis der Proteine zum Gag Vorläuferprotein und den daraus prozessierten funktionellen Proteinen ungleich. Durch Mutation einer der beiden bzw. beider *Slippery* Sequenzen wurden mutierte oricoGPP Plasmide konstruiert, welche zur Produktion der Slippery Site Mutanten Reporterviren (= VLPs, *virus-like particles*) eingesetzt wurden.

Für die Erzeugung der Slippery Site Konstrukte wurde in die originale oricoGPP Sequenz jeweils ein Nukleotid in die Slippery Sequenz eingefügt, um dann eine vollständige Translation des jeweiligen Vorläuferproteins zu erreichen. Es wurden insgesamt drei verschiedene Slippery Site Konstrukte mithilfe des Multi Site-directed Mutagenesis Kit konstruiert.



nach C. Chudak, 2008

Abb. 18: schematische Darstellung der Konstruktion der Slippery Site Konstrukte. Der rote Pfeil kennzeichnet die Mutation, d.h. die Insertion eines zusätzlichen Nucleotids in die Slippery Sequenz. c = Cytosin, T = Thymin. Gag-Protein (gag), Protease (pro), Polymerase (pol). Abbildung nach C. Chudak, Diplomarbeit (2008)

Durch Insertion eines zusätzlichen Cytosins in die Slippery Sequenz entstand das oricoSlippery_gag-pro Konstrukt, welches ein vollständiges Gag-Protease Vorläuferprotein exprimieren kann ohne Leserahmenverschiebung. Das oricoSlippery_pro-pol Konstrukt wurde durch Insertion eines Thymidins in die zweite Slippery Sequenz so mutiert, dass die Translation eines Protease-Polymerase Fusionsproteins nach einer Leserahmenverschiebung möglich ist. Zuletzt wurde eine Doppelmutante (oricoSlippery_gag-pro-pol), welche beide Mutationen gleichzeitig enthält, erstellt. Bei diesem ist eine Translation des kompletten Gag-Pro-Pol Vorläuferproteins ohne Leserahmenverschiebungen möglich. Die Bestätigung, dass alle Konstrukte die gewünschten Baseninsertionen enthielten, wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierungen erbracht.

Zunächst einmal wurde die zelluläre Expression der Slippery Site Konstrukte im Western Blot untersucht. Dazu wurden 293T Zellen nur mit den verschiedenen mutierten oricoGPP Plasmiden transfiziert; als Kontrolle wurden ebenfalls die originalen oricoGPP Plasmide sowie der pcDNA4 Leervektor transfiziert. Nach Einbringen in die Zellen erfolgte die zelluläre Expression der jeweiligen Proteine bzw. Vorläuferproteine. Nach 48 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen und die Zellyse, woraufhin die in den Zellen exprimierten Proteine extrahiert wurden. Diese Proteinextrakte wurden in den Western Blot eingesetzt.

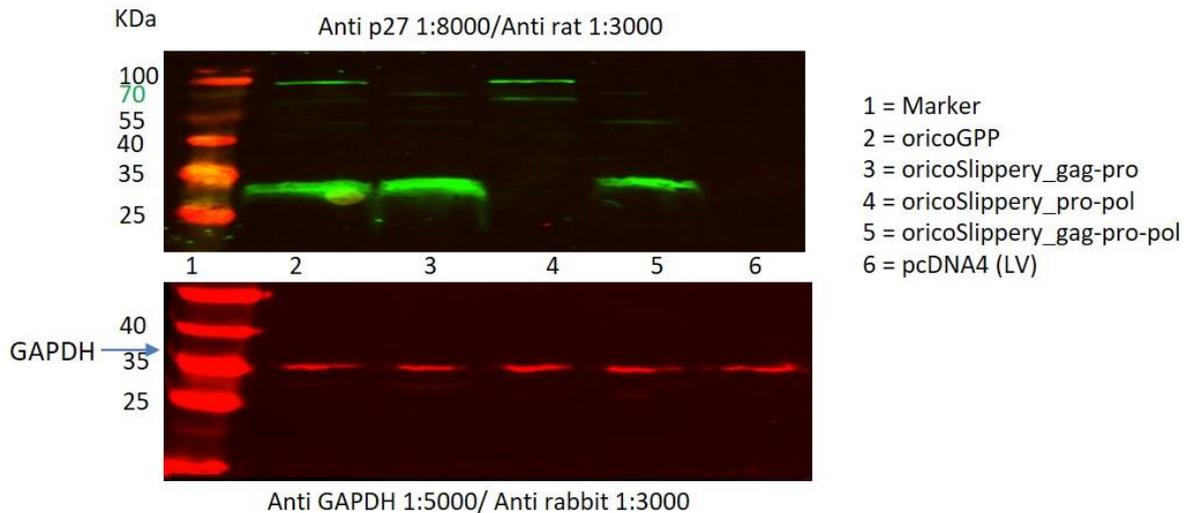


Abb. 19: zelluläre Expression der verschiedenen Gag-Vorläuferproteine. Aufgetragen wurden Zelllysate von HEK 293T Zellen transfiziert mit dem Ausgangskonstrukt oricoGPP (2), den Slippery Site Konstrukten oricoSlippery_gag-pro (3), oricoSlippery_pro-pol (4) und oricoSlippery_gag-pro-pol (5) sowie, zur Kontrolle, mit dem pcDNA4 Leervektor (6). Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem primären rat α -p27 Antikörper sowie dem sekundären α -rat (green) Antikörper. Im unteren Bild ist als Referenz GAPDH dargestellt.

In Spur 2 wurde das Zelllysate der mit oricoGPP transfizierten Zellen aufgetragen. Hier kann man deutlich eine kräftige Bande bei 27 kDa sowie 95 kDa erkennen, außerdem sind schwache Banden bei ca. 55 kDa und ca. 65 - 70 kDa zu erkennen. Bei der 27 kDa Bande handelt es sich um das prozessierte p27 Protein (Capsid Protein). Die Bande bei ca. 70 kDa stellt das Gag-Vorläuferprotein dar, wohingegen mit ca. 95 kDa das Gag-Pro Vorläuferprotein exprimiert wird. In Spur 3 ist das Zelllysate der mit dem gag-pro mutierten Slippery Konstrukt transfizierten Zellen aufgetragen. Ebenso ist hier eine starke Bande bei 27 kDa, sowie schwächere Banden bei 54 kDa und 70 kDa zu erkennen. Die Spur 4 zeigt das Expressionsmuster der Proteine der in der Pro-Pol Slippery Sequenz mutierten Konstrukte. Erkennbar sind hier ebenfalls die Banden bei 70 und 95 kDa, jedoch ist hier keine p27 Bande zu sehen. Spur 5 zeigt die Expression der Proteine des doppelt mutierten Konstruktes oricoSlippery_gag-pro-pol. Hier ist wieder die Bande bei 27 kDa, sowie die schwächeren Banden bei 54 und 70 kDa zu sehen. In der letzten Spur, wo das Zelllysate der mit dem Leervektor transfizierten Zellen als Kontrolle aufgetragen wurde, sind keine Banden zu sehen.

Die Mutationen in der oricoGPP Sequenz mutierter Reporterviren führen zu einer Verschiebung des Verhältnisses der exprimierten Proteine, was unter anderem Auswirkungen auf die Virusmorphologie und die Reverse Transkription haben kann. Dies wurde in den folgenden Experimenten, im Vergleich zu nicht-mutierten Reporterviren, untersucht.

Um Slippery Site Mutanten-Reporterviren zu produzieren, wurde nach dem gewohnten Transfektionsprotokoll vorgegangen, mit der Ausnahme, dass anstatt des oricoGPP Plasmids eines der Slippery Site Konstrukte als Packaging-Plasmid hinzugegeben wurde. Die so produzierten Reporterviren wurden anschließend entsprechend ihrer RT-Aktivität und ihres p27 Gehaltes charakterisiert. In der folgenden Abbildung ist der Effekt der mutierten oricoGPP Sequenzen auf die RT-Aktivität der Reporterviren zu sehen.

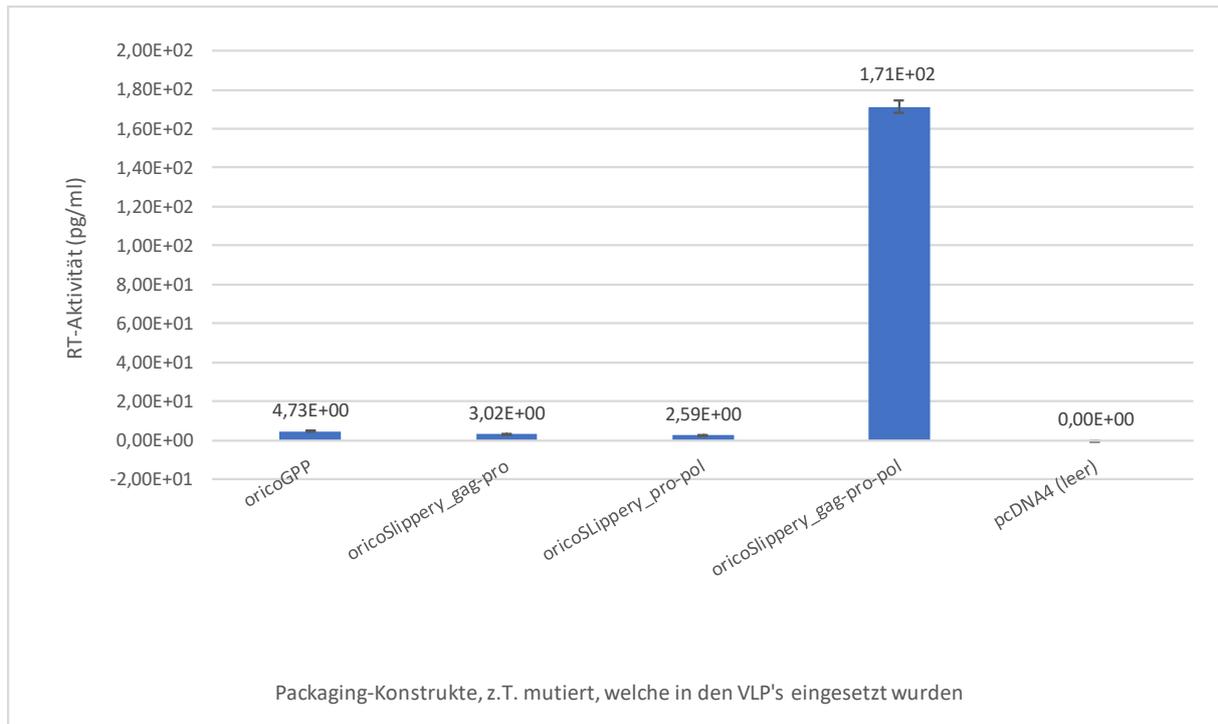


Abb. 20: RT-Aktivität der Reportervirus-Partikel (VLPs) mit Mutationen in den Slippery Sequenzen. Die Reporterviren enthalten zusätzlich das CMV oriEGFP backbone, oricoRec und VSV-G. Zum Vergleich dienen oriHERV Reporterviren (ohne Mutationen), sowie Reporterviren ohne zugesetztem oricoGPP (pcDNA4 Leervektor). Gemessen wurde in Zweifachbestimmung. VLPs = virus-like particles/ Virusähnliche Partikel

Innerhalb des oriHERV Reportervirussystems zeigen die Partikel, welche eine Doppelmutation in ihren Slippery Sequenzen tragen (oricoSlippery_gag-pro-pol Mutanten) eine erhöhte RT-Aktivität. Gegenüber den normalen oriHERV Reporterviruspartikeln, welche hier mit 4,73 pg/ml gemessen wurden, zeigen die Doppelmantanten-VLPs eine um das 36-fache gesteigerte RT-Aktivität. Gleichzeitig ist jedoch bei den anderen Mutanten-VLPs keinerlei Anstieg in der RT-Aktivität zu beobachten. Die Virusüberstände der Negativkontrolle (pcDNA4 Leervektor) wiesen keine RT-Aktivität auf.

Mithilfe des p27 Antigen-Capture ELISA konnte der p27 Gehalt der Virusüberstände, welche die Slippery Site Mutanten-Reporterviren enthielten, gemessen werden. Die Mutationen im Gag-Pro-Pol Bereich könnten ebenso Einfluss auf die Capsid-Proteine haben. Im folgenden Diagramm sind die p27 Konzentrationen, die in den jeweiligen Virusüberständen gemessen worden sind, dargestellt.

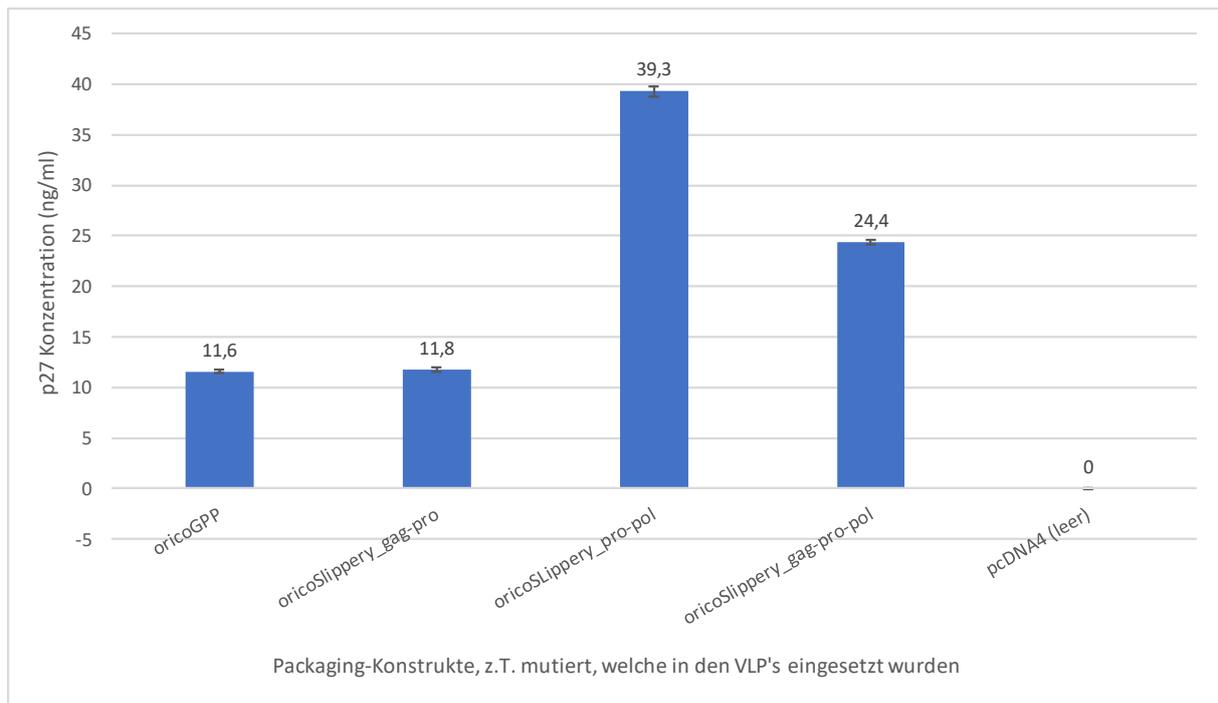


Abb. 21: p27 Gehalt der Slippery Site Mutanten VLPs. Gemessen wurde in Zweifachbestimmung. Die Reporterviren enthalten zusätzlich das CMV oriEGFP backbone, oricoRec und VSV-G. Zum Vergleich dienen oriHERV Reporterviren (ohne Mutationen), sowie Reporterviren ohne zugesetztem oricoGPP (pcDNA4 Leervektor).

Anders als bei der RT-Aktivität weist nun die Pro-Pol Slippery Site Mutante einen erhöhten Wert auf. Dieser liegt mit 39,3 ng/ml um ein etwa dreifaches höher als der der normalen oriHERV Reporterviruspartikel. Mit 24,4 ng/ml liegt auch der p27 Gehalt der Doppelmantel-VLPs höher als die Kontrolle, wobei der p27 Gehalt der Gag-Pro Mutante auf dem gleichen Level wie der des oriHERV Reportervirus liegt.

Optimierung des Anteils an Slippery Site Konstrukt zu oricoGPP: Pro-Pol Titration

Erwünscht ist für die Reporterviren eine optimale Steigerung der RT-Aktivität zusammen mit einer hohen Anzahl Viruspartikel. In früheren Arbeiten, in denen in einem Vollängenmoleklarklon die jeweiligen Mutationen eingeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Gag-Pro-Pol Slippery Site Mutante durch das große unprozessierte Protein das Ausknospen der Viruspartikel aus der Zelle verhindert. Daher wurde für den nächsten Versuch nur auf die Pro-Pol Slippery Site Mutante zurückgegriffen. Eine Möglichkeit um den Gehalt an RT und die Anzahl der Viruspartikel zu beeinflussen ist eine Mischung des jeweiligen Slippery Site Konstrukts mit dem originalen oricoGPP Konstrukt. Die Pro-Pol Slippery Mutante wurde für die Transfektion in HEK 293T Zellen zusammen mit dem oricoGPP-Konstrukt titriert, sodass der Anteil am Pro-Pol Slippery Site Konstrukt über mehrere Stufen abfiel während der Anteil an oricoGPP Konstrukt stieg. Als Reportervirussystem wurden hierbei wieder beide Systeme, das oriHERV sowie das HERV K_{CON}-Reportervirussystem, verwendet, um einen weiteren Vergleich zu haben.

Die Transfektion erfolgte mit dem jeweiligen Backbone (oriEGFP bzw. K_{CON}-GFP) und den für die Virusproduktion benötigten Konstrukten oricoRec und VSV-G. Nach der Ernte der so produzierten Virusüberstände wurde von einem Teil dieser die cDNA aus der zuvor extrahierten RNA synthetisiert. Zur Ermittlung der vRNA Kopienzahlen in den jeweiligen Virusüberständen wurde die synthetisierte cDNA in die HERV-spezifische real-time PCR

eingesetzt. Im folgenden Diagramm sind die cDNA Kopien der verschiedenen Reporterviren/ Virusähnlichen Partikel dargestellt. Gemessen wurde in Dreifachbestimmung.

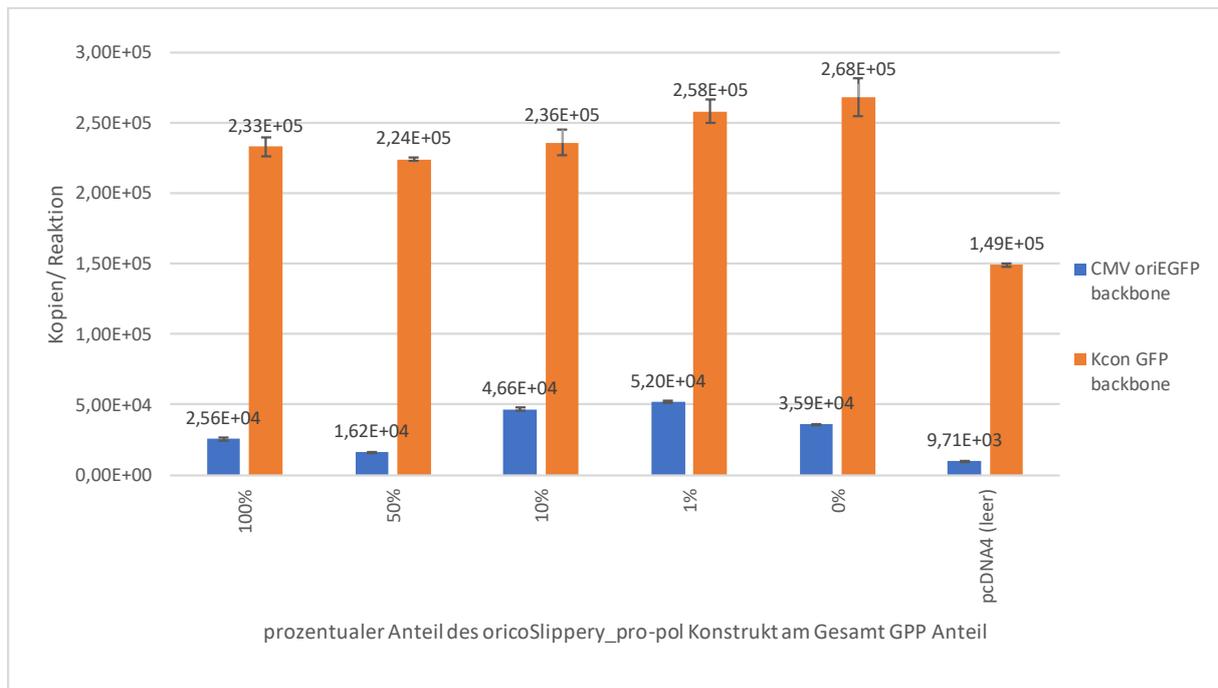


Abb. 22: Anzahl der cDNA Kopien in VLPs mit unterschiedlichen Anteilen der Pro-Pol Slippery Site Mutante zum Gesamtanteil von GPP. Der restliche Anteil wurde mit dem oricoGPP Konstrukt aufgefüllt. Von links nach rechts sinkt der Anteil an zugesetztem Pro-Pol Slippery Site Konstrukt, während der Anteil von oricoGPP steigt. An letzter Position enthalten die VLPs anstatt oricoGPP oder dem mutierten Konstrukt den pcDNA4 Leervektor. Zum Vergleich stehen die beiden Reportervirussysteme oriHERV und HERV K_{CON}. Gemessen wurde in Zweifachbestimmung.

Insgesamt ist wieder ein Unterschied in der Menge der vRNA Kopien zwischen den beiden Reportervirussystemen erkennbar. VLPs, welche das K_{CON}-GFP Backbone tragen, weisen bis zu einer Log-Stufe mehr Kopien pro Reaktion auf als jene mit oriEGFP Backbone. Bei HERV K_{CON} Reporterviren mit normalem oricoGPP sind mit $2,68 \times 10^5$ Kopien die meisten vRNA Kopien pro Reaktion messbar, während bei oriHERV die meisten Kopien bei einem Anteil von 1% der mutierten Sequenz zum originalen oricoGPP detektiert wurden. Allerdings sind jedoch innerhalb der einzelnen Reportervirussysteme keine großen Unterschiede in der Anzahl der vRNA Kopien mit der Titration des Pro-Pol Slippery Site Konstruktes zu beobachten. Allein die Partikel ohne zugesetztem oricoGPP sinken in der Anzahl der gemessenen vRNA Kopien etwas ab.

Zur Ermittlung der RT-Aktivität der verschiedenen VLPs wurde abermals ein PERT-Assay durchgeführt, in den die einzelnen Virusüberstände eingesetzt wurden.

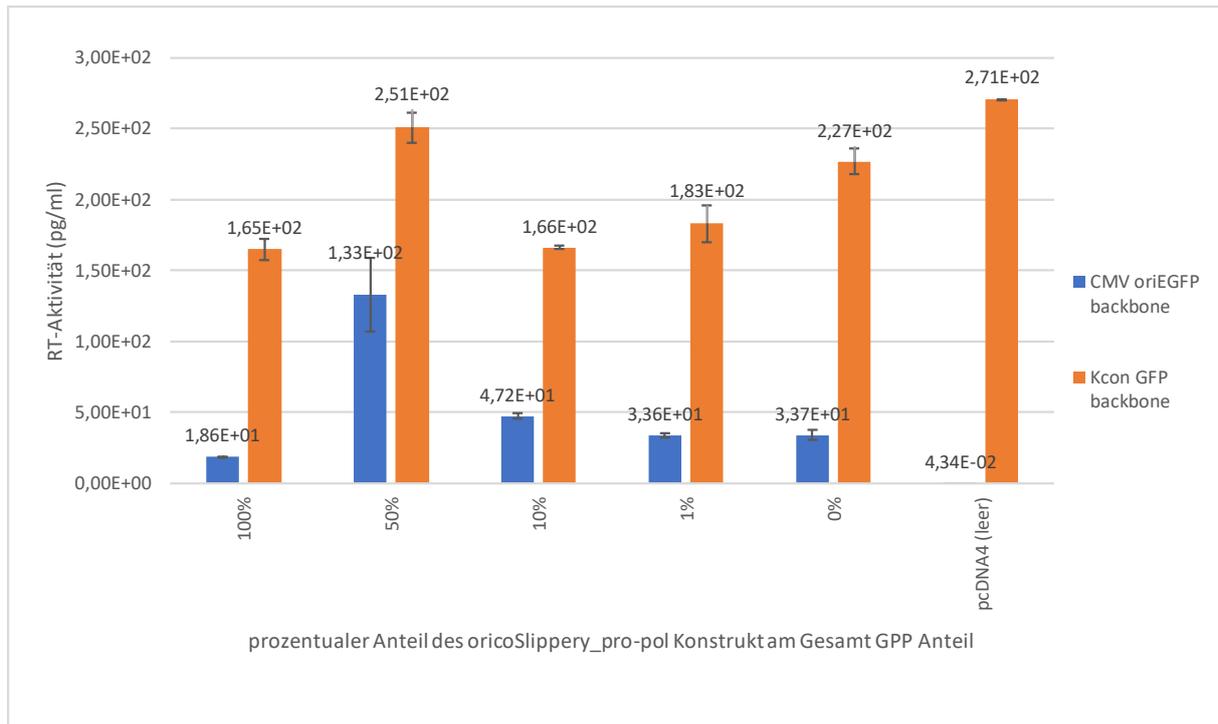


Abb. 23: RT-Aktivität der VLPs mit unterschiedlichen Anteilen der Pro-Pol Slippery Site Mutante zum Gesamtanteil von GPP. Der restliche Anteil wurde mit dem oricoGPP Konstrukt aufgefüllt. Von links nach rechts sinkt der Anteil an zugesetztem Pro-Pol Slippery Site Konstrukt, während der Anteil von oricoGPP steigt. An letzter Position enthalten die VLPs anstatt oricoGPP oder dem mutierten Konstrukt den pcDNA4 Leervektor. Zum Vergleich stehen die beiden Reportervirussysteme oriHERV und HERV KCON. Gemessen wurde in Zweifachbestimmung.

Betrachtet man zunächst einmal die RT-Aktivität der verschiedenen oriEGFP backbone-enthaltenen VLPs, so war ein maximaler Wert mit 133 pg/ml bei den Partikeln zu messen, welche zu gleichen Teilen das mutierte oricoSlippery_pro-pol Konstrukt wie das originale oricoGPP Konstrukt enthielten. Auch bei den HERV K_{CON} Reporterviren konnte in diesem Verhältnis ein etwas höherer Wert gemessen werden, jedoch unterscheiden sich die Werte insgesamt nicht deutlich voneinander, zumal bei diesem Reportervirussystem die höchste RT-Aktivität ohne zugesetztem (mutierten oder nicht mutiertem) GPP messbar war.

Zuletzt wurden die Virusüberstände dieses Versuchs in den p27 ELISA eingesetzt, um die Konzentration des p27 Capsid-Proteins in den verschiedenen VLPs zu messen. Dies ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

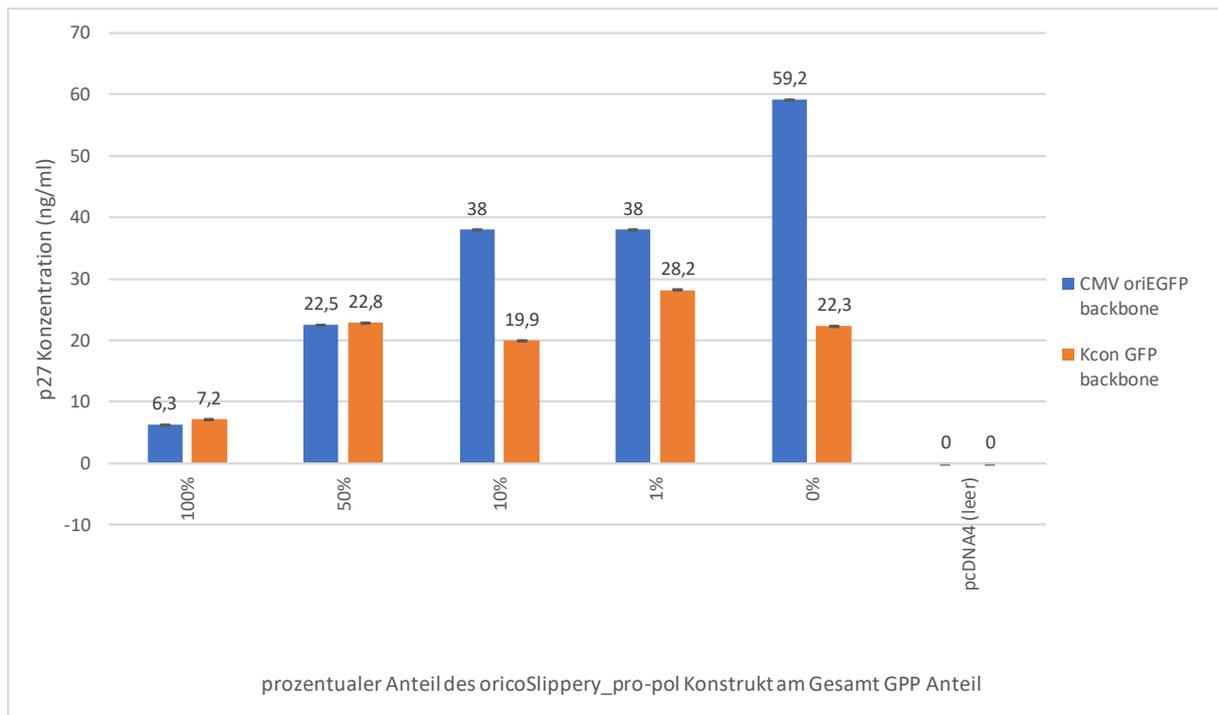


Abb. 24: p27 Gehalt der VLPs mit unterschiedlichen Anteilen der Pro-Pol Slippery Site Mutante zum Gesamtanteil von GPP. Der restliche Anteil wurde mit dem oricoGPP Konstrukt aufgefüllt. Von links nach rechts sinkt der Anteil an zugesetztem Pro-Pol Slippery Site Konstrukt, während der des oricoGPP Konstrukt ansteigt. An letzter Position enthalten die VLPs anstatt oricoGPP oder dem mutierten Konstrukt den pcDNA4 Leervektor. Zum Vergleich stehen die beiden Reportervirussysteme oriHERV und HERV K_{CON}. Gemessen wurde in Zweifachbestimmung.

Die höchste p27 Konzentration war hierbei bei den oriHERV VLPs messbar, welche allein das oricoGPP Konstrukt als Verpackungsplasmid enthielten. Je mehr Anteil des mutierten Pro-Pol Slippery Konstruktes hinzugefügt wurde, desto weniger Capsid-Protein wurde in diesem System gebildet. Auch bei den K_{CON}-VLPs ist der geringste p27 Gehalt bei den Partikeln messbar, welche ausschließlich das mutierte Pro-Pol Slippery Site Konstrukt als Verpackungskonstrukt enthielten. Mit reduziertem Anteil am mutierten GPP steigt der p27 Gehalt etwas an, verändert sich weiterhin jedoch nicht signifikant. In den Partikeln ohne zugesetztem GPP war kein p27 Protein detektierbar.

Die Titration des mutierten oricoSlippery_pro-pol Konstrukts mit dem originalen oricoGPP Konstrukt in oriHERV bzw. HERV K_{CON} Reporterviren zum Ermitteln eines optimalen GPP-Konstrukts erbrachte keine konsistenten Ergebnisse. Demzufolge wurde beschlossen, die mutierten Slippery Site Konstrukte nicht für die Infektionsversuche zu verwenden und stattdessen bei den Reporterviren zu bleiben, welche das ursprüngliche oricoGPP enthielten.

4.1.3 Charakterisierung der Viren für Infektionsversuche

Während der zuvor gezeigten Charakterisierungsversuche stellten sich die K_{CON} + oricoGPP Reporterviren als am vielversprechendsten für Infektionsversuche heraus. Dennoch sollten auch die oriHERV Reporterviren für die Infektionen eingesetzt werden, um die beiden Systeme weiterhin, auch im Infektionsverhalten, vergleichen zu können.

Vergleichend zu den HERV Reporterviren sollten zwei weitere Beta-Retroviren bzw. auf Beta-Retroviren-basierende Viruspartikel in die Infektionen eingesetzt werden. Zum einen war dies

JSRV, welches als Vollängenmolekularklon (pCMV2JS₂₁) vorlag⁸ und in HEK 293T Zellen zur Virusproduktion transfiziert wurde (s. Abb. 25b). Des Weiteren sollte das zu HERV-K eng verwandte MMTV in die Infektionsversuche eingesetzt werden. Ähnlich wie die HERVs lag dieses in einem Reportervirusystem bestehend aus vier verschiedenen Vektoren vor⁹. Auch dieses System basiert auf einem Transfervektor, welcher Teile des viralen Genoms, das Verpackungssignal ψ und eine CMV getriebene EGFP Kasette trägt; einem Packaging-Konstrukt, was zusätzlich die Gene *gag*, *pro* und *pol* enthält, sowie auf einem Rev-kodierenden und einem VSV-G Env kodierenden Plasmid. Dieses auf MMTV basierte Vektorsystem ist in Abbildung 25a dargestellt.

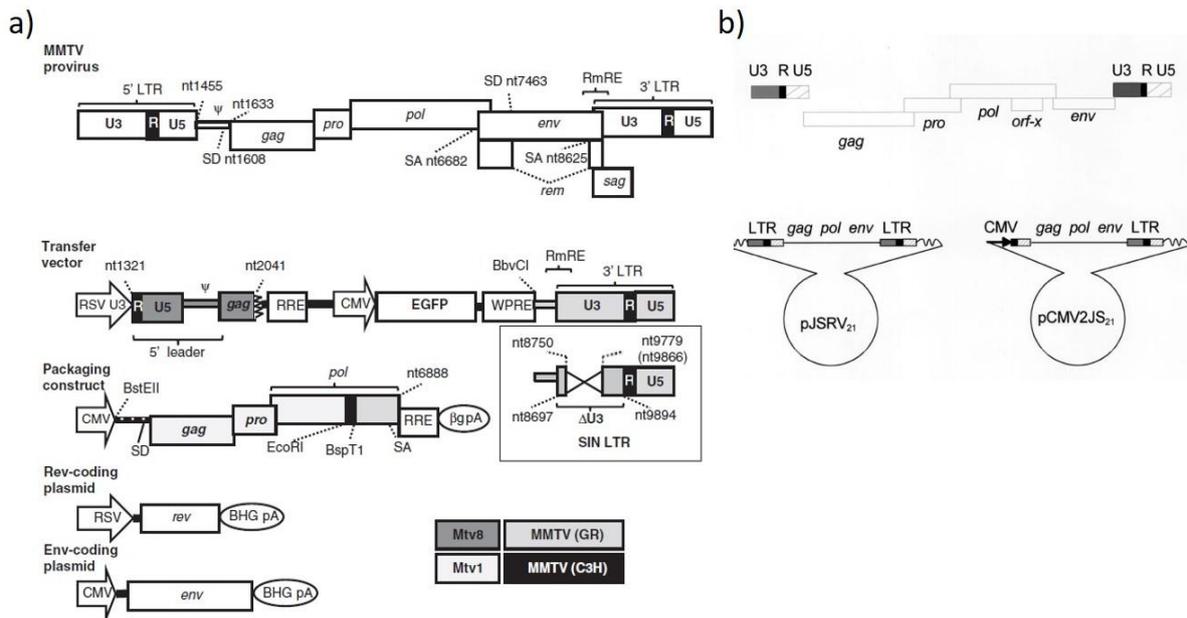


Abb. 25: a) schematische Darstellung des MMTV Provirus sowie des Vektorsystems bestehend aus vier Plasmiden. Der Transfer Vektor (pRRpCeGFPWPRES25) enthält, umschlossen von der 5' leader-Sequenz und der 3'LTR-Region, das gekürzte *gag*-Gen gefolgt von dem Rev responsive element (RRE) von HIV-1 und einem internen CMV-Promotor, welcher die Expression des dahinterliegenden EGFP-Gens vorantreibt. Das posttranskriptionale Element des Woodchuck Hepatitis Virus (WPRES) ist upstream des 3'LTR ebenfalls enthalten. Das Packaging Konstrukt enthält die genetischen Elemente, welche für die Bildung eines Viruspartikels vonnöten sind (*gag*, *pro*, *pol*). Ebenfalls enthält das Konstrukt downstream ein RRE Element sowie ein Betaglobin Polyadenylierungssignal (β g pA). Weiterhin enthält das Vektorsystem ein Rev-kodierendes Plasmid (pLP2) und ein Env-kodierendes Plasmid (VSV-G Env). b) JSRV Vollängenkonstrukt pCMV2JS₂₁, bei welchem die U3 Region des 5'LTR durch einen CMV Promoter ersetzt wurde.

Zur Produktion von MMTV Reporterviren wurden diese vier Plasmide in definiertem Verhältnis zueinander in HEK 293T Zellen ko-transfiziert.

Um ausreichend Virusmaterial für die Infektionsversuche zur Verfügung zu haben, wurden die jeweiligen (Reporter-) Viren im größeren Maßstab durch Transfektion von HEK 293T Zellen produziert. Nach Ernte der Virusüberstände wurden diese hinsichtlich ihrer RT-Aktivität mittels PERT-Assay charakterisiert. Dargestellt sind in Abbildung 26 die Ergebnisse der RT-Aktivitätsmessung von zwei Transfektionsrunden; also von Virusüberständen, die in zwei aufeinanderfolgende Infektionen eingesetzt werden sollten.

⁸ Palmarini et al. (1999)

⁹ Konstantoulas and Indik (2014)

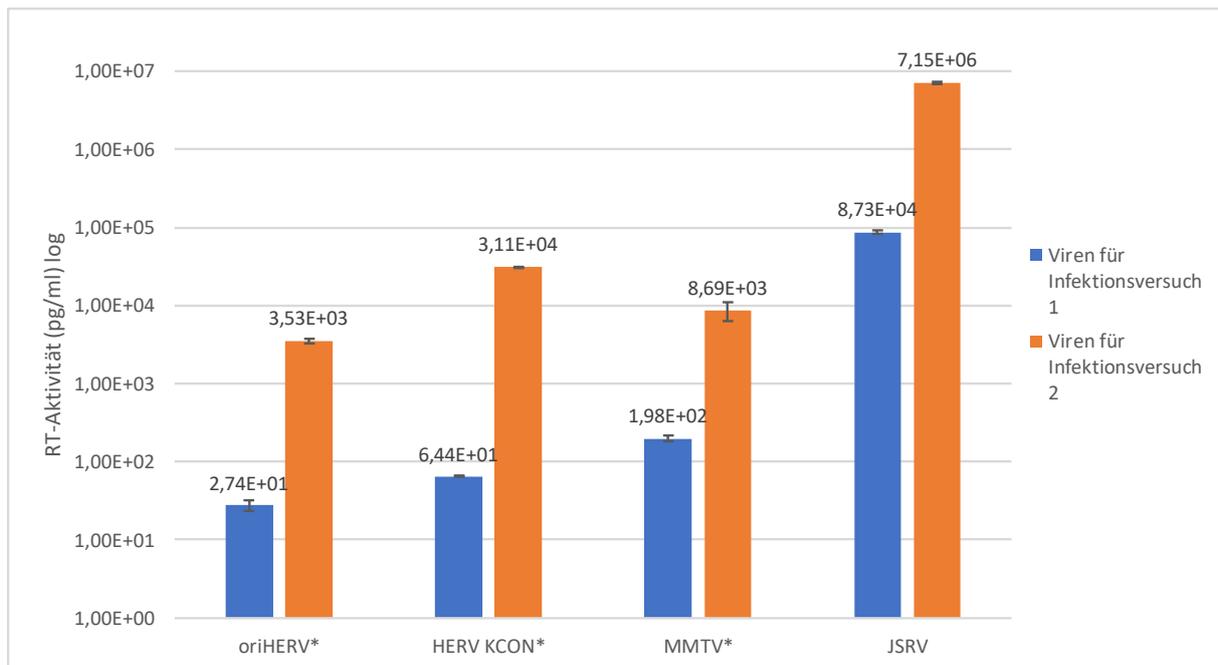


Abb. 26: logarithmische Darstellung der RT-Aktivität der für die Infektionsversuche eingesetzten Virusüberstände. Die mit dem (*) gekennzeichneten Viren sind Reporterviren; JSRV besitzt kein Reporter gen. Gemessen wurde in Zweifachbestimmung. Dargestellt sind die Daten aus zwei verschiedenen Transfektionen.

Hinsichtlich der RT-Aktivität unterscheiden sich die verschiedenen Virusüberstände auffallend. Während die oriHERV VLPs die geringste RT-Aktivität aufweisen, zeigen HERV K_{CON} – und MMTV-VLPs ähnliche Werte in der RT-Aktivität; dahingegen konnte bei den JSRV Partikeln eine weitaus höhere RT-Aktivität nachgewiesen werden. Ob sich die RT-Aktivität der Viren in deren Infektionskompetenz widerspiegelt, wird sich in den Infektionsversuchen zeigen.

Des Weiteren wurde zur Vorbereitung auf die Infektion aus den Virusüberständen die RNA extrahiert und daraus die cDNA synthetisiert. Gleichzeitig mit der cDNA Synthese wurde die RNA auch in den gleichen Ansatz ohne Reverse Transkriptase eingesetzt, um eine -RT Kontrolle zu haben. Diese Proben wurden dann in spezifische real-time PCRs eingesetzt (HERV, MMTV und JSRV PCR), um eventuell noch vorhandene Plasmid-DNA (in den -RT Proben) feststellen zu können. Im folgenden Diagramm sind die Ergebnisse dieser qPCRs zusammengefasst.

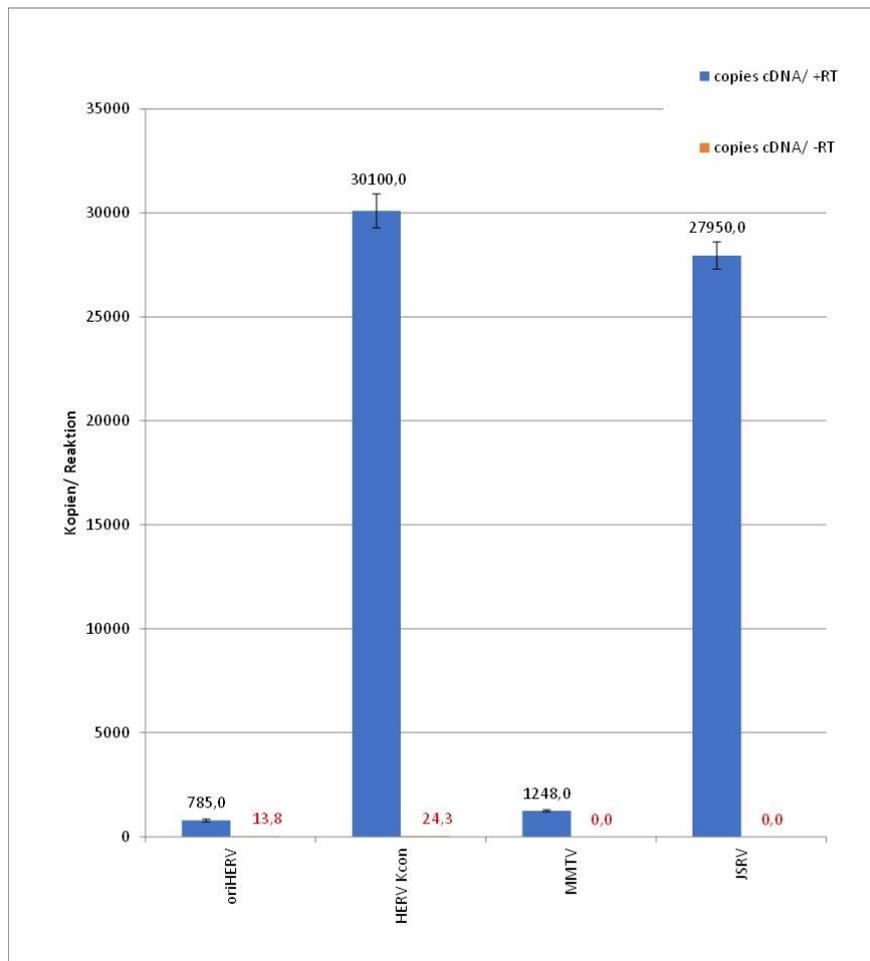


Abb. 27: Anzahl der cDNA Kopien der VLPs, die in den Infektionsversuch eingesetzt werden sollten. In blau sind die cDNA Kopien dargestellt, wohingegen in rot die -RT Kontrollen dargestellt sind. Eventuell verschleppte Plasmide sollten in dieser Kontrolle detektierbar sein. Gemessen wurde in Dreifachbestimmung.

Mit über 30.000 Kopien wurde bei den HERV K_{CON} VLPs die meiste virale RNA in einer Reaktion gemessen. Auch bei den JSRV Partikeln konnten mit knapp 28.000 Kopien pro Reaktion sehr viele vRNA Kopien gemessen werden. Bei den MMTV und oriHERV VLPs konnten nur weitaus weniger Kopien gemessen werden. Das ausschlaggebende dieses Versuches ist, dass bei den -RT Kontrollen keine bzw. bei HERV nur sehr wenige Kopien gemessen wurden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in den Virusüberständen, die in die Infektion eingesetzt werden, keine Plasmidkontamination vorhanden ist.

Zusätzlich zur Messung der RT-Aktivität und der viralen RNA wurde in Vorbereitung auf die Infektion die Infektiosität von MMTV und JSRV gegenüber den Rezipienten-Zellen (CRFK) und HEK 293T Zellen (zum Vergleich) untersucht. Dazu wurden einerseits HEK 293T Zellen und CRFK Zellen mit den VSV-G pseudotypisierten MMTV Reporterviren infiziert; dies geschah in verschiedenen Titrationsstufen. Demgegenüber wurden die gleichen Zelllinien mit HIV-Reporterviren, welche mit dem kodon-optimierten JSRVcoEnv¹⁰ pseudotypisiert waren, ebenfalls in verschiedenen Titrationsstufen infiziert. Zur Kontrolle dienen dabei VSV-G pseudotypisierte HIV-Reporterviren. 48 Stunden nach der Infektion (p.i.) wurden die Zellen geerntet, in Paraformaldehyd fixiert und mittels FACS hinsichtlich der GFP Expression analysiert. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse des FACS dargestellt.

¹⁰ Kodon-optimiertes Env Gen basierend auf dem JS7 strain (GenBank: Y18301)

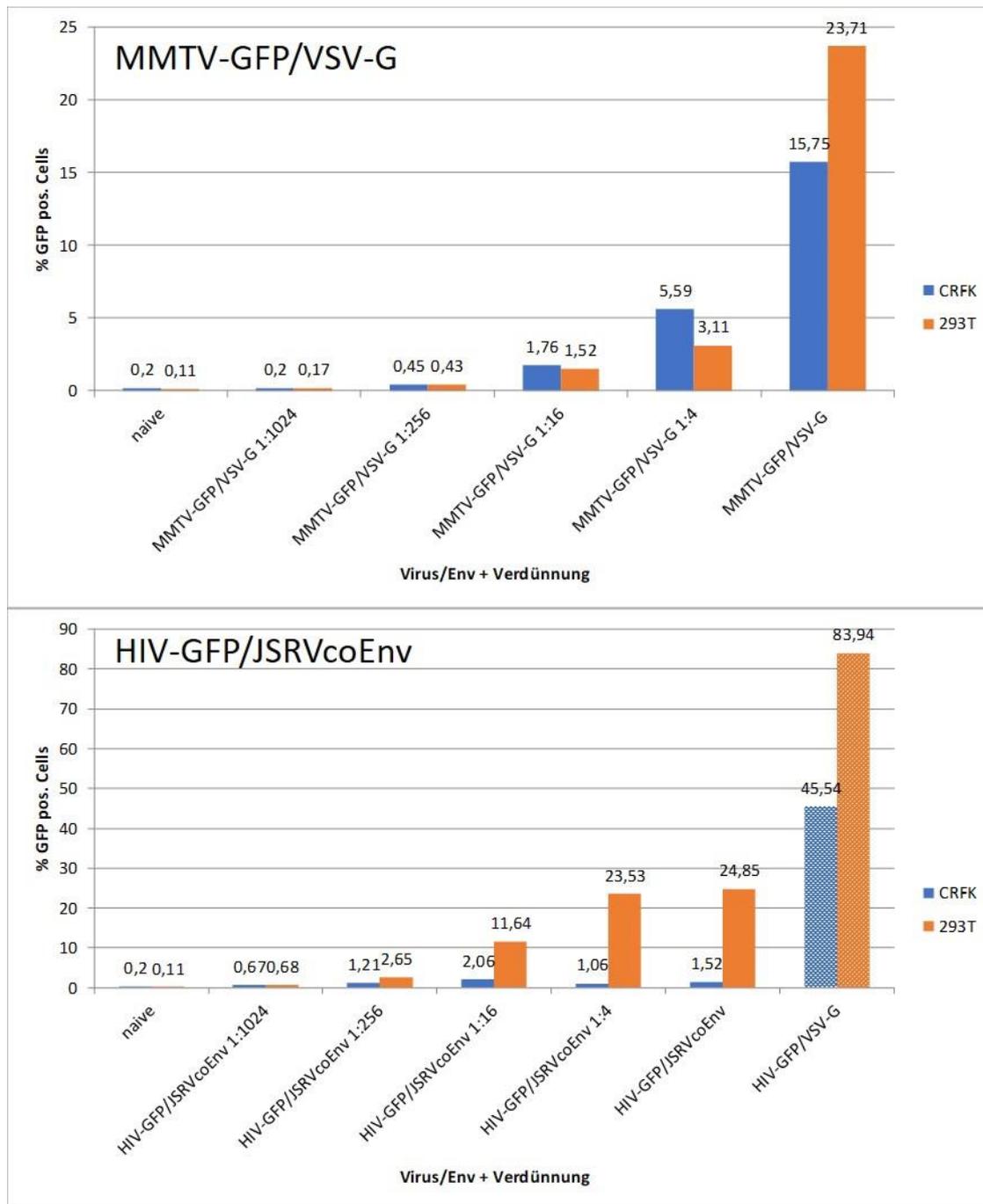


Abb. 28: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden CRFK und HEK 293T Zellen. Der Anteil GFP-exprimierender Zellen entspricht dem der infizierten Zellen. Oben: mit VSV-G pseudotypisierten MMTV Reporterviren infizierte CRFK und HEK 293T Zellen in verschiedenen Titrationsstufen. Unten: mit JSRVcoEnv pseudotypisierten HIV Reporterviren infizierte CRFK und HEK 293T Zellen in verschiedenen Titrationsstufen. Zur Kontrolle dienen hier VSV-G pseudotypisierte HIV Reporterviren, welche die gleichen Zelllinien infizierten. Als Negativkontrolle dienen nicht-infizierte Zellen.

Im oberen Diagramm ist zu sehen, dass 23,71% der mit den MMTV Reporterviren infizierten HEK 293T Zellen tatsächlich infiziert sind und GFP exprimieren. Dahingegen ist bei nur 15,75% der CRFK Zellen eine GFP-Expression messbar, was bedeutet, dass auch nur der Anteil an Zellen mit den MMTV Reporterviren infiziert wurde. Im unteren Diagramm ist die Infektion mit JSRVcoEnv pseudotypisierten HIV-Reporterviren zu sehen. Dabei konnten im Fall von HEK 293T Zellen nur 24,85% der Zellen infiziert werden, und von den CRFK Zellen konnten lediglich 1,52% infiziert werden. Im Vergleich dazu zeigten knapp 84% der HEK 293T

Zellen und 45,5% der CRFK Zellen GFP Expression und damit eine Infektion mit VSV-G pseudotypisierten HIV-Reporterviren.

4.1.4 Etablierung von MMTV- und JSRV-real-time PCR Systemen

Um später die extrahierte gDNA aus den infizierten Zellen auf die verschiedenen RT-Produkte mittels real-time PCR untersuchen zu können, werden spezielle Primer-Sonden Kombinationen benötigt. Für HERV wurden diese im Voraus in der Arbeitsgruppe etabliert; für MMTV und JSRV jedoch mussten die verschiedenen Primer-Sonden Kombinationen erst entworfen und etabliert werden. Das Designen der einzelnen Primer und dazugehörigen Sonden geschah in Anlehnung an das Protokoll von Mbisa *et al.* (2009), in welchem der Prozess der Detektion der verschiedenen RT-Produkte für HIV-1 beschrieben ist. In den folgenden Abbildungen sind die Positionen der Primer und Sonden für die verschiedenen zu untersuchenden RT-Produkte bei MMTV und JSRV dargestellt. Bei MMTV beziehen sich die Positionen auf das verwendete Transfer Plasmid (pRRCMVeGFPwPRE25¹¹) und bei JSRV auf die komplette Genomsequenz von JSRV (GenBank: NC_001494¹²).

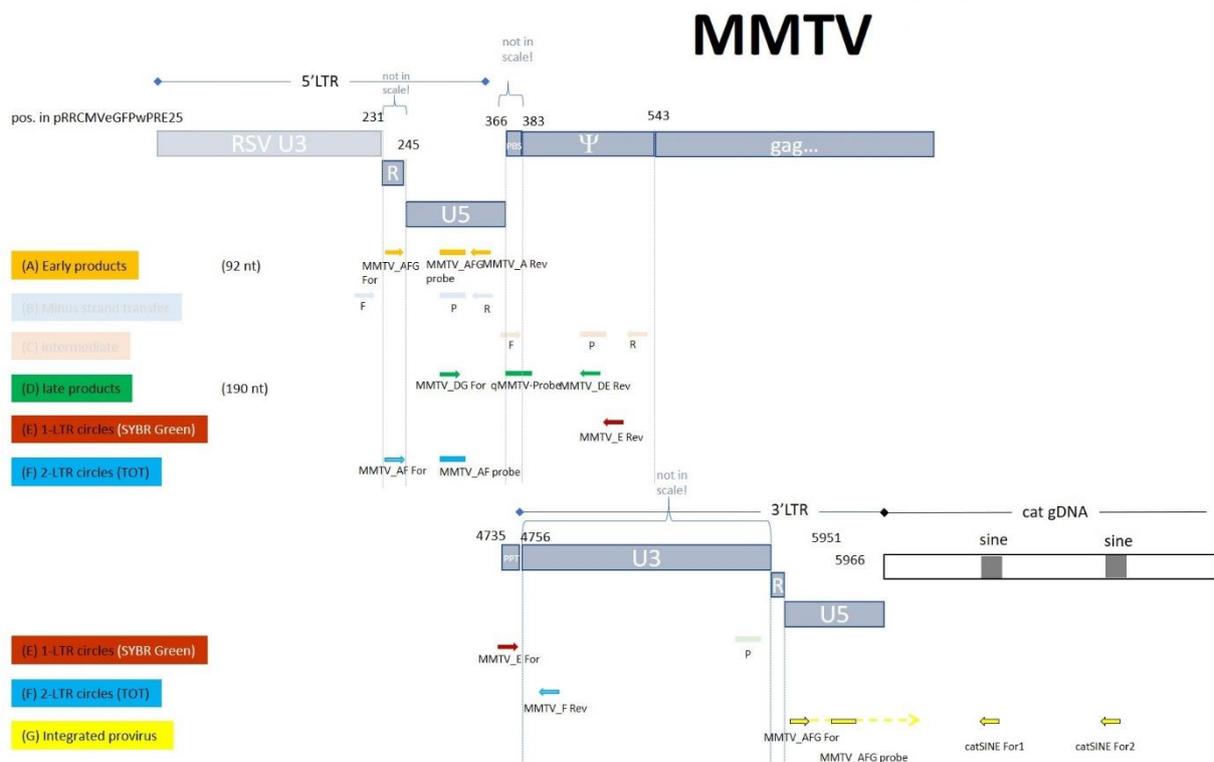


Abb. 29: Primerdesign MMTV; Positionen der Primer für die Primer-Sets A (early Produkte), D (late Produkte), E (1-LTR circles), F (2-LTR circles) und G (integriertes Provirus). Die Primer Sets B und C wurden im Originalprotokoll bei HIV-1 verwendet, hier jedoch zunächst nicht.

¹¹ Konstantoulas and Indik (2014)

¹² York et al. (1992)

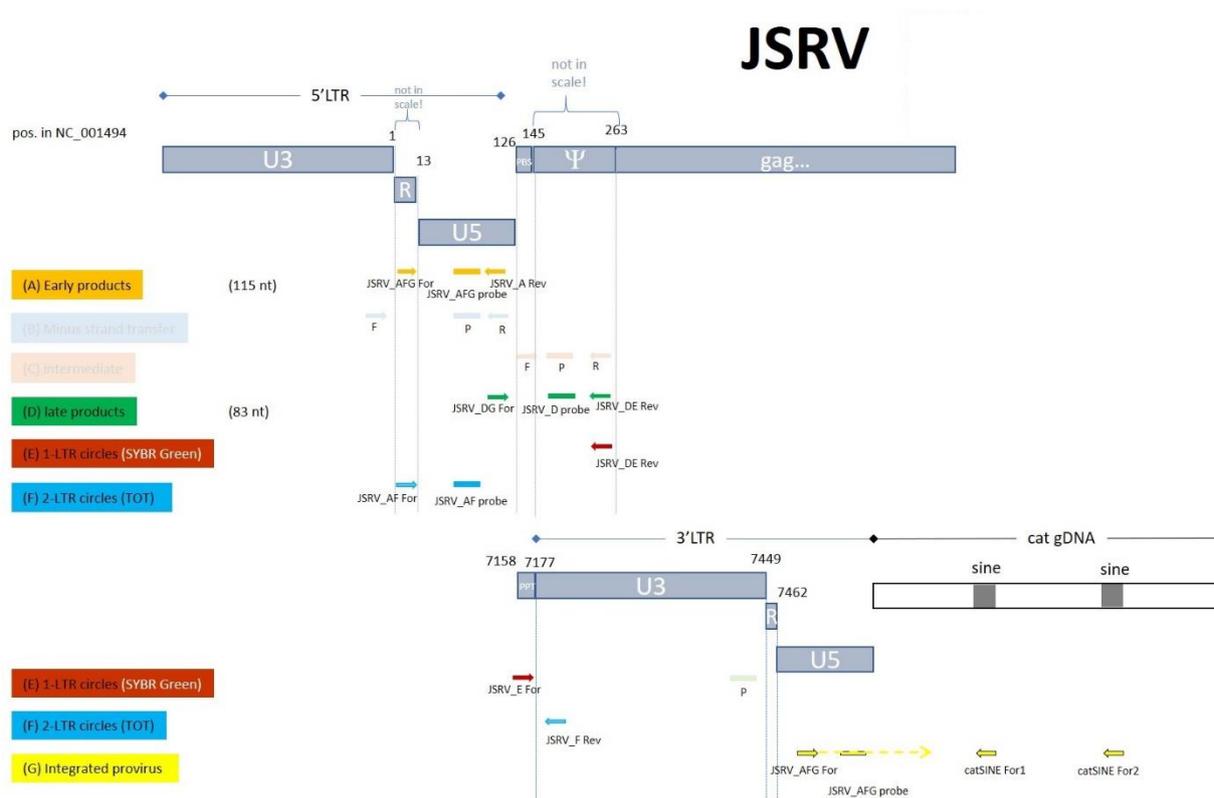


Abb. 30: Primerdesign JSRV; Positionen der Primer für die Primer-Sets A (early Produkte), D (late Produkte), E (1-LTR circles), F (2-LTR circles) und G (integriertes Provirus). Die Primer Sets B und C wurden im Originalprotokoll bei HIV-1 verwendet, hier jedoch zunächst nicht.

Die Primer-Sets A, D, F und G wurden zunächst einmal in einer PCR getestet. Dabei wurden je 0,98 ng des MMTV Transfervektors bzw. JSRV-Plasmids als Template eingesetzt. Da später die viralen Sequenzen in der CRFK gDNA detektiert werden sollen, wurden die Templates hier mit je 150ng CRFK gDNA versetzt als Background. Als Positivkontrolle diente catGAPDH, welches mittels passendem Primer-Set (catGAPDH 44 For/ catGAPDH 45 Rev) amplifiziert wurde und als interne Kontrolle auf die Integrität der gDNA diente. Die Annealing-Temperatur wurde zunächst auf 54°C gesetzt. Im Anschluss an die PCR wurden die Produkte ihrer Größe nach in einem 1,7 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 31 ist das Agarosegel zu sehen.

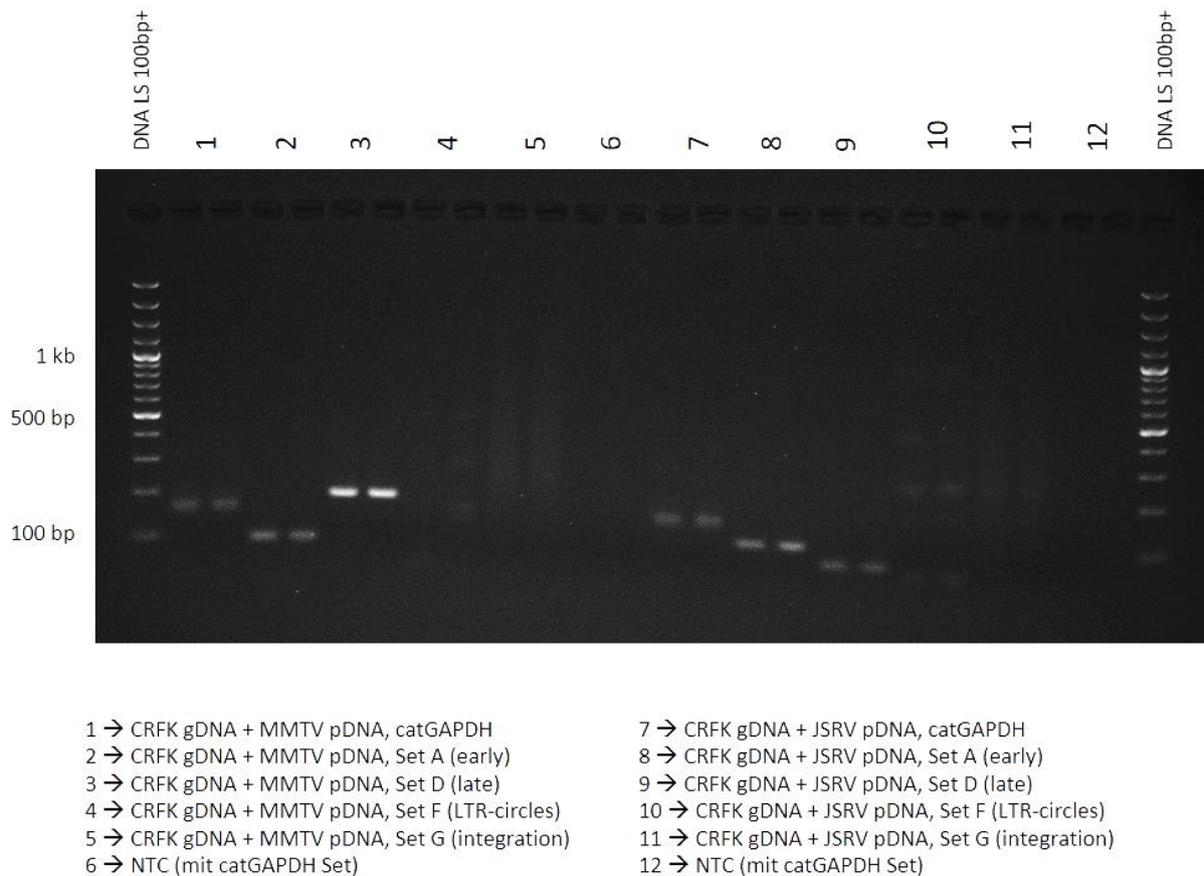


Abb. 31: Agarosegel mit den aufgetrennten Produkten der Test-PCR für die verschiedenen MMTV und JSRV Primer-Sets. Als Template dienten die jeweilige Plasmid DNA sowie als Background CRFK gDNA. Aufgetragen wurden die Proben als Duplikate.

In der ersten und 7. Spalte sind bei ca. 170 bp die Banden der felines GAPDH zu erkennen. Auch die Produkte, die mit dem Primer Set A amplifiziert wurden, sind bei MMTV (Spalte 2) mit 92 bp und JSRV (Spalte 8) mit 115 bp als Banden erkennbar. Weiterhin sind die Banden der Produkte des Primer Sets D für MMTV bei 190 bp (Spalte 3) und für JSRV bei 83 bp erkennbar. Die PCR-Produkte der Primer Sets A und D für MMTV sowie JSRV entsprechen demnach genau den beim Primerdesign berechneten Fragmentlängen. Für die Amplifizierung der PCR-Produkte der Primer-Sets F und G konnte für beide Templates nicht das gewünschte Fragment entstehen, da dafür als Ausgangstemplate einerseits die 2-LTR circles, die nur in der RT-Reaktion entstehen, benötigt werden und andererseits das integrierte Provirus. Da jedoch für diese Test-PCR nur die jeweilige Plasmid-DNA verwendet wurde als Template, ist die Amplifizierung durch die beiden Primer-Sets nicht möglich. Allerdings könnte man Banden sehen, wenn die Primer unspezifisch an die gDNA binden würden. Beim Primer-Set F kann man bei beiden Templates ganz schwache Banden sehen (Spalten 4 und 10). Bei der Negativkontrolle (H₂O) sind keine Banden zu sehen.

Im nächsten Schritt wurden die Primer Sets A und D für MMTV und JSRV in einer Gradienten PCR getestet, um die optimale Annealing Temperatur für die einzelnen Primer zu bestimmen. Dazu wurden die jeweiligen Primer-Sets mit zugehöriger Sonde in die real-time PCR eingesetzt. Als Template dienten wiederum das MMTV Transfer Plasmid und das JSRV

Volllängen-Plasmid, wovon jeweils 10^5 Kopien pro Reaktion eingesetzt wurden. Als Background wurden erneut ca. 100 ng CRFK gDNA pro Reaktion dazugegeben. Die PCR lief unter den üblichen PCR-Bedingungen (s. 3.2.1.1), bis auf den Annealing Schritt, welcher hier in einem Gradienten von 51°C bis 59°C stattfand. Im folgenden Diagramm sind die Ergebnisse der Gradienten PCR grafisch dargestellt anhand der CT-Werte.

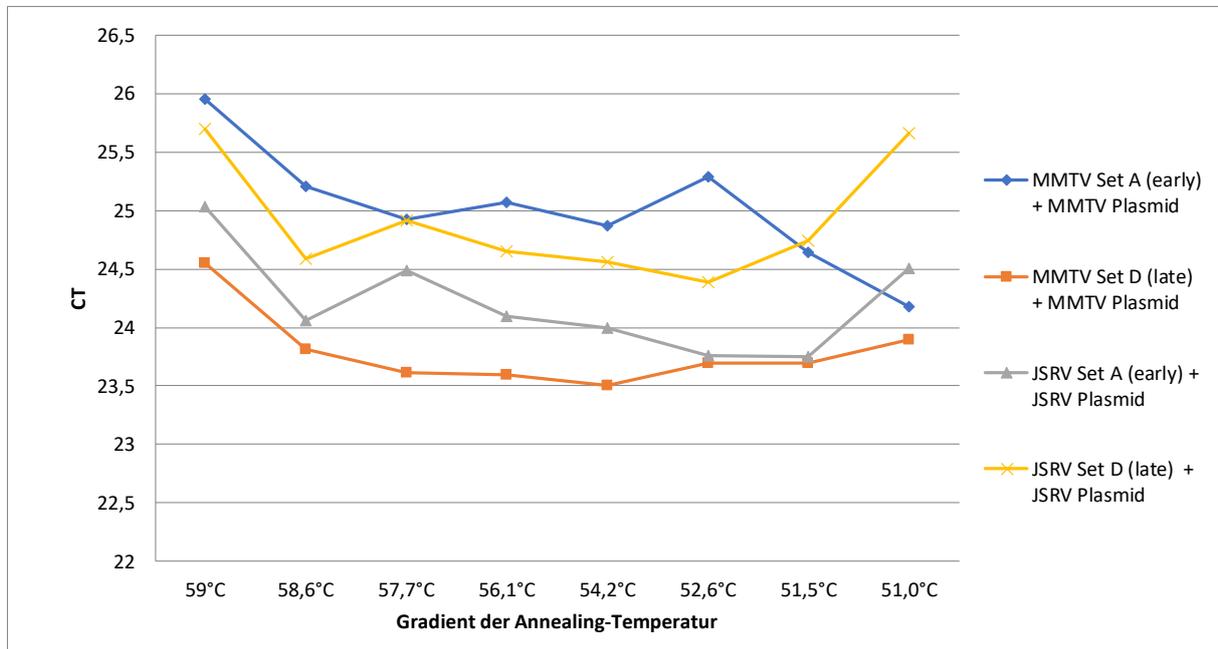


Abb. 32: Ergebnisse der Gradienten PCR für die Primer-Sonden-Sets A und D für MMTV und JSRV. Dargestellt sind die CT-Werte der jeweiligen PCR-Produkte gegenüber dem Temperaturgradienten von 51°C bis 59°C.

Die optimale Annealing-Temperatur kann bei der Gradienten-PCR anhand des niedrigsten CT-Wertes ermittelt werden. Für das MMTV Primer Set A liegt der niedrigste CT-Wert bei einer Annealing Temperatur von 51°C, wohingegen beim Primer Set D bei ca. 53°C der niedrigste CT-Wert messbar war. Bei den JSRV Primer Sets konnte für das Set A eine optimale Annealing-Temperatur von ca. 51 – 53°C ermittelt werden; beim Primer Set D lag der niedrigste CT-Wert bei ca. 54°C. Innerhalb der CT-Werte bei den einzelnen Primer Sets sind jedoch keine großen Schwankungen entlang des Gradienten erkennbar, zumindest nicht im mittleren Bereich. Auch nach elektrophoretischer Auftrennung auf dem Agarosegel (hier nicht gezeigt), konnten keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Banden entlang des Gradienten von ca. 51,5 – 57°C erkannt werden. Demnach wurde eine Annealing-Temperatur von 54°C, als mittlere optimale Annealing-Temperatur, für alle Primer Sets festgelegt.

Nachdem die einzelnen Primer Sets und dazugehörigen Sonden soweit getestet wurden, sollten im nächsten Schritt Standardreihen für MMTV und JSRV real-time PCRs angesetzt und getestet werden. Für die Herstellung der MMTV Standardreihe wurde das Transfer Plasmid (pRRpCeGFPWP25) in den Verdünnungsstufen 1×10^6 – 1 Kopie(n)/ μ l in Wasser bzw. CRFK gDNA Background angesetzt. Für die JSRV Standardreihe wurde der JSRV-Volllängenmolekularklon (pCMV2JS₂₁) ebenfalls in den Stufen 1×10^6 – 1 Kopie(n)/ μ l in Wasser und CRFK gDNA Background hergestellt. Getestet wurden diese Standardreihen mit den jeweiligen Primer-Sonden Sets A und D.

Da nach der Infektion die infizierte gDNA auch auf RT-Produkte getestet werden soll, die normalerweise als Sequenzen ohne RT-Reaktion so nicht im viralen Genom vorkommen (1- und 2-LTR circles), wurden auch dafür spezielle Standardreihen hergestellt. Die Sequenzen

dazu wurden mittels *Geneious* designt und sind anschließend als synthetische DNA-Fragmente hergestellt worden. Angesetzt wurden die Standardreihen in H₂O in den Verdünnungsstufen 1x10⁸ – 1 Kopie(n)/ µl. Getestet wurden die 1-LTR Standardreihen mit dem Primer-Set E des jeweiligen Virus in einer SYBR Green qPCR; die 2-LTR Standardreihen wurden mit der Primer-Sonden-Kombination F des jeweiligen Virus getestet.

In den folgenden Abbildungen sind die Standardkurven der Standardreihen für die RT-Produkt-spezifischen qPCRs A, D, E und F dargestellt.

MMTV

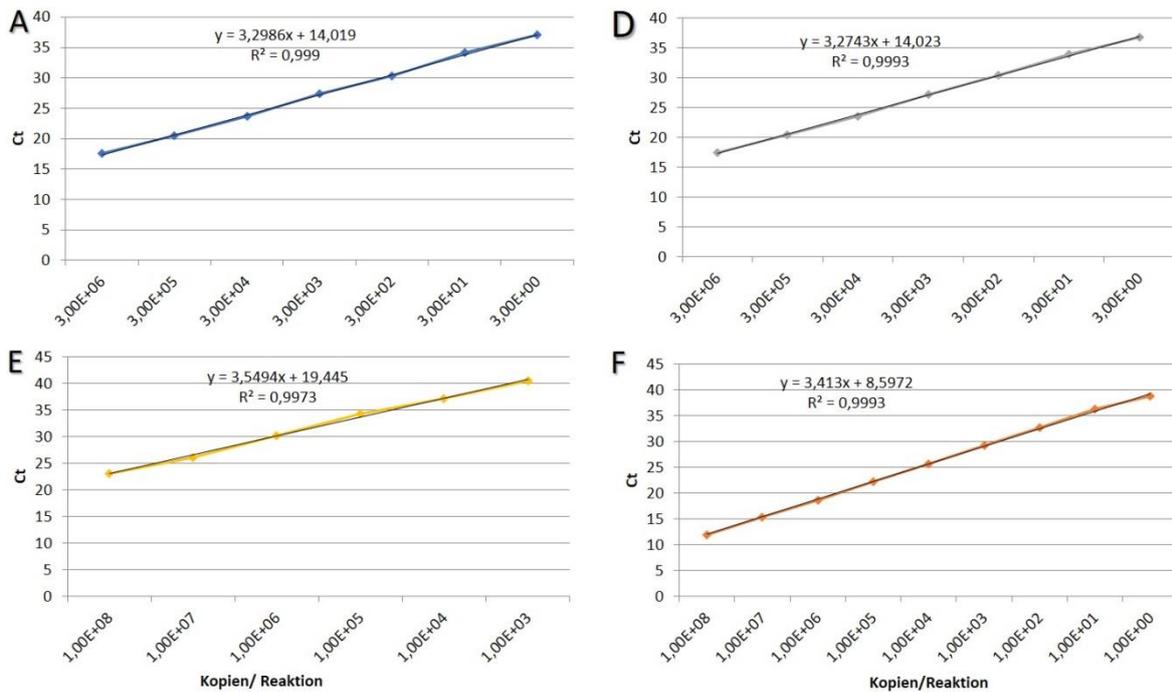


Abb. 33: Standardkurven der Standardreihen für die RT-Produkt-spezifischen real-time PCRs A, D, E und F für MMTV. Dargestellt sind die Stufen, die für die Standardkurve die beste Effizienz und Steigung brachten und so auch in die PCRs eingesetzt werden konnten. Die Steigung und der R²-Wert, über jeder Kurve jeweils dargestellt, geben die Linearität und damit die Qualität der Standardreihe wieder. (A = early RT-Produkte, D = late RT-Produkte, E = 1-LTR-circles (SYBR Green), F = 2-LTR circles)

JSRV

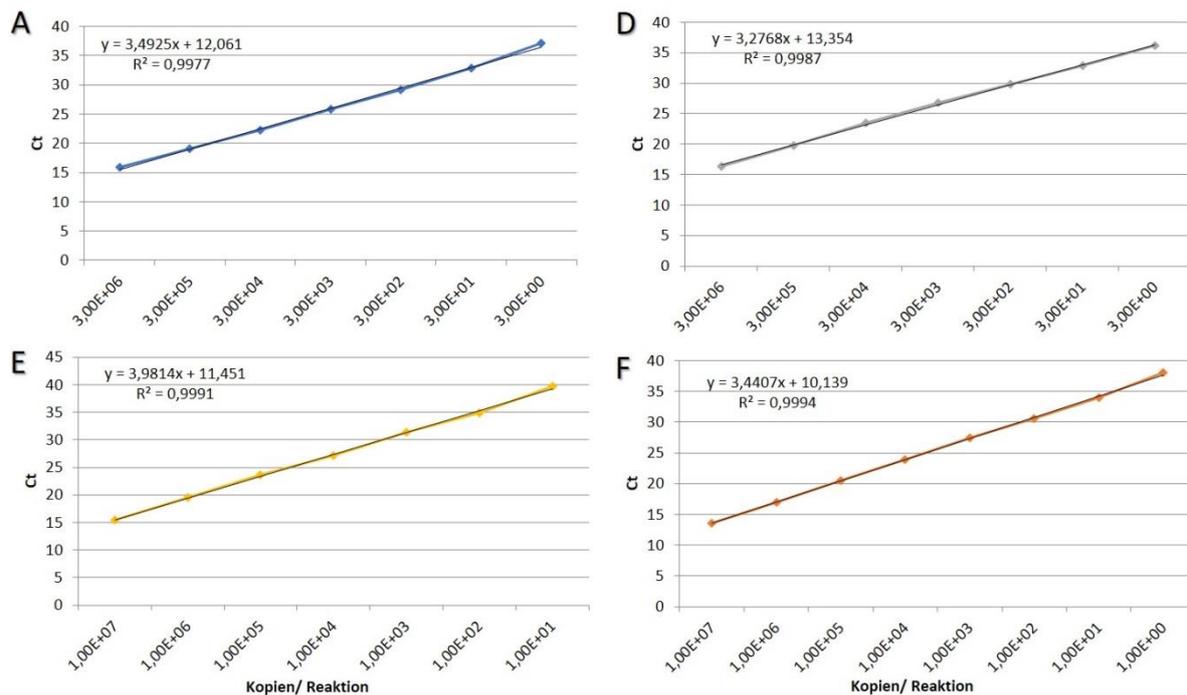


Abb. 34: Standardkurven der Standardreihen für die RT-Produkt-spezifischen real-time PCRs A, D, E und F für JSRV. Dargestellt sind die Stufen, die für die Standardkurve die beste Effizienz und Steigung brachten und so auch in die PCRs eingesetzt werden konnten. Die Steigung und der R^2 -Wert, über jeder Kurve jeweils dargestellt, geben die Linearität und damit die Qualität der Standardreihe wieder. A = early RT-Produkte, D = late RT-Produkte, E = 1-LTR-circles (SYBR Green), F = 2-LTR circles

Zunächst einmal kann man anhand der Standardkurven von MMTV sowie auch von JSRV sagen, dass die Linearität gegeben ist und die Standardreihen für die qPCRs verwendet werden können. Der R^2 -Wert, welcher ein statistischer Wert für die Korrelation der X- und Y-Werte ist, liegt bei jedem der 8 Standards bei $>0,99$. Die Steigungen der Standardkurven schwanken von $-3,27$ (MMTV D, JSRV D) und $-3,98$ (JSRV E), was durch Unterschiede in der Effizienz der Amplifizierung erklärt werden kann. Die optimale Steigung, welche einer Effizienz von 100% entspricht, liegt bei $-3,32$. Die Sensitivität der Standardreihen ist im Gesamten gut, wobei einige Standardreihen eine sehr gute Sensitivität haben mit einer messbaren Kopie pro Reaktion (JSRV F, MMTV F), andere Standardreihen jedoch eine geringere Sensitivität zeigen mit beispielsweise 1000 messbaren Kopien pro Reaktion bei der MMTV E Standardreihe.

Auch die Standardreihen für die spezifischen qPCRs der RT-Produkte A und D (early und late) für MMTV und JSRV in CRFK gDNA Background wurden mit den jeweiligen Primer-Sonden Kombinationen in der qPCR getestet. Die Standardkurven ähneln denen der mit H_2O angesetzten Standardreihen und sind deshalb hier nicht dargestellt. Einzig die Sensitivität ist bei einigen Standardreihen etwas geringer, jedoch ausreichend für den Einsatz in der qPCR.

4.2 Infektionsversuche

Für die Infektionsversuche wurden CRFK Zellen mit den Reporterviren oriHERV, HERV K_{CON} oder MMTV oder dem JSRV Klon infiziert. Die jeweiligen Virusüberstände wurden dafür zuvor DNase-verdaut, um eventuell vorhandene Plasmide zu entfernen; weiterhin wurde ein Teil des Virusüberstandes hitze-inaktiviert und als Kontrolle auf die Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte durch Spinokulation. Die Ernte der ersten infizierten Zellen erfolgte direkt nach der Spinokulation, zum Zeitpunkt 0. Die nächste Ernte erfolgte 6 Stunden nach der Infektion, d.h.

nach der Spinokulation, während die letzte Zellernte 48 Stunden nach der Infektion erfolgte. Bevor die letzte Zellernte vorgenommen wurde, wurden die Zellen, welche mit Reporterviren infiziert worden waren, mittels Fluoreszenzmikroskopie auf GFP-Expression überprüft. In der folgenden Abbildung sind die Bilder der Fluoreszenzkontrolle des ersten Infektionsversuches abgebildet.

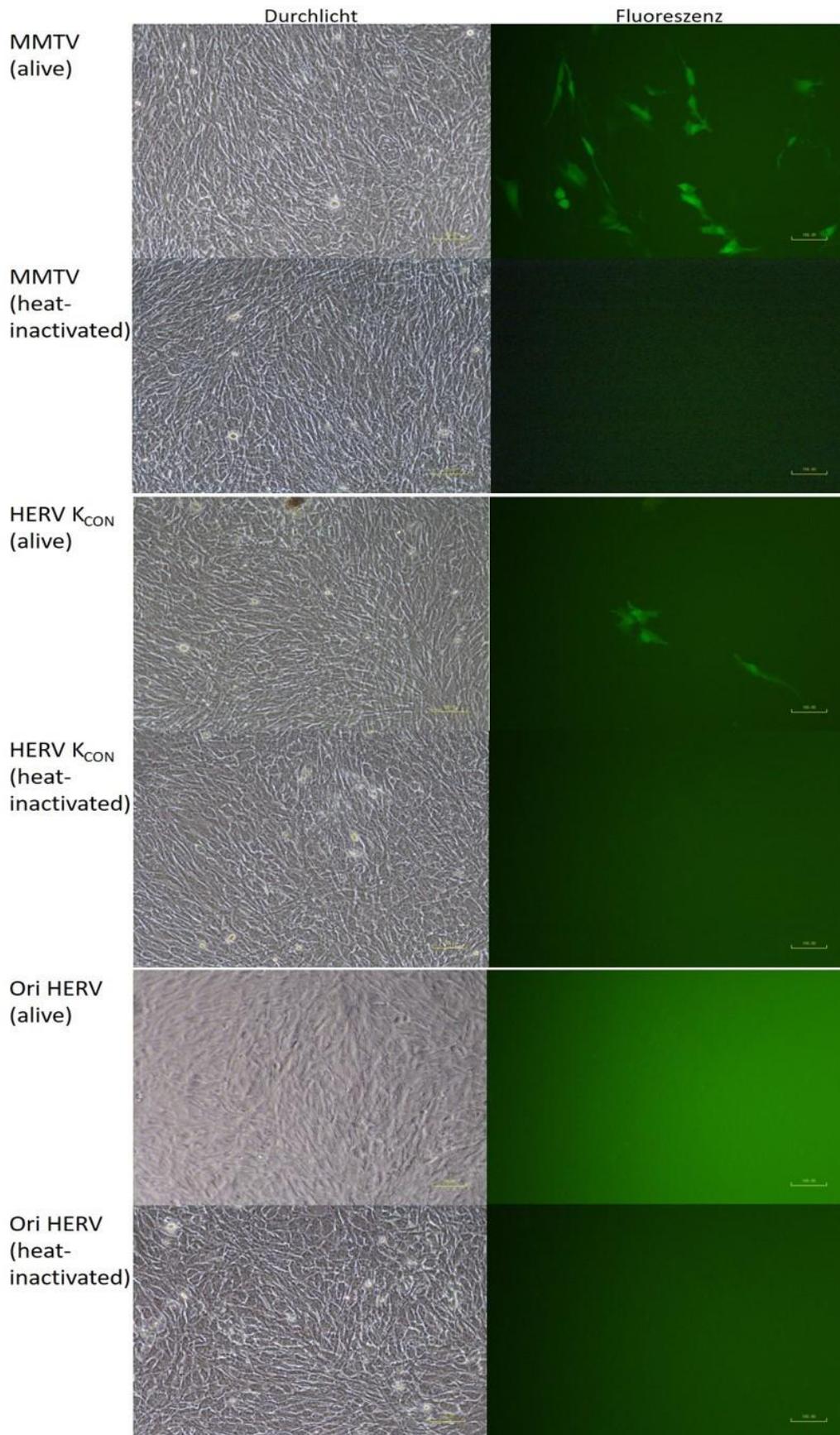


Abb. 35: Überprüfung der infizierten CRFK Zellen 48h p.i. auf GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop. Links ist ein Ausschnitt der Zellpopulation im normalen Durchlicht-Modus dargestellt, auf der rechten Seite sieht man

den selben Ausschnitt im Fluoreszenz-Modus. Dargestellt sind jeweils die mit aktivem Virusüberstand infizierten Zellen sowie die Zellen, welche zur Kontrolle mit hitze-inaktiviertem Virusüberstand versetzt wurden.

In den ersten Feldern sieht man CRFK Zellen, welche mit den MMTV Reporterviren infiziert wurden, sowie deren hitze-inaktivierte Kontrolle. Bei der Kontrolle sind keine grün fluoreszierenden Zellen zu finden gewesen. Bei den mit aktiven MMTV infizierten Zellen konnten einige grüne, GFP-exprimierende Zellen gefunden werden. Die nächsten vier Felder zeigen CRFK Zellen, welche mit HERV K_{CON} Reporterviren infiziert wurden bzw. der inaktivierten Kontrolle. Auch dort ließen sich einige wenige grün fluoreszierende, GFP-exprimierende Zellen finden, jedoch weitaus weniger als bei den mit MMTV infizierten Zellen. In den letzten vier Feldern sind mit oriHERV Reporterviren infizierte CRFK Zellen und deren Kontrolle zu sehen. Es konnten dort jedoch keine GFP-exprimierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop entdeckt werden.

Aus den zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion geernteten Zellen wurde im Anschluss die DNA extrahiert, welche dann auf eine gemeinsame Konzentration normalisiert wurde. Die DNA Proben der mit unterschiedlichen Viren infizierten Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. wurden im Anschluss in die jeweiligen spezifischen real-time PCRs eingesetzt, um den Anteil bzw. das Vorhandensein der verschiedenen RT-Produkte in den Proben zu bestimmen. Dargestellt sind im Folgenden die Abbildungen zum ersten Infektionsversuch, da die des zweiten Versuches dem ersten gleichen.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der für die early RT-Produkte spezifischen HERV qPCR zusammengefasst.

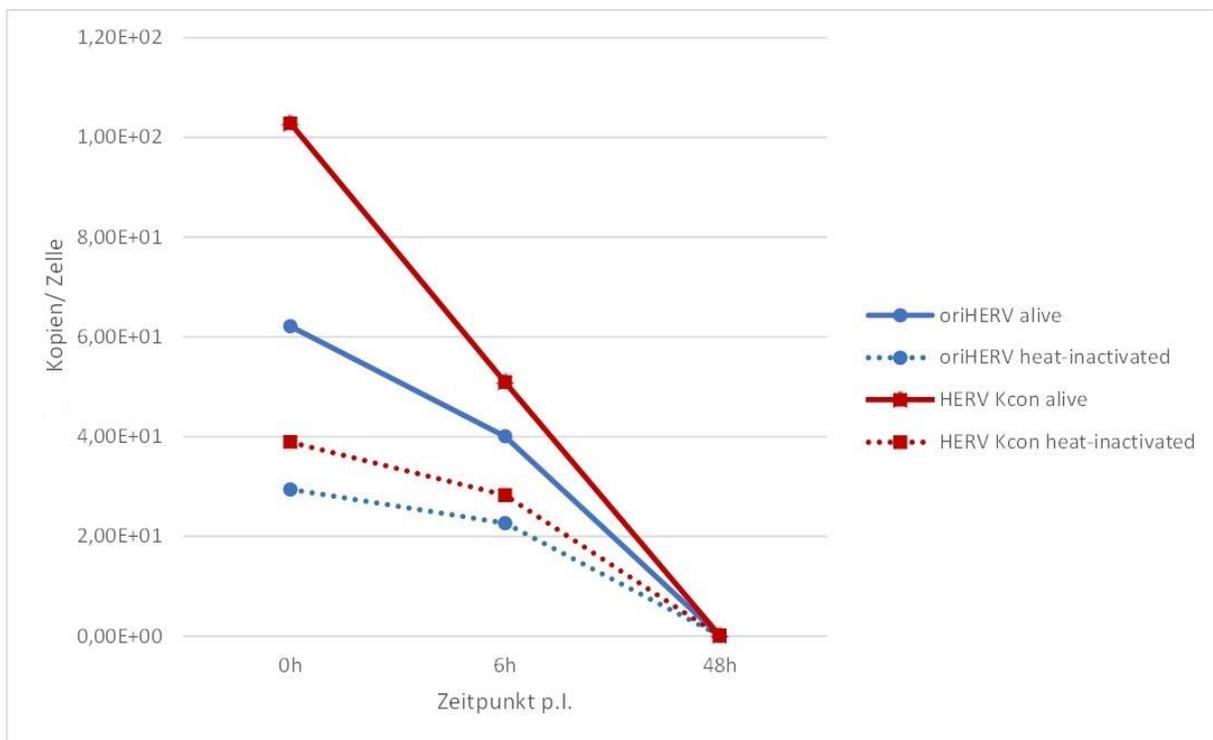


Abb. 36: Ergebnisse der HERV spezifischen real-time PCR für die early RT-Produkte (Set A). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit oriHERV/ HERV K_{CON} infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitze-inaktivierten Kontrollen aufgeführt.

Direkt nach der Spinokulation sind in den Zellen die meisten Kopien der frühen RT-Produkte messbar, wobei für die mit HERV K_{CON} infizierten Zellen 1,6x mehr Kopien pro Zelle messbar

waren als für die mit oriHERV infizierten Zellen. Je länger die Zeit nach der Infektion voranschreitet, desto weniger Kopien der *early* RT-Produkte sind in den Zellen messbar. Nach 6 Stunden hat sich die Anzahl der Kopien pro Zelle bei den mit HERV K_{CON} infizierten Zellen halbiert, während sich die Anzahl der Kopien bei den mit oriHERV infizierten Zellen um ein Drittel verringert hat. 48 Stunden nach der Infektion sind in den Zellen keine frühen RT-Produkte mehr messbar. In den Zellen, welche mit den inaktivierten Virusüberständen versetzt wurden, sind trotzdem Kopien messbar, wenn auch weniger als bei den mit aktiven VLPs infizierten Zellen.

In den nächsten Abbildungen sind die Ergebnisse der real-time PCR für frühe RT-Produkte für die mit MMTV und JSRV infizierten Zellen abgebildet.

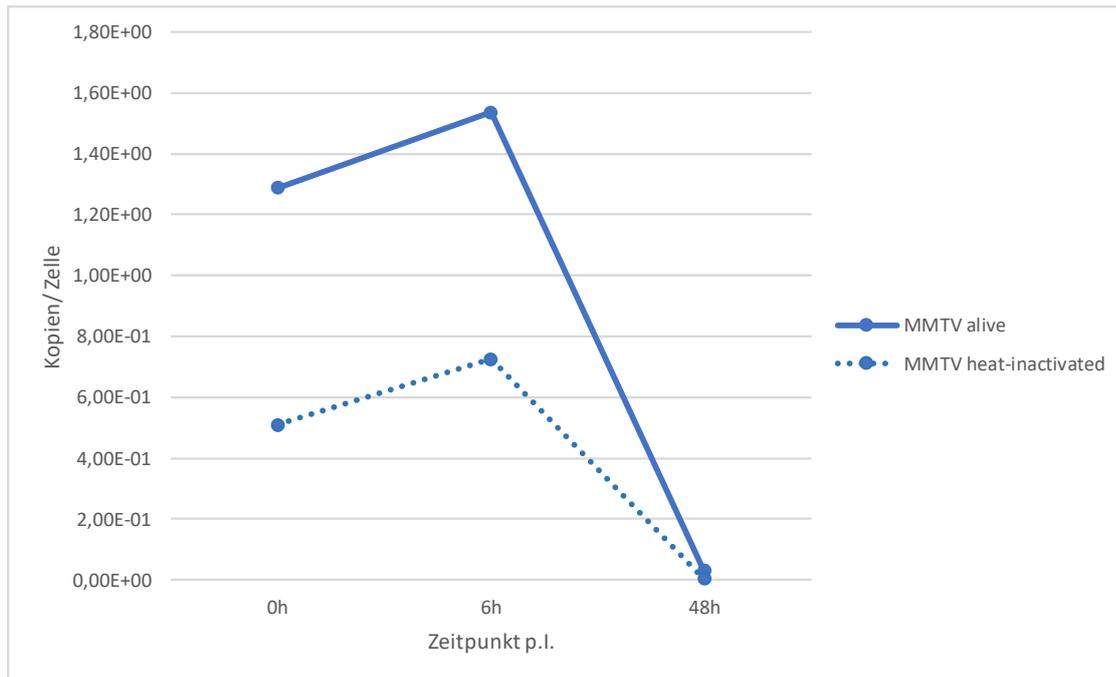


Abb. 37: Ergebnisse der MMTV-spezifischen real-time PCR für die *early* RT-Produkte (Set A). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit MMTV infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitze-inaktivierten Kontrollen aufgeführt.

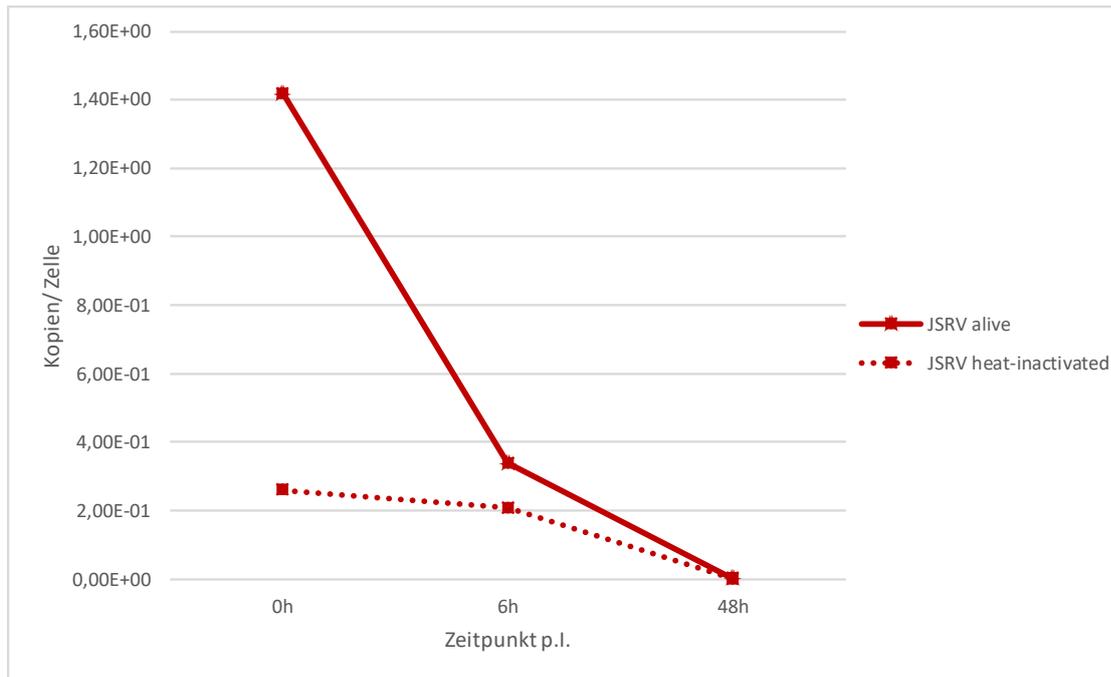


Abb. 38: Ergebnisse der JSRV-spezifischen real-time PCR für die early RT-Produkte (Set A). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit JSRV infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitze-inaktivierten Kontrollen aufgeführt.

Bei den mit MMTV infizierten Zellen ist die Anzahl der frühen RT-Produkte pro Zelle direkt nach der Infektion zunächst einmal geringer, nachdem sie bis zu 6 Stunden nach der Infektion etwas ansteigt. Jedoch sind die Werte von 1,3 Kopien pro Zelle (0h) und 1,6 Kopien pro Zelle (6h) nicht sehr weit voneinander entfernt. Nach 48 Stunden sind wiederum keine frühen RT-Produkte mehr in der Zelle zu messen. In den mit den inaktivierten Virusüberständen versetzten Zellen ist jedoch eine sehr geringe Menge an *early* RT-Produkt Kopien messbar.

Auch bei den mit JSRV infizierten Zellen konnten nur geringe Kopienzahlen der *early* RT-Produkte pro Zelle gemessen werden direkt nach der Infektion. Die Kopienzahl sinkt nach 6 Stunden um das Vierfache ab; nach 48 Stunden sind keine Kopien mehr pro Zelle messbar. Auch hier lassen sich wieder aus den hitzeinaktivierten Kontrollen geringe Mengen an Kopien messen.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der HERV-spezifischen real-time PCR für die *late* RT-Produkte dargestellt.

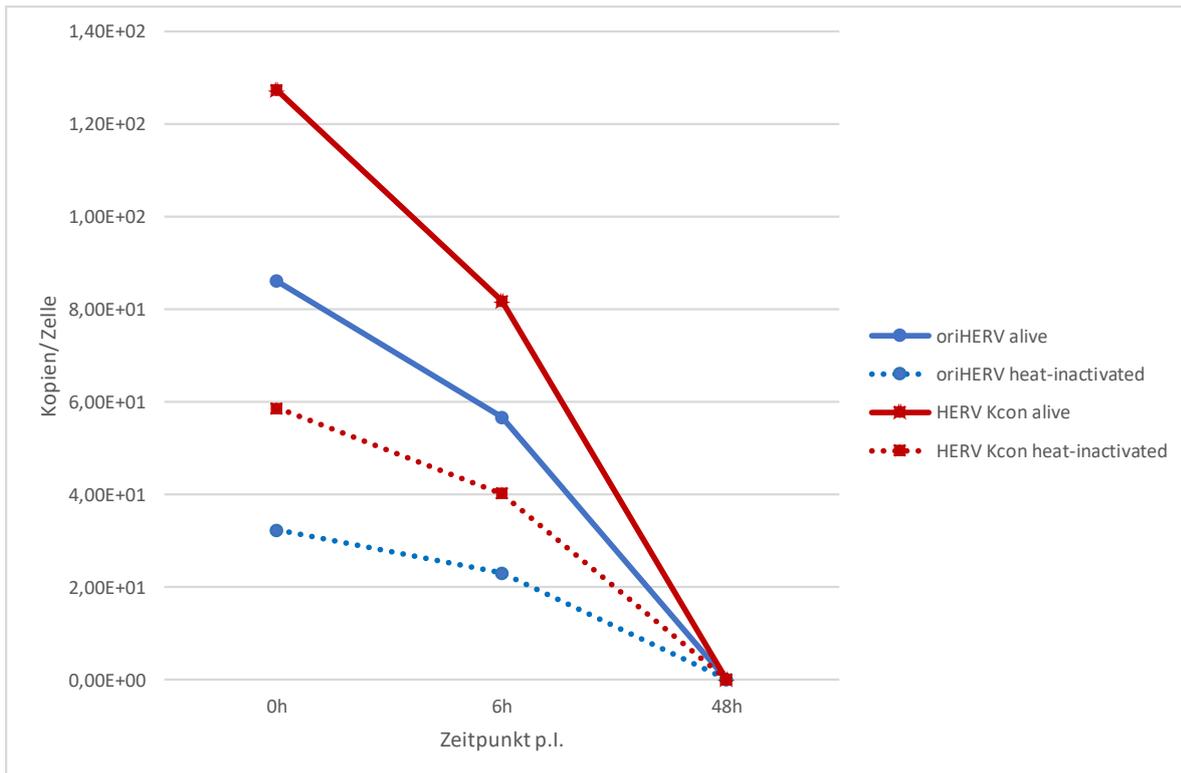


Abb. 39: Ergebnisse der HERV spezifischen real-time PCR für die late RT-Produkte (Set D). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit oriHERV/ HERV KCon infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitze-inaktivierten Kontrollen aufgeführt

Auch die späten RT-Produkte sind schon direkt nach der Spinokulation in den infizierten Zellen zu messen. Die mit HERV K_{CON} infizierten Zellen zeigen wiederum mit ca. 125 Kopien pro Zelle mehr Kopien als die mit oriHERV infizierten Zellen, bei welchen etwa 85 Kopien pro Zelle gemessen wurden beim Zeitpunkt 0. Nach 6 Stunden verringert sich die Anzahl der Kopien pro Zelle bis nach 48 Stunden keine Kopien mehr messbar sind. Auch hier konnten erneut Kopien der RT-Produkte in Zellen der Kontrollgruppe gemessen werden.

Die Ergebnisse der MMTV- bzw. JSRV-spezifischen qPCR für die late RT-Produkte sind in den nächsten Abbildungen dargestellt.

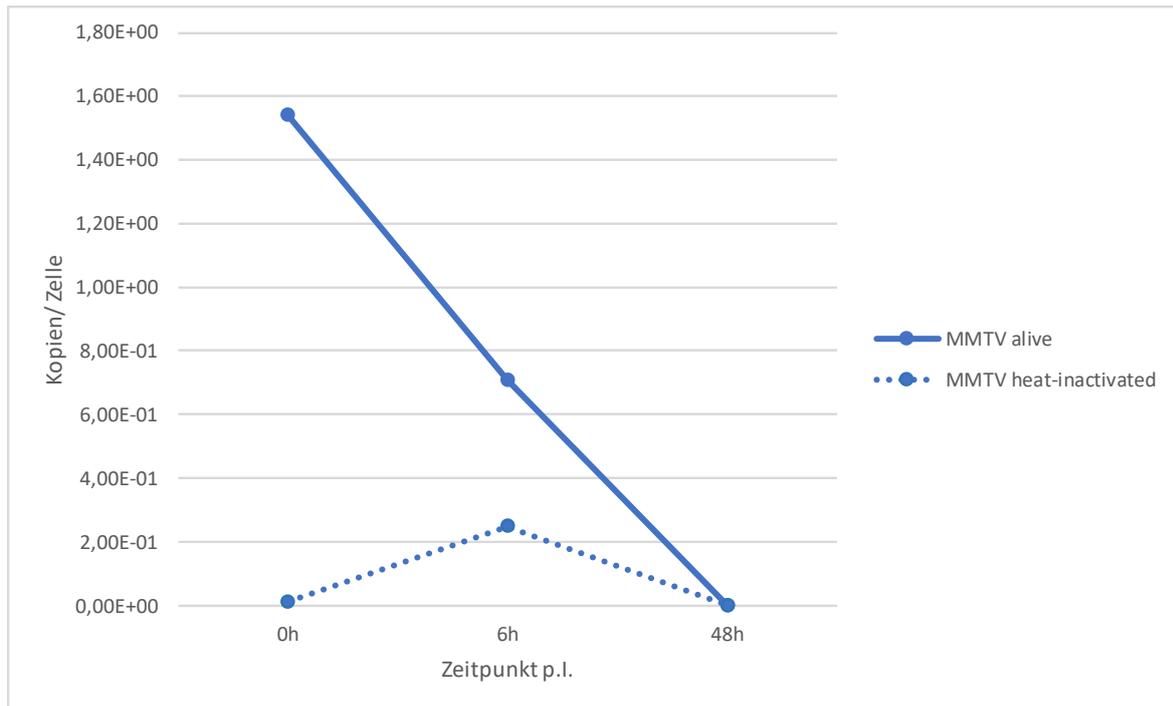


Abb. 40: Ergebnisse der MMTV-spezifischen real-time PCR für die late RT-Produkte (Set D). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit MMTV infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitze-inaktivierten Kontrollen aufgeführt.

Direkt nach der Infektion sind auch bei den mit MMTV infizierten Zellen die meisten Kopien des späten RT-Produktes pro Zelle messbar. Die Anzahl der Kopien liegt wiederum nur bei einem Wert von ca. 1,6 Kopien pro Zelle. Die Kopienzahl sinkt mit voranschreitender Zeit nach der Infektion bis auf 0 Kopien nach 48 Stunden ab. Bei der hitzeinaktivierten Kontrolle ist hier nur beim Zeitpunkt nach 6 Stunden eine geringe Menge RT-Produkte messbar.

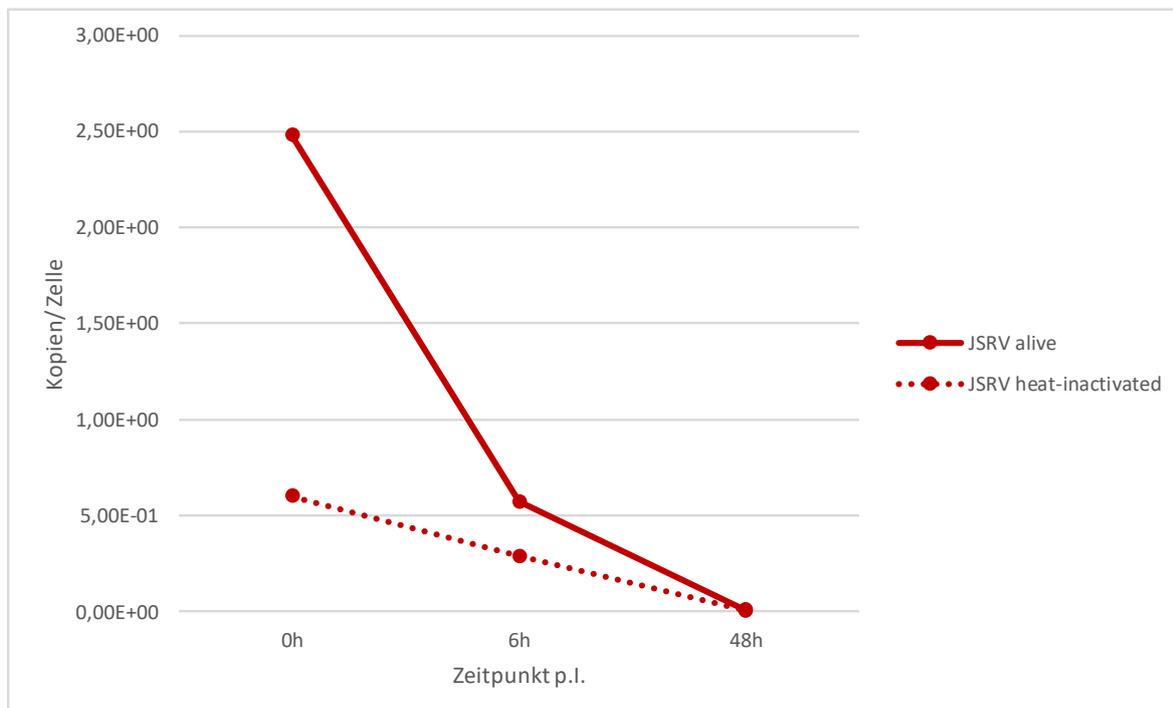


Abb. 41: Ergebnisse der JSRV-spezifischen real-time PCR für die late RT-Produkte (Set D). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit JSRV infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitze-inaktivierten Kontrollen aufgeführt.

Bei den mit JSRV infizierten Zellen ergibt sich das gleiche Bild wie bei den mit MMTV infizierten Zellen die späten RT-Produkte betreffend. Auch hier sind mit 2,5 Kopien pro Zelle die meisten Kopien der späten RT-Produkte direkt nach der Infektion messbar, während die Anzahl der Kopien über 6 Stunden bis 48 Stunden auf 0 Kopien abfällt. Bei den Zellen die mit dem hitzeinaktivierten Virusüberstand versetzt wurden, sind wiederum geringe Mengen an Produkt in der Zelle messbar.

Bei der HERV-spezifischen real-time PCR auf 2-LTR circles und integrierte Proviren war in der DNA aus den infizierten Zellen keine Kopie des jeweiligen RT-Produktes messbar. Die Auswertung der Ergebnisse ist im nächsten Diagramm dargestellt.

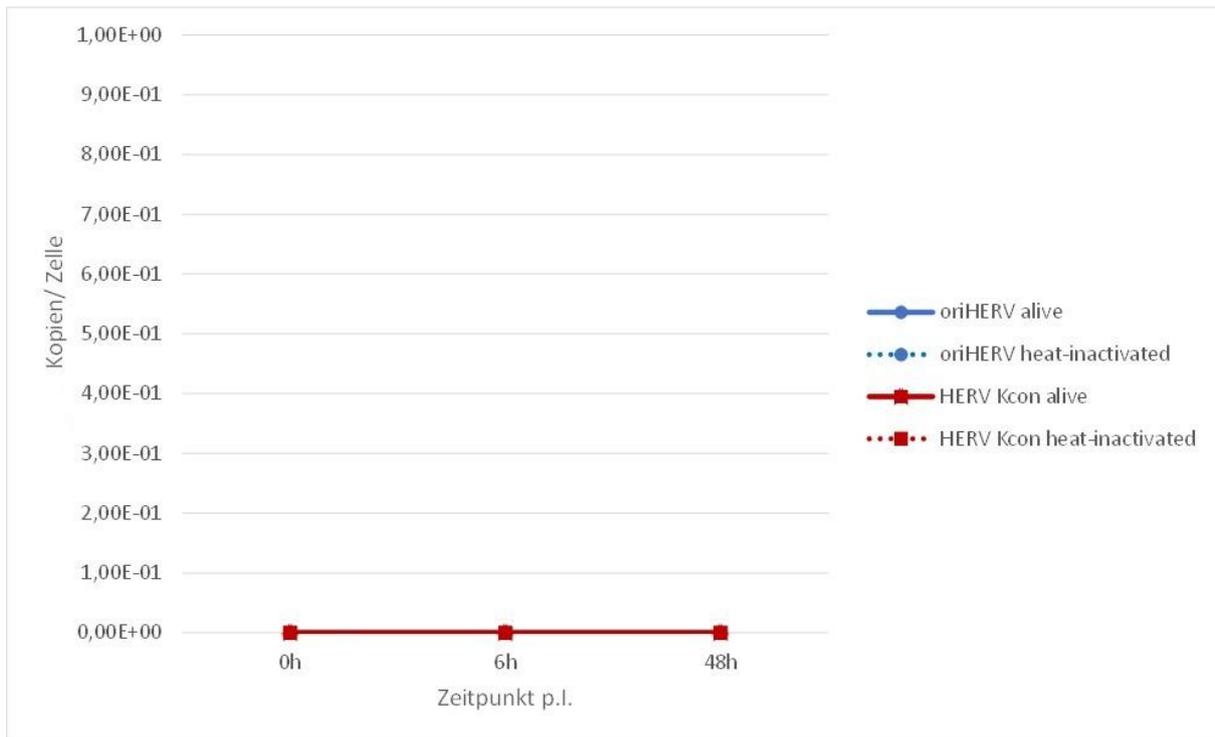


Abb. 42: Ergebnisse der HERV spezifischen real-time PCR für die 2-LTR circles RT-Produkte sowie die integrierten Proviren (Set F, G). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit oriHERV/HERV KCon infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitzeinaktivierten Kontrollen aufgeführt.

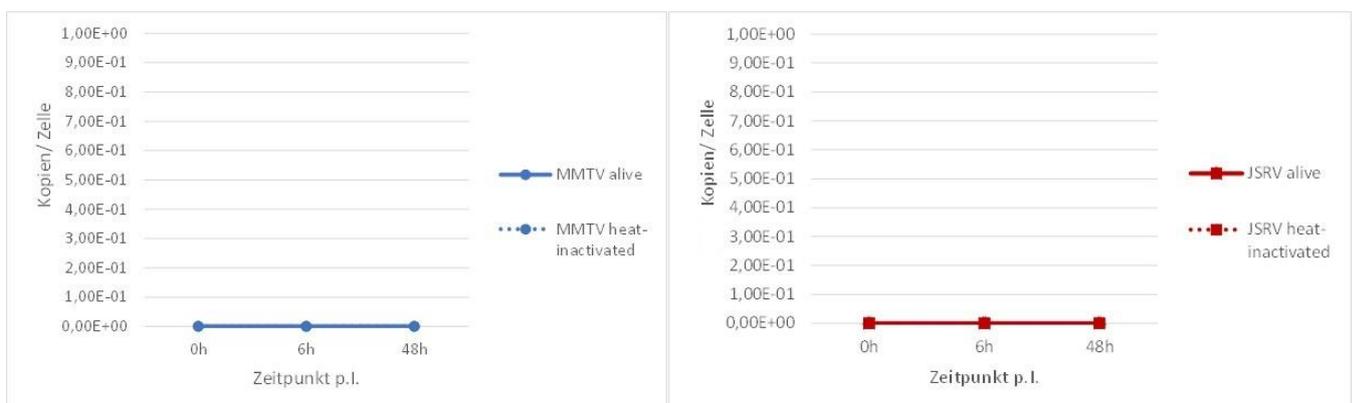


Abb. 43: Ergebnisse der MMTV- bzw. JSRV-spezifischen real-time PCR für die 2-LTR circles RT-Produkte sowie die integrierten Proviren (Set F, G). Dargestellt sind die Kopien pro Zelle der gDNA Proben von CRFK Zellen, welche mit dem jeweiligen Virus infiziert wurden, über verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion. Weiterhin sind die Proben der hitzeinaktivierten Kontrollen aufgeführt.

Auch bei den mit MMTV und JSRV infizierten Zellen konnte in der real-time PCR für 2-LTR circles sowie für die integrierten Proviren keine Kopie des jeweiligen RT-Produktes in den Zellen gemessen werden. Allerdings wurde bei der JSRV-spezifischen qPCR für die 2-LTR circles anhand der Amplifikationskurven festgestellt, dass die Triplikate, welche in die PCR eingesetzt wurden, bei späten CT-Werten ein Fluoreszenzsignal abgaben. Die Amplifikationskurven sind in der nächsten Abbildung dargestellt.

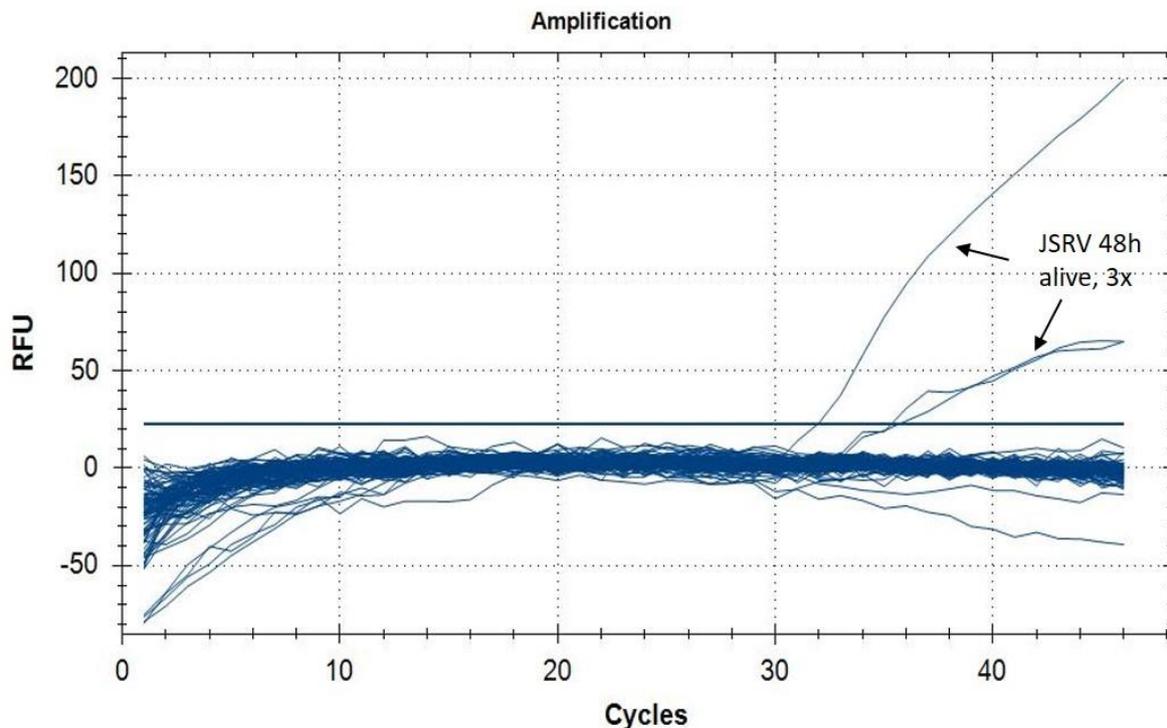


Abb. 44: Amplifikationskurven der JSRV-spezifischen qPCR für die 2-LTR circles. Zu sehen ist, dass bei einem CT-Wert von ca. 32 und dann bei CT 35 etwa die drei DNA Proben von mit JSRV infizierten Zellen ein Fluoreszenzsignal zeigen.

Um zu bestätigen, dass sich in den DNA Proben der Zellen tatsächlich Kopien der 2-LTR circles von JSRV befinden, wurden diese Proben in eine *droplet digital PCR* (ddPCR) eingesetzt, zusammen mit der JSRV 2-LTR circles Standardreihe, die als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Außerdem wurden die entsprechenden Proben von JSRV des zweiten Infektionsversuches in die ddPCR eingesetzt, sowie die 48h *alive* MMTV Proben, da auch bei diesen in den Amplifikationskurven positive Signale in späten CT's messbar waren. In den folgenden Abbildungen sind 1-D Plots als Auswertung der ddPCR dargestellt. Der erste 1-D Plot zeigt die Proben der 2-LTR-circles Standardreihe von JSRV, welche als Positivkontrolle in die ddPCR eingesetzt wurde.

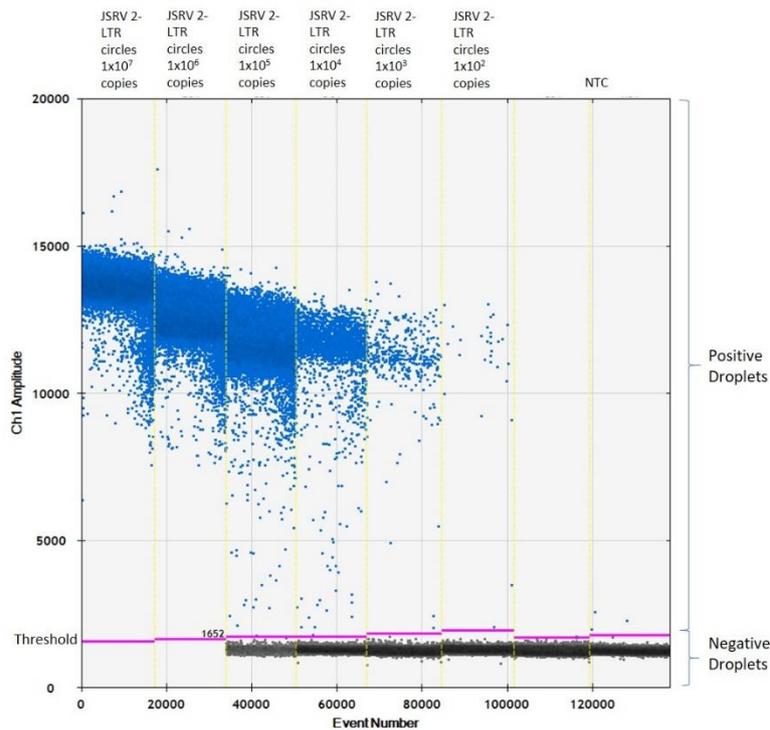


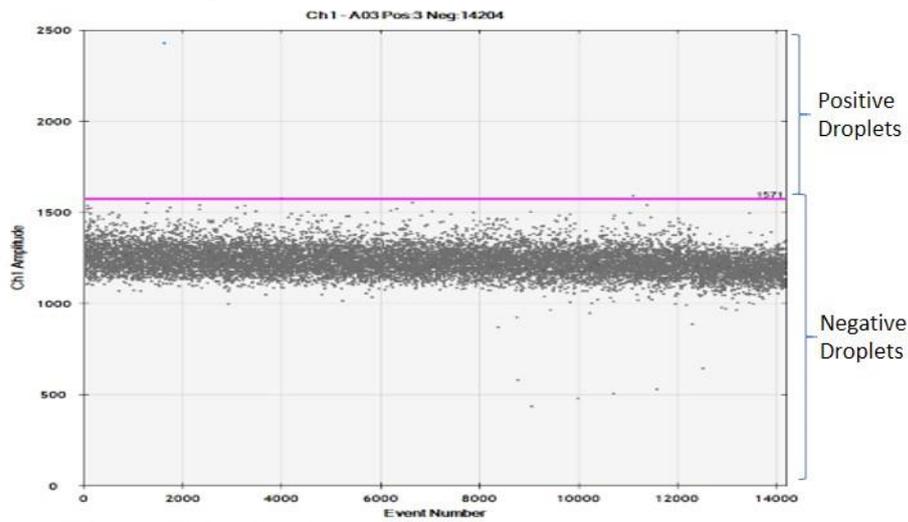
Abb. 45: 1-D Plot der ddPCR mit den Proben der JSRV 2-LTR circles Standardreihe von den Stufen 1×10^7 bis 100 Kopien pro Reaktion, welche als Positivkontrollen für die ddPCR dienten. Dargestellt ist die Fluoreszenz-Intensität geplottet gegen die Anzahl der Droplets.

In der Auswertung der ddPCR wurde anhand der Negativkontrolle (H_2O) manuell der Schwellenwert (*Threshold*) für die gemessenen Proben bestimmt. Dieser teilt die gemessenen Droplets ab einer bestimmten Fluoreszenzintensität in positive und negative Droplets auf. Im Fall der hier gemessenen Standardreihe, welche als Positivkontrolle verwendet wurde, kann man die Abstufungen der positiven Droplets zu den negativen gut erkennen. Die gemessene Kopienanzahl (= positive Droplets) stimmte vom Faktor her mit der definierten eingesetzten Kopienzahl der Proben überein.

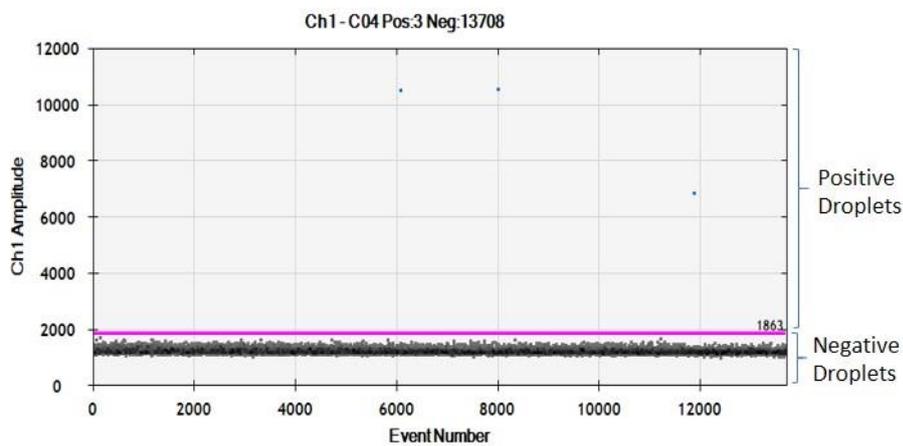
Des Weiteren wurden in die ddPCR drei Proben als Templates eingesetzt, bei denen mit der real-time PCR aufgrund des Detektionslimits nicht sicher gesagt werden konnte, ob sich einige positive Kopien in der jeweiligen Probe befanden; dies waren die DNA Proben der Zellen, welche mit JSRV infiziert wurden und nach 48h geerntet wurden aus beiden Infektionsversuchen, sowie die DNA Probe der MMTV infizierten Zellen, die nach 48h geerntet wurden aus dem zweiten Infektionsversuch. Außerdem wurden die dazugehörigen Proben der hitzeinaktivierten Kontrollen mit eingesetzt. Die folgende Abbildung zeigt die 1-D Plots der drei *alive* Proben. Dabei sind oberhalb der pinken Schwellenlinie die positiven Droplets, sofern welche vorhanden sind, dargestellt und unterhalb der Linie die negativen Droplets, welche nicht das gewünschte Produkt enthielten. Über den Plots ist jeweils die Anzahl der negativen und positiven Droplets angegeben. Der erste Plot zeigt die als Template eingesetzte DNA aus Zellen, die mit JSRV infiziert wurden, aus dem ersten Infektionsversuch. Insgesamt wurden in dieser Reaktion etwas mehr als 14.000 Droplets generiert, wovon 3 als positiv detektiert wurden. Im zweiten Plot ist ebenfalls als Template die DNA von JSRV-infizierten Zellen eingesetzt worden, dieses Mal sind es Proben des zweiten Infektionsversuches. In dieser Probe wurden etwa 13.700 Droplets generiert, wovon ebenfalls 3 positive gemessen wurden. Der letzte Plot zeigt die DNA Probe aus MMTV infizierten Zellen nach der ddPCR. Es wurden

bei dieser Probe etwa 14.200 Droplets generiert, wovon 13 positive, das gewünschte RT-Produkt enthaltene Droplets detektiert wurden.

JSRV 48h alive, Infektion 1



JSRV 48h alive, Infektion 2



MMTV 48h alive, Infektion 2

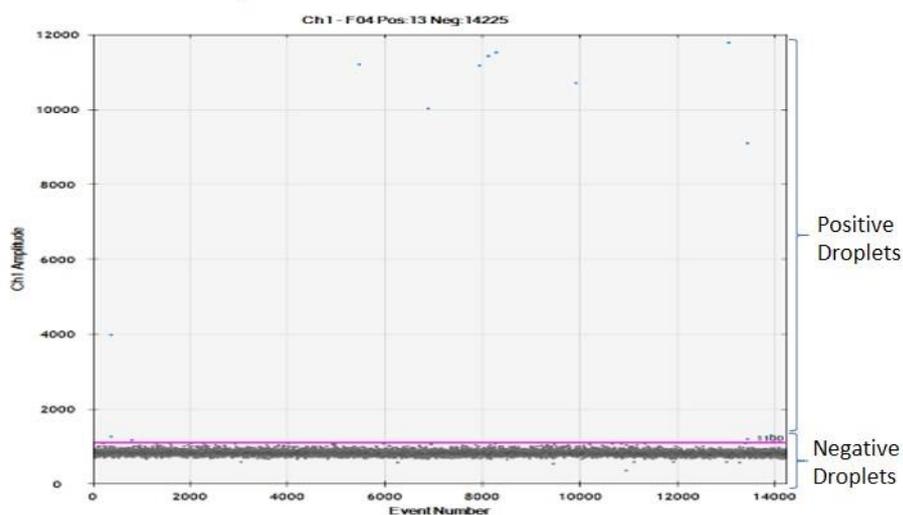


Abb. 46: 1-D Plots der ddPCR Reaktionen dreier Proben von DNA aus CRFK Zellen, welche mit JSRV bzw. MMTV infiziert wurden und den Zeitpunkt 48h nach der Infektion widerspiegeln. Aufgetragen ist die Fluoreszenz-Intensität gegenüber der Anzahl der Droplets.

5. Diskussion

Zur HERV-K(HML-2) Familie zählen die am besten erhaltenen endogenen Retroviren im humanen Genom, weshalb vermutet wird, dass diese bis zuletzt aktiv waren. Dennoch konnten bisher trotz umfangreicher Nachforschungen keine replikationskompetenten, infektiösen Proviren im Menschen gefunden werden. Kürzlich konnten in Gorillas potentiell infektiöse HML-2 Elemente gefunden werden [72], im Menschen jedoch gibt es noch keine Beweise für eine fortlaufende Replikation von HERV-K(HML-2). Das Verschwinden der exogenen infektiösen Viren kann unter anderem auf die Inhibierung der Partikel durch zelluläre Restriktionsfaktoren, welche sich co-evolutiv entwickelt haben, erklärt werden [47]. Um eine Inhibierung des post-entry/pre-integration Prozesses zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit CRFK Zellen mit geeigneten Reporterviren infiziert werden und in den Zellen stattfindende Schritte der viralen Replikation verfolgt werden.

5.1 Produktion und Charakterisierung von HERV-K Reporterviren

Während bisher keine natürlich auftretenden infektiösen HERVs bekannt sind, ist es zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gelungen, aus einer generierten HERV-K Consensus Sequenz rekonstituierte HERV-K Genome zu konstruieren, welche die potentiellen exogenen Viren darstellen sollen [46, 47]. Auch in der eigenen Arbeitsgruppe wurden zuvor mittels eines Algorithmus post-insertionale Mutationen in der Sequenz des HERV-K113 Provirus identifiziert und durch Rückmutation zur Consensus Sequenz ein rekonstituierter Moleklarklon von HERV-K113 generiert (pBSK oriHERV-K113) [59, 73]. Alle rekonstituierten HERV-K(HML-2) Sequenzen können virale Partikel bilden, welche Zellen infizieren können. Für die in dieser Arbeit geplanten Infektionsexperimente war dieser Vollängenmoleklarklon jedoch nicht geeignet, da mit diesem nicht genügend Viruspartikel produziert werden konnten und das virale Genom kein Reportergen wie bei HERV-K_{CON} enthält. (s. Abb. 13). Um dieses Problem zu umgehen, wurde auf zwei verschiedene HERV-K(HML-2)-basierte Reportervirussysteme zurückgegriffen, mit denen es möglich war, ausreichend Reporterviruspartikel, oder VLPs (*virus-like particles*) zu produzieren. Zum einen war dies das von Lee *et al.* entwickelte HERV K_{CON} Reportervirussystem, mit welchem bereits die Infektion verschiedener Zelllinien gezeigt wurde [47]. Zum anderen wurde das in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelte oriHERV Reportervirussystem verwendet. Beide Systeme generieren VSV-G pseudotypisierte VLPs. Zur Charakterisierung der VLPs wurde die Menge der viralen RNA untersucht, sowie die RT-Aktivität und der Anteil am Capsid-Protein p27.

Die Anzahl der vRNA Kopien, gemessen über die cDNA Kopienzahl, ist zusammen mit der p27 Konzentration ein Marker für die Anzahl der Viruspartikel. Hinsichtlich der Anzahl der vRNA Kopien konnte bei den Reporterviren, welche als Packaging-Plasmid das kodon optimierte oricoGPP enthielten, der höchste Wert gemessen werden (s. Abb. 12). Bei den HERV-K_{CON} VLPs, welche das zugehörige K_{CON}-GPP enthielten, wurden wesentlich weniger vRNA Kopien gemessen. Da die Verpackung der viralen RNA von dem Backbone der VLPs ausgeht, sollte in der Kontrolle mit dem Leervektor anstatt des Backbones keine cDNA messbar sein. Hier könnten jedoch zelluläre anstatt der viralen RNAs verpackt worden sein, denn die hier verwendete qPCR detektiert endogene retrovirale Sequenzen, welche in jeder humanen DNA enthalten sind. Vergleicht man die Menge der gemessenen vRNA mit dem Gehalt an p27 Capsid-Protein in den Virusüberständen, so fällt auf, dass auch hier die beiden

das kodon-optimierte oricoGPP enthaltenen VLPs den meisten p27 Gehalt aufweisen (s. Abb. 13). Da die Menge an Capsid-Protein proportional zur Menge der produzierten Partikel ist, kann hier festgestellt werden, dass, je mehr Viruspartikel im Virusüberstand vorhanden sind, auch mehr vRNA in der qPCR gemessen werden kann. Im Zusammenhang mit dem K_{CON} Packaging Plasmid sind keine Capsid-Proteine messbar, was daran liegen könnte, dass die kodon-optimierte oricoGPP Sequenz eine wesentlich effektivere Expression erlaubt. Die Expression des Capsid-Proteins scheint hauptsächlich vom zugesetzten Packaging Plasmid und weniger vom Backbone der VLPs abzuhängen, was man daran sieht, dass in der den Leervektor anstatt des Backbones enthaltenen Kontrolle eine fast ebenso hohe p27 Konzentration messbar ist wie bei den beiden VLPs.

Die Messung der RT-Aktivität zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Reporterviren (s. Abb. 14). Eine geringfügig höhere RT-Aktivität ist wiederum bei den oricoGPP enthaltenden VLPs zu beobachten, während die K_{CON}-Reporterviren mit dazugehörigen GPP eine etwas geringere RT-Aktivität aufweisen. Das Niveau der Aktivität des Vollängenmolekularklons kann jedoch mit den Reporterviren hier nicht erreicht werden. In der Anzahl der Partikel, sprich dem p27 Gehalt, sowie der Menge der gemessenen vRNAs und der RT-Aktivität konnten die beiden Reportervirussysteme überzeugen, welche als Packaging-Konstrukt das kodon-optimierte oricoGPP enthielten. Die Kodon-Optimierung sorgt für eine optimale Expression der Gene durch Nutzung der jeweils am häufigsten vorkommenden t-RNA in den humanen Zellen. Zuvor konnte schon bei HIV-1 durch Konstruktion von Kodon-optimierten Sequenzen eine Steigerung in der Expression von bestimmten Genen beobachtet werden [74]. Auch bei HERV-K konnte mittels Einführung kodon-optimierter Sequenzen in einen Vollängenmolekularklon eine Veränderung der Expression beobachtet werden. Die Kodon-Optimierung führte dabei zu einer starken Überexpression, aber damit auch zu einer veränderten Viruszusammensetzung und Morphologie [75].

Aufgrund der Kodon-Optimierung und der damit einhergehenden Steigerung der Expression von Gag, Pro und Pol erzielten die oriHERV und HERV K_{CON}-Reporterviren, welche oricoGPP enthielten, hinsichtlich der p27 Konzentration, der RT-Aktivität und der vRNA Kopien die besten Ergebnisse für die Charakterisierung. Die HERV K_{CON} Reporterviren mit dazugehörigem K_{CON}-GPP konnten aufgrund der scheinbar geringen Partikelbildung nicht überzeugen und wurden demnach für die weiteren Versuche ausgeschlossen.

Da die Möglichkeit ausgeschlossen werden sollte, dass es auch hier aufgrund des kodon-optimierten GPP's zu einer Überexpression und damit negativ beeinflussten Partikelbildung kommt, wurde in den beiden Reportervirussystemen eine Titration von oricoGPP vorgenommen (s. Abb. 15 - 17). Der Anteil von 16,7% oricoGPP wurde im Voraus in der Arbeitsgruppe getestet [59], dies sollte aber in dem Titrationsversuch überprüft werden.

Bei beiden Reportervirussystemen sinkt, mit gleichzeitig sinkendem Anteil an oricoGPP, auch die Anzahl der vRNA Kopien sowie der p27 Gehalt, weshalb man davon ausgehen kann, dass die Menge der produzierten VLPs auch sinkt. Wurde oricoGPP komplett durch den Leervektor ersetzt (0% oricoGPP), so war auch kein Capsid-Protein mehr nachweisbar. Dies wiederum zeigt, dass die Expression von Gag hauptsächlich durch das zugesetzte Packaging-Plasmid oricoGPP und weniger durch das Backbone geschieht. Die bei 0% oricoGPP gemessene vRNA könnte wieder durch verpackte zelluläre RNA zustande gekommen sein. Andererseits können auch mit der qPCR, da sie wesentlich sensitiver als der ELISA ist, Partikel über die vRNA detektiert werden, die nicht im ELISA detektierbar waren. Das Gag könnte dann vom Backbone stammen, da dieses auch für gag codiert und kein zusätzliches Packaging-Plasmid

in dem Fall vorhanden war. Bei Abbildung 15 scheinen die Werte für 8,3% oricoGPP insgesamt zu niedrig zu sein, möglicherweise ist dies auf Fehler beim Pipettieren zurückzuführen. Bei der Messung der RT-Aktivität der im oricoGPP-Anteil unterschiedlichen Reporterviren kann zunächst einmal festgestellt werden, dass die HERV K_{CON} -VLPs eine um mindestens eine Log-Stufe höhere RT-Aktivität als die oriHERV VLPs zeigen (s. Abb. 17). Auch in den zuvor charakterisierten VLPs (s. Abb. 14) konnten die K_{CON} -VLPs eine höhere RT-Aktivität aufweisen, jedoch war der Unterschied geringer. Bei den K_{CON} VLPs scheint der Anteil an oricoGPP keinen Einfluss auf die RT zu haben, denn mit sinkendem Anteil an oricoGPP verändert sich die RT-Aktivität nicht signifikant. Weiterhin ist sogar in den VLPs ohne zugesetztem oricoGPP eine ebenso hohe RT-Aktivität messbar. Dies lässt darauf schließen, dass der GPP Anteil im K_{CON} -GFP Backbone allein schon für eine effiziente Expression der Polymerase ausreichend ist. Betrachtet man die RT-Aktivität der oriHERV VLPs, so fällt jedoch auf, dass diese mit abfallendem oricoGPP Anteil ebenfalls sinkt, und zwar jeweils immer um die Hälfte. Anders als bei den HERV K_{CON} VLPs ist hier keine RT-Aktivität messbar, wenn kein zusätzliches oricoGPP zugesetzt wurde. Dies lässt vermuten, dass bei diesen VLPs die effiziente Expression der Polymerase nicht vom CMV oriEGFP Backbone, sondern hauptsächlich vom Packaging Konstrukt herrührt. Fasst man nun die Ergebnisse des oricoGPP-Titrationsversuches zusammen, so lässt sich insgesamt erkennen, dass der Anteil von 16,7% oricoGPP zu den anderen Plasmiden für die Virusproduktion geeignet ist und verglichen zu geringeren oricoGPP Anteilen die besten Ergebnisse bezüglich p27 Gehalt, vRNA Kopienzahl und RT-Aktivität liefert. Demnach wurden in die Virusproduktion weiterhin 16,7% des Packaging-Plasmides eingesetzt.

5.2 Generierung und Charakterisierung der Slippery Site Mutanten-VLPs

Die ribosomalen Leserahmenverschiebungen um -1 an den *Slippery Sequenzen* ermöglichen die Synthese der Protease- und Polymerase-Proteine bei HERV-K. Die Vorläuferproteine sowie prozessierten Proteine liegen somit in einem ungleichen Verhältnis vor, da die Translation meist nach dem *gag*-Gen stoppt und die Leserahmenverschiebungen nur in einem bestimmten Anteil der Translationen geschehen.

Durch Mutationen in den *Slippery Sequenzen* konnten Konstrukte erstellt werden, mit denen die Synthese der Vorläuferproteine ohne Leserahmenverschiebung möglich ist. Das Verhältnis der synthetisierten Proteine sollte sich somit verschieben, sodass möglicherweise mehr Polymerase-Proteine gebildet werden. Dabei sollte weiterhin das Ziel verfolgt werden, Reporterviren in großer Anzahl und mit einer möglichst hohen RT-Aktivität zu produzieren, da die geringe Menge an p27 in Verbindung mit der hohen RT-Aktivität nach Transfektion des Vollängen Moleklarklons pBSK-oriHERV-K113 ein Hinweis auf die Zusammensetzung eines Wildtyp-Viruspartikels ist.

Im Western Blot wurde die zelluläre Expression der *Slippery Konstrukte* untersucht (s. Abb. 19). Als kräftige Bande ist bei den Spuren 2,3 und 5 bei 27 kDa das prozessierte Capsid Protein (p27) erkennbar. Durch ihre proteolytische Aktivität schneidet sich die Protease zunächst selbst aus dem Vorläuferprotein und beginnt mit der Prozessierung des Gag-Proteins. Entgegen der Erwartungen kann bei dem mutierten Pro-Pol Konstrukt (Spur 4) kein p27 nachgewiesen werden. Dort scheint möglicherweise die Protease nicht aktiv zu sein. Andererseits kann jedoch dort auch das p27 schon assembliert zu Viruspartikeln sein aufgrund einer sehr hohen Protease-Aktivität, sodass das Protein innerhalb der Zelle nicht mehr messbar ist. Dies würde bedeuten, dass bei den Zellen, welche mit dem Pro-Pol Konstrukt transfiziert wurden, eine gesteigerte Partikelproduktion erfolgt. Da in den anderen Zellsaten jeweils viel p27 detektierbar ist, könnte hier die Virusfreisetzung gestört sein.

Beim Ausgangskonstrukt oricoGPP (Spur 2) konnten bei ca. 95 kDa und 65 kDa schwächere Banden detektiert werden. Letzteres stellt das unprozessierte Gag-Vorläuferprotein dar, wobei zu erwarten gewesen wäre, dass diese Bande stärker ausfällt. Bei 95 kDa befindet sich das Gag-Pro Vorläuferprotein, welches erst nach einer Leserahmenverschiebung synthetisiert wird. Die Insertion eines zusätzlichen Cytosins in die *Slippery Sequenz* GGGAAAC im Gag-Pro Übergangsbereich sollte theoretisch zu einer Veränderung des Expressionsmusters führen. Bei diesem Konstrukt wurde daher eine verstärkte Gag-Pro Expression erwartet, da dieses Vorläuferprotein ohne zusätzliche Leserahmenverschiebung synthetisiert werden konnte. Jedoch ist in diesem Zellysat (Spur 3), entgegen den Erwartungen, keine Bande bei 95 kDa detektiert. Eine schwache Bande hingegen ist beim Gag-Vorläuferprotein zu sehen, welches durch Prozessierung entstand. Allerdings sollte hier die Expression schwächer als im Zellysat mit dem Ausgangskonstrukt ausgeprägt sein. Erwartet wurde, dass durch die Mutation, bei der die *gag* und *pro* Gene im gleichen translationalen Leserahmen positioniert wurden, das Verhältnis vom Gag- zum Gag-Pro-Vorläuferprotein in Richtung des letzteren verschoben wird. Normalerweise wird sehr viel mehr Gag-Protein als Gag-Pro Vorläuferprotein gebildet, da die Ribosomen in den meisten Fällen nicht den Leserahmen wechseln und so die Translation nach *gag* stoppt. Bei MMTV, einem nahen Verwandten von HERV-K, findet die erste Leserahmenverschiebung nur in 23% der Translationen statt [53], was bedeutet, dass über 4-Mal mehr Gag als Gag-Pro vorliegt. Bei HIV-1 liegt das Verhältnis von Gag zu Gag-Pol sogar bei 20:1 [76], wobei es dort nur eine Leserahmenverschiebung gibt.

Die Mutation der zweiten *Slippery Sequenz* im Pro-Pol Übergangsbereich führte dazu, dass neben dem Gag-Vorläuferprotein nach einer Leserahmenverschiebung das Gag-Pro-Pol Vorläuferprotein entstehen sollte. Demnach wurde bei ca. 200 kDa eine Bande erwartet, welche jedoch auf diesem Blot nicht mehr erkennbar ist, da er nur bis zu 110 kDa gelaufen ist. Im 12 %igen Gel wäre es nicht möglich gewesen, eine 200 kDa Bande zusammen mit der 27 kDa Bande darzustellen. Eine Möglichkeit große sowie kleinere Banden zusammen zu detektieren wäre die Verwendung eines Gradienten-Gels. Im Zellysat der Pro-Pol Mutante waren, anstatt der Bande bei 200 kDa, wiederum eine Bande bei 95 kDa und bei 65 kDa detektiert, welche hier jedoch nicht zu erwarten gewesen wären. Das Gag-Pro Vorläuferprotein (95 kDa), sowie das Gag-Vorläuferprotein (ca. 65 kDa) könnten durch Aktivität der Protease entstanden sein.

Als Folge der Mutationen in beiden *Slippery Sequenzen* wäre wiederum eine Bande bei ca. 200 kDa zu erwarten gewesen; diese ist jedoch in diesem Blot nicht sichtbar. Im Normalfall findet die Synthese des Gag-Pro-Pol Vorläuferproteins nur selten statt. Bei MMTV kommt es lediglich bei 8 % aller Translationen zur ribosomalen Leserahmenverschiebung im Bereich der zweiten *Slippery Sequenz* [53]. Aufgrund der engen Verwandtschaft ist anzunehmen, dass dieses Verhältnis ungefähr auch für HERV-K zutrifft. Zusätzlich zu p27 sind bei dieser Probe schwache Banden bei 65 kDa (unprozessiertes Gag) sowie bei etwa 55 kDa erkennbar. Die schwache Bande bei 55 kDa ist zudem auch bei den Gag-Pro Mutanten und beim Ausgangskonstrukt erkennbar. Es könnte sich dabei um ein partielles Prozessierungsprodukt von Gag handeln oder um ein Protein, welches aus einer unbekanntem Leserahmenverschiebung entstand.

Die Mutation der *Slippery Sequenzen* eines HERV-K113 basierten Reportervirus und die dadurch veränderte Gag/ Pro/ Pol- Expression wurde im Vorfeld bereits einmal von C. Chudak untersucht [77]. Dabei wurden die Mutationen der *Slippery Sequenzen* jedoch in einem kodon-optimierten Vollängen-Moleklarklon von HERV-K113 vorgenommen und nicht, wie in dieser Arbeit, im Packaging-Plasmid. Das Expressionsmuster zeigte die erwarteten Banden bei 65

kDa, 95 kDa und 200 kDa für die Zellysate der mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten Zellen. Die Banden bei 27 kDa wurden jedoch nicht dargestellt.

Nach der Transfektion von HEK 293T Zellen mit den jeweiligen Slippery Site Konstrukten als Packaging-Plasmid wurden die Virus-enhaltenden Zellkulturüberstände bezüglich ihrer RT-Aktivität untersucht (s. Abb. 20). Als Vergleich wurden oriHERV Reporterviren eingesetzt, welche im Packaging-Plasmid keine Mutationen enthielten. Die hier gemessene RT-Aktivität fällt insgesamt im Vergleich zu vorherigen RT-Assays wesentlich schwächer aus, was an den oriHERV VLPs, die das Ausgangskonstrukt oricoGPP enthalten, ersichtlich wird. Die Schwankungen des absoluten Wertes können durch unterschiedliche Virusausbeuten in den Transfektionen erklärt werden. Abgesehen von den nicht-mutierten VLPs ist sowohl bei den Gag-Pro- als auch bei den Pro-Pol Slippery Site Mutanten keine Steigung der RT-Aktivität erkennbar. Lediglich die VLPs mit dem doppelt mutierten Packaging-Konstrukt (Gag-Pro-Pol Slippery Site Mutanten) zeigten eine um das 36-fache gesteigerte RT-Aktivität im Gegensatz zu den VLPs, die das Ausgangskonstrukt enthielten. In zuvor durchgeführten Versuchen zur Messung der RT-Aktivität bei ähnlichen Slippery Site Mutanten konnte herausgefunden werden, dass die Pro-Pol Slippery Site Mutante eine fast 300-fache RT-Aktivität wie die Kontroll-Reporterviren hatten und die Gag-Pro-Pol Slippery Site Mutanten zeigten dort eine Steigerung um den Faktor 40. Die Gag-Pro Slippery Site Mutanten zeigten eine 5-fach geringere RT-Aktivität [77]. Die etwa 40-fache Steigerung der RT-Aktivität der doppelt mutierten VLPs zur nicht-mutierten Kontrolle konnte in diesem Fall bestätigt werden, jedoch trifft dies für die Pro-Pol- und die Gag-Pro Slippery Site Mutanten nicht zu. Beim Einsatz der von C. Chudak generierten Slippery Site Konstrukte in Transfektionen und einer darauffolgenden RT-Aktivitätsmessung wurden diese mit den hier neu generierten Slippery Site Mutanten verglichen. Dabei konnten beide Fälle bestätigt werden: die VLPs, die das hier erstellte Gag-Pro-Pol Slippery Konstrukt enthielten sowie diejenigen, die das von C. Chudak erstellte Pro-Pol Slippery Konstrukt enthielten, zeigten die höchsten Werte in der RT-Aktivität (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt).

Zusätzlich zur RT-Aktivität wurde der p27 Gehalt der Slippery Site Mutanten ermittelt (s. Abb. 21). Dabei zeigten die Gag-Pro Slippery Mutanten keine Veränderung im p27 Gehalt, während dieser bei den Pro-Pol Slippery Mutanten etwa um das 3-fache und bei den Gag-Pro-Pol Mutanten um das Doppelte erhöht war. Dies war jedoch theoretisch nicht zu erwarten, da das Gag-Protein durch Translation des ersten offenen Leserahmens jeweils in gleichen Teilen synthetisiert werden sollte.

Für VLPs, welche das doppelt mutierte Packaging-Konstrukt enthielten, wurde anhand Elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt, dass diese aufgrund des großen unprozessierten Proteins keine reifen Viruspartikel bilden und möglicherweise die RT als Teil des Vorläuferproteins weitgehend inaktiv bleibt [77]. Daher wird von der weiteren Verwendung dieses Konstruktes abgesehen. Da ebenfalls gezeigt wurde, dass bei Pro-Pol Slippery Mutanten das Verhältnis von Gag zu Gag-Pro-Pol einen positiven Einfluss auf den Einbau der RT in die Partikel haben kann, wurde dieses Konstrukt in einem Titrationsexperiment zusammen mit oricoGPP und zwei unterschiedlichen Backbones eingesetzt (s. Abb. 22 – 24). Dabei wurden VLPs produziert, welche sich in ihrem Anteil von Pro-Pol Slippery Konstrukt zum Gesamt GPP Anteil unterschieden. Dies diente dazu, Partikel mit einem möglichst optimalen Verhältnis von Gag : Gag-Pro : Gag-Pro-Pol zu generieren. Doch weder bei der Messung der RT-Aktivität noch bei der Detektion der viralen RNA der dadurch produzierten VLPs konnten signifikante Unterschiede zu den VLPs, welche nur das originale oricoGPP enthielten, festgestellt werden. Allein die Messung des p27 Gehaltes dieser VLPs zeigte, dass in

denjenigen Überständen, welche die nicht-mutierten VLPs enthielten, das meiste p27 gemessen wurde.

Das Einsetzen verschiedener Slippery Site Konstrukte in die Virusproduktion konnte hinsichtlich der erwünschten Steigerung der RT-Aktivität keine Erfolge erzielen und somit nicht zur Optimierung der Virusproduktion beitragen. Das Verhältnis der Vorläuferproteine Gag : Gag-Pro : Gag-Pro-Pol scheint für die Assemblierung und Abkapselung der Viruspartikel sehr bedeutsam zu sein, weshalb es nicht gelang, Viruspartikel mit erhöhter RT-Aktivität aber gleichbleibender Partikel-Reife in ausreichenden Mengen zu produzieren. Es wurde demnach beschlossen, für die folgenden Infektionsversuche die oriHERV und HERV K_{CON} Reporterviren mit oricoGPP als Verpackungssequenz zu verwenden, da diese in der Partikelanzahl sowie in der RT-Aktivität ebenfalls gute Ergebnisse erzielten.

5.3 Charakterisierung der Viren für Infektionsversuche

Vergleichend zu den HERV-K basierten Reporterviren sollten für Infektionsversuche weitere Beta-Retroviren eingesetzt werden. Das Maus-Mammatumovirus (MMTV) wird prototypisch für Studien zu β -Retroviren verwendet, jedoch konnte das Virus dafür oftmals nicht in ausreichenden Mengen produziert werden aufgrund der Gewebsspezifität. Auch die Transfektion von Moleklarklonen in kultivierte Zellen brachte eine Zeit lang nicht die gewünschten Ergebnisse, wonach die Arbeitsgruppe um *Stanislav Indik* [62] 2014 ein MMTV-basiertes Vektorsystem entwickelte, mit dem es möglich ist, MMTV als infektiöse Virusähnliche Partikel (VLP's, *virus like particles*) in ausreichenden Mengen zu produzieren. Weiterhin wurde das Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV) anhand des Vollängenmoleklarklons pCMV2JS₂₁ in HEK 293T Zellen produziert, um auch diese in Infektionsversuche einsetzen zu können. Diese VLPs enthalten jedoch kein Reportergen.

Nach Produktion dieser vier verschiedenen Virustypen wurden die Virus-enthaltenden Zellkulturüberstände jeweils auf die RT-Aktivität untersucht (s. Abb. 26). Dabei zeigen die JSRV-Vollängenmoleklarklon VLPs die mit Abstand höchste RT-Aktivität. Die RT-Aktivität der HERV-K und MMTV Reporterviren liegt um mindesten 2 Log-Stufen unterhalb der JSRV Partikel. Trotz des zusätzlichen Packaging-Konstruktes und der CMV-Promoter scheint die RT-Aktivität der auf Vektor-Systemen basierten VLPs grundsätzlich geringer als die des Vollängenmoleklarklons von JSRV, welcher allerdings auch einen CMV-Promoter besitzt. Dargestellt sind in dieser Abbildung Ergebnisse der RT-Aktivitätsmessung Virus-enthaltender Zellkulturüberstände zweier verschiedener Transfektionsrunden. Die absoluten Werte unterscheiden sich zwischen den Transfektionen sogar teilweise um einige Log-Stufen. Auch in zuvor gezeigten RT-Aktivitätsmessungen verschiedener Transfektionen mit den oriHERV und HERV K_{CON} VLPs konnten jeweils zum Teil stark voneinander abweichende absolute Werte festgestellt werden (s. Abb. 14, 17). Dies hängt damit zusammen, dass die Menge an produzierten VLPs aus Transfektionen teilweise schwankte, was mit der Vitalität der Producer-Zellen aber auch mit den für die Transfektionen verwendeten Reagenzien zusammenhängen kann. Des Weiteren wurde für diese beiden Transfektionen, in denen die VLPs für die Infektionen produziert wurden, ein größeres Format (75 cm² Zellkulturflaschen) verwendet als für die vorherigen Transfektionen, um genügend Virus für die Infektionen zu erhalten.

Zur Charakterisierung der Virusüberstände, welche in die Infektionsversuche eingesetzt werden sollten, wurde weiterhin die Anzahl der vRNA Kopien bestimmt (s. Abb. 27), welche ein Maß für die Partikelanzahl darstellen sollte. Erwartungsgemäß konnten bei HERV K_{CON} VLPs verhältnismäßig viele vRNA Kopien gemessen werden, dies deutete sich schon in vorherigen Messungen an. Ferner konnten auch beim JSRV Vollängenmoleklarklon sehr

viele virale RNA Kopien detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass auch hier eine ausreichende Menge an Viruspartikeln produziert wurde. Nicht zu erwarten gewesen wäre jedoch, dass die Kopienzahlen von den oriHERV VLPs und besonders den MMTV VLPs so gering ausfallen. In zuvor dargestellten Messungen der vRNA Kopien konnte bereits festgestellt werden, dass in Überständen mit oriHERV VLPs wesentlich geringere Mengen an viraler RNA detektiert werden konnten als in denen mit HERV K_{CON} (s. Abb.12,15). Dabei war teilweise die Anzahl der HERV K_{CON} vRNA Kopien doppelt so hoch wie die der oriHERV vRNA Kopien. In dieser Messung jedoch wurde 38 mal mehr K_{CON} vRNA gemessen als oriHERV vRNA. Der hier gemessene Wert ist demnach nicht vertrauenswürdig, möglicherweise wurde zu wenig Template in die qPCR eingesetzt oder auch zu wenig Virusüberstand in die RNA Extraktion. Auch bei MMTV wurden mehr Kopienzahlen erwartet; zumindest wurde nicht so ein großer Unterschied zu HERV K_{CON} und JSRV erwartet. Durch kurzzeitige Lagerung der Virusüberstände bei 4°C könnte es möglicherweise dazu gekommen sein, dass die MMTV VLPs schneller als die anderen degradiert sind. Durch Detektion der p27 Konzentration der verschiedenen Virusansätze könnte herausgefunden werden, ob bei MMTV tatsächlich so wenig Viruspartikel gebildet wurden oder ob mehrere leere Partikel gebildet wurden, welche keine vRNA enthalten. Dies war jedoch nicht möglich, da für MMTV und JSRV keine spezifischen Antikörper zur p27 Detektion vorhanden waren. Um für alle vier Virustypen vergleichend den p27 Gehalt messen zu können, müsste beispielsweise p27 mit einem V5-Tag versehen werden, um im Westernblot eine relative Quantifizierung vornehmen zu können.. Voraussetzung wäre jedoch, dass der Tag nicht das Budding der Viren stören sollte.

Für die geplanten Infektionsversuche sollten CRFK Zellen mit den jeweiligen Virus-enthaltenden Zellkulturüberständen infiziert werden. Die humanen 293T Zellen sind aufgrund ihres Ursprungs nicht für die Infektion durch HERV-K VLPs geeignet, da in ihrem Genom schon HERV Sequenzen vorhanden sein können. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden demnach alle Infektionen in CRFK Zellen durchgeführt. Die Infektiosität von MMTV und JSRV gegenüber CRFK Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht (s. Abb. 28). Da der JSRV Moleklarklon kein Reportergen enthält, wurden dafür HIV-Reporterviren verwendet, welche mit dem JSRV Env pseudotypisiert waren.

Der spezifische Rezeptor, durch den der Viruseintritt von JSRV in die Zelle vermittelt wird, ist die Hyaluronidase-2 (Hyal2) [78], welche ubiquitär auftritt. Nach Infektion von CRFK Zellen mit den JSRV pseudotypisierten HIV-VLPs konnte eine Infektionsrate von gerade einmal 1,5 % der CRFK Zellen ermittelt werden. Eine erfolgreichere Infektion war mit dem Vollängenmoleklarklon pCMV2JS₂₁ in Schafzelllinien möglich [79]; diese stellen jedoch auch natürlicherweise die Wirtszellen dieses Virus dar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass JSRV ebenso dazu fähig ist, die humane Hyaluronidase-2 als Rezeptor für den Zelleintritt zu nutzen [80]. Möglicherweise ist die feline Hyal2 nicht optimal für den Zelleintritt von JSRV geeignet, weshalb hier nur eine so geringe Infektionsrate zu messen war. Eine Pseudotypisierung mit VSV-G könnte bessere Ergebnisse erzielen. Verglichen mit den VSV-G pseudotypisierten HIV Reporterviren konnten mittels JSRV coEnv nur 30 Mal weniger Zellen infiziert werden.

Im Normalfall benötigen retrovirale Infektionen die Interaktion zwischen viralem Envelope Protein und dem spezifischen zellulären Rezeptor. Das Glykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus (VSV-G) interagiert mit einer Phospholipid-Komponente der Zellmembran, um den Eintritt des Virus in die Zellmembran zu vermitteln durch Membranfusion. Viren, die mit dem VSV-G pseudotypisiert sind, sind demnach nicht auf spezifische zelluläre Rezeptoren angewiesen und haben einen extrem breiten Wirtszell-Bereich [81, 82]. Die mit VSV-G

pseudotypisierten MMTV Partikel waren hier jedoch nur in etwa 16 % der Fälle in der Lage, CRFK Zellen zu infizieren. Von 4×10^5 ausgesäten CRFK Zellen für die Infektion bedeutet dies, dass davon etwa 60.000 Zellen infiziert wurden. Mit dem gleichen Vektorsystem generierte MMTV Partikel zeigten bei Konstantoulas und Indik [62] einen Infektionstiter von 10^6 transduction units [TU]/ml in HeLa Zellen.

Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse zur Infektiosität war in den Infektionsversuchen auch nicht mit einer hohen Infektionseffizienz zu rechnen bei MMTV und JSRV. Auch für HERV-K ist dies nicht bekannt, die Infektion mit Integration konnte bisher nur in zwei Fällen mit einem rekonstituierten Virus gezeigt werden [46, 47].

5.4 Infektionsversuche

Die Fluoreszenzkontrolle der infizierten CRFK Zellen 48 Stunden nach der Infektion ließ erkennen, dass zumindest bei den mit MMTV-infizierten Zellen und den mit HERV K_{CON} infizierten Zellen die Infektion erfolgreich war und höchstwahrscheinlich auch eine Integration erfolgte (s. Abb. 35). Durch GFP-Expression in den infizierten Zellen ließ sich ermitteln, dass etwa 20 % der CRFK Zellen mit MMTV infiziert werden konnten, was sich in etwa mit dem Wert der Infektiositätsuntersuchung vergleichen lässt. Auch bei den mit HERV K_{CON} infizierten Zellen waren GFP-exprimierende Zellen im Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Hier war jedoch die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen wesentlich geringer. Auf der gesamten Platte waren nur vereinzelte, jedoch benachbarte Zellen zu finden. Die Tatsache, dass benachbarte Zellen GFP exprimieren ist ein Hinweis darauf, dass tatsächlich eine Integration ins Genom erfolgte und das Provirus an die Tochterzellen weitergegeben werden konnte. Lee und Bieniasz [47] zeigten ebenfalls eine Infektion von CRFK Zellen mit VSV-G pseudotypisierten HERV K_{CON} Partikeln. Dort konnte ein ebenso hoher Infektionstiter gemessen werden wie bei der Infektion von 293T Zellen, welcher ca. 1000 TU pro Milliliter Virus-enthaltenden Überstandes betrug. Bei den mit oriHERV infizierten Zellen konnten keine GFP-exprimierenden Zellen gefunden werden, somit erfolgte auch keine Integration ins zelluläre Genom. Möglicherweise wurde ein zu niedriger Virustiter in die Infektion eingesetzt; eine Konzentrierung des Virusüberstandes könnte zu besseren Infektionsraten führen.

Auf den jeweiligen Bildern der Negativkontrollen, also der Zellen, welche mit hitze-inaktiviertem Virusüberstand versetzt wurden, kann keine GFP-Expression der Zellen festgestellt werden. Dies lässt eine mögliche Plasmidverschleppung und eine damit einhergehende falsch-positive GFP-Expression ausschließen.

Die GFP-exprimierenden Zellen nach HERV- K_{CON} Infektion ließen sich nur im ersten Infektionsversuch nachweisen, konnten jedoch im zweiten Infektionsexperiment, welches unter den gleichen Bedingungen stattfand, nicht reproduziert werden.

Der Nachweis viraler RT-Produkte in den infizierten Zellen sollte Aufschluss darüber bringen, in wie weit der virale Replikationszyklus bzw. die post-entry Prozesse in der Zelle stattfinden und an welcher Stelle möglicherweise diese Prozesse durch Inhibition abgebrochen werden. Durch Amplifizierung und Quantifizierung der Minusstrang Strong Stop DNA, welche in der frühen Phase der Reversen Transkription synthetisiert wird, konnte bei CRFK Zellen, die mit den VSV-G pseudotypisierten oriHERV, HERV- K_{CON} und MMTV sowie JSRV infiziert waren, retrotranskribierte DNA identifiziert werden (*early* RT-Produkte, s. Abb. 36 – 38). Für Zellen, die mit HERV K_{CON} infiziert wurden, konnten mit etwa 100 Kopien pro Zelle die meisten frühen RT-Produkte nachgewiesen werden, und dies direkt nach der Spinokulation. In vorhergehenden Versuchen zur Charakterisierung der HERV- K_{CON} Reporterviren deutete sich bereits an, dass bei diesen Reporterviren scheinbar eine sehr effiziente Partikelproduktion

erfolgte, was unter anderem durch hohe vRNA Kopienzahlen in den Virusüberständen ersichtlich wurde. So konnten möglicherweise mehrere Viruspartikel eine Zelle infizieren. Aber auch die verhältnismäßig hohe Aktivität der Reversen Transkriptase trägt bei diesen Reporterviren ihren Teil dazu bei, dass hier eine hohe Anzahl an Kopien der early RT-Produkte detektiert werden konnte. Auch bei den mit oriHERV VLPs infizierten Zellen konnten mit etwa 60 Kopien pro Zelle mehrere early RT-Produkte nachgewiesen werden zum Zeitpunkt 0. Da es in der vorherigen Charakterisierung Hinweise auf eine nicht so effiziente Partikelbildung und geringere RT-Aktivität als bei den HERV-K_{CON} VLPs gab, könnte dies die etwas geringere Kopienzahl in diesem Fall rechtfertigen. Auch Kramer *et al.* konnten bereits zeigen, dass in CRFK Zellen, welche mit VSV-G pseudotypisierten HML-2 Partikeln infiziert wurden, Kopien der early RT-Produkte nachweisbar waren [59]. Bei den mit MMTV und JSRV infizierten Zellen allerdings ließen sich weitaus weniger Kopien der frühen RT-Produkte mittels qPCR nachweisen; im Vergleich zu den HERV K_{CON} infizierten Zellen sind dies 70-fach weniger Kopien. Dass die JSRV Partikel Schwierigkeiten bei der Infektion und dem Entry von CRFK Zellen haben, wurde mit der Infektiositätsuntersuchung (s. Abb. 28) bereits gezeigt. Möglicherweise wurden also nur sehr wenige Zellen mit einer geringen Anzahl an Viruspartikeln infiziert, was eine geringe Kopienzahl der RT-Produkte erklärt. Da die MMTV Partikel mit VSV-G pseudotypisiert waren, sollte die geringere Kopienzahl hier nicht vom Entry in die Zelle abhängen. Allerdings wurde im Vorfeld bei der Charakterisierung der VLPs gezeigt, dass trotz einer guten RT-Aktivität nur sehr wenige virale RNA Kopien in den Virusüberständen messbar waren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass entweder sehr wenige MMTV Partikel produziert wurden oder auch leere Capside gebildet worden sind. Bei allen infizierten Zellen, außer bei den mit MMTV infizierten Zellen, wurden die meisten Kopien direkt nach der Spinokulation gemessen. Die Reverse Transkriptase zeigt demnach auch bei 4°C eine geringe Aktivität, sodass über den Zeitraum von 2 Stunden genügend messbare RT-Produkte synthetisiert werden konnten. Möglicherweise könnte zusätzlich auch der Prozess der Ernte der Zellen zu lange gedauert haben. Sechs Stunden nach der Infektion verringert sich bei den mit HERV und JSRV infizierten Zellen die messbare Kopienzahl der frühen RT-Produkte, außer bei den mit MMTV infizierten Zellen. Dort ist ein Peak nach 6 Stunden zu sehen. Bei Experimenten in der eigenen Arbeitsgruppe zur Messung der early und late RT-Produkte bei oriHERV und HERV K_{CON}-infizierten CRFK Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass bei den infizierten Zellen nach 6 Stunden die meisten Kopien der RT-Produkte zu messen waren (*unpublished data* [83]). Nach 48 Stunden waren bei allen infizierten Zellen keine frühen RT-Produkte mehr zu messen. Theoretisch müsste mit dem hier verwendeten Primer-Sonden Set für die early RT-Produkte sogar ein Teil der proviralen DNA messbar sein, d.h. auch nach 48 Stunden sollten diese RT-Produkte nachweisbar sein. Höchstwahrscheinlich kommt es jedoch zur Degradation eines Teils der frühen RT-Produkte, weshalb diese nach einiger Zeit nicht mehr nachzuweisen sind. Bei Versuchen zu HIV-1 konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden [84, 85]. Betrachtet man weiterhin die Abbildungen zur Messung der early RT-Produkte so fällt auf, dass auch einige Kopien in den hitze-inaktivierten Kontrollen messbar waren. Da in diesen Proben die Zellen mit hitze-inaktiviertem Virusüberstand versetzt wurden, sollte es nicht zur Infektion dieser Zellen gekommen sein und eine Reverse Transkription sollte ebenfalls nicht erfolgen in diesen Zellen. Auch wenn ein deutlicher Unterschied zwischen den Kopienzahlen der infizierten und der hitze-inaktivierten Proben besteht, konnten dennoch einige Kopien gemessen werden. Dies lässt entweder darauf schließen, dass die Hitzeinaktivierung der Virusüberstände mit 65°C über 30 Minuten nicht ausreichend war und noch aktive Viruspartikel sich in den Überständen befanden, oder aber die detektierten Kopienzahlen sind auf eine Plasmidverschleppung zurückzuführen, welche trotz DNase

Behandlung im Voraus nicht ausgeschlossen werden kann. Bei der Fluoreszenzkontrolle nach 48h hätte dann aber auch vereinzelt in den Negativkontrollen GFP-Expression beobachtet werden müssen.

Für die mit oriHERV, HERV K_{CON}, MMTV und JSRV infizierten CRFK Zellen konnten ebenfalls die late RT-Produkte mittels einer qPCR, bei welcher die U5-Region mit PBS und Psi amplifiziert wurden, nachgewiesen werden (s. Abb. 39 – 41). Diese Produkte entstehen nach Komplettierung der Reversen Transkription, d.h. die komplette virale dsDNA kann im Cytoplasma nachgewiesen werden, bevor der nukleare Import erfolgt. Die Anzahl der Kopien der RT-Produkte in den jeweiligen infizierten Zellen deckt sich nahezu mit denen der early RT-Produkte. Auch hier zeigen Zellen, die mit HERV K_{CON} infiziert wurden, die meisten Kopien pro Zelle, wohingegen bei Zellen, die mit JSRV oder MMTV infiziert wurden, weitaus weniger Kopien nachgewiesen werden konnten. Die Anzahl der Kopien der RT-Produkte in der Zelle reduziert sich wiederum im Laufe der Zeit, bis nach 48 Stunden keine Kopien mehr zu messen sind. Es kommt somit auch hier zur Degradation eines Teils der RT-Produkte in der Zelle. Anders als in zuvor durchgeführten Versuchen in der Arbeitsgruppe (*unpublished data* [83]), bei denen gezeigt wurde, dass nach 6 Stunden die meisten späten RT-Produkte zu messen waren, konnten hier die meisten Kopien schon direkt nach der Spinokulation detektiert werden. Insgesamt wurden jedoch bei den vorigen Experimenten weitaus weniger Kopien pro Zelle gemessen. Butler *et al.* konnten mittels RT-Produkt-spezifischer qPCR bei mit HIV-1 infizierten 293T Zellen ein Maximum an späten RT-Produkten 12 Stunden nach der Infektion nachweisen, dies waren 20 Kopien pro Zelle [86].

Nach der Synthese des DNA Doppelstranges durch die Reverse Transkriptase formt sich ein Teil der Kopien, die nicht ins Genom integrieren, zu zirkulären Strukturen, den 1- und 2-LTR circles. Diese sind Nebenprodukte der Reversen Transkription und haben keine weitere Aufgabe für die virale Replikation. Bei den 2-LTR circles lagern sich beide LTRs hintereinander und bilden eine U3-R-U5-U3-R-U5 Abfolge, während sich bei den 1-LTR circles eine LTR deletiert und ein einzelnes U3-R-U5 Motiv bleibt. Auch diese RT-Produkte sollten in den hier infizierten Zellen nachgewiesen werden mittels spezifischer real-time PCR. Bei den mit oriHERV und HERV K_{CON} infizierten CRFK Zellen konnten mit der real-time PCR jedoch keine 2-LTR circles Kopien detektiert werden, während die zugehörigen Standardreihen dafür gut zu detektieren waren mit den spezifischen Primer-Sonden Kombinationen. Bei den mit MMTV und JSRV infizierten Zellen konnten mittels real-time PCR zunächst auch keine Kopien für 2-LTR circles quantifiziert werden. Anhand der Amplifikationskurven der real-time PCRs konnten jedoch nahe der Detektionsgrenze, bei hohen CT-Werten, positive Fluoreszenzsignale beobachtet werden bei einzelnen Proben (s. Abb. 44). Um zu bestätigen, dass es sich dabei tatsächlich um positive Proben handelt, wurden diese in eine *droplet digital PCR* eingesetzt, zusammen mit der jeweils spezifischen MMTV bzw JSRV 2-LTR circles Standardreihe als Positivkontrolle (s. Abb. 45, 46). In den drei eingesetzten Proben (in Duplikaten eingesetzt) konnten tatsächlich vereinzelt positive Droplets gemessen werden. Davon zeigt eine Probe (JSRV 48h, Infektion 1) von 14.000 Droplets drei positive, die jedoch eine nahe des Schwellenwertes befindliche Fluoreszenz aufweisen, weshalb diese höchstwahrscheinlich als falsch positiv angesehen werden können. Bei den anderen Proben (MMTV und JSRV 48h, Infektion 2) konnten von etwa 14.000 generierten Droplets jeweils drei (JSRV) bzw. 13 (MMTV) positive Droplets detektiert werden, welche auch in ihrer Fluoreszenz weit oberhalb des Schwellenwertes lagen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dies tatsächlich positive 2-LTR Kopien sind. Ginge man bei JSRV davon aus, dass wirklich nur 1,5% der eingesetzten Zellen infiziert wurden, so würde dies theoretisch bedeuten, dass bei 100 ng in

die ddPCR eingesetzter DNA, was etwa 16.600 Zelläquivalenten entspricht, etwa 250 infizierte Zellen zu messen sein müssten. Diese Anzahl müsste auf jeden Fall mittels PCR detektierbar sein. Einerseits wurde jedoch die Infektiosität mit HIV-1 Core gemessen, das heißt, dass die Infektionseffizienz mit dem Vollängenmoleklarklon von JSRV möglicherweise noch geringer ausfällt. Weiterhin werden nicht alle viralen Kopien dann auch zu 2-LTR circles umgeformt, was eine noch geringere Zahl an potentiell messbaren Kopien erzeugt. Auch bei den mit HIV-1 infizierten 293T Zellen konnten 2-LTR circles nachgewiesen werden [86]. Dabei wurde die höchste Anzahl Kopien nach 24 Stunden gemessen, was 0,7 Kopien pro Zelle waren. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass in den Zellen ein Verhältnis von 9:1 von 1-LTR circles zu 2-LTR circles vorherrschte. Möglicherweise hätte auch bei den hier infizierten Zellen eine Ernte nach 24 Stunden erfolgen sollen, da die LTR circles mit der Zeit degradieren und auch in den Protokollen von Mbisa *et al.* [10] sowie Butler *et al.* [86] jeweils der Maximalwert für die LTR cricles-Messungen immer nach 24 Stunden vorlag.

Die Messung der 1-LTR circles stellte sich als schwierig heraus, da ohne das Vorhandensein einer spezifischen Sonde für die qPCR auf eine SYBR Green qPCR zurückgegriffen werden musste. Obwohl die spezifischen Standardreihen (in H₂O) für MMTV und JSRV gut gelaufen sind in der SYBR Green PCR, konnte bei Einsetzen der Proben kein Protokoll etabliert werden, womit die Messung der Proben ohne Nebenprodukte und somit die Quantifizierung ermöglicht werden konnte.

Zuletzt wurden die mit oriHERV, HERV K_{CON}, MMTV und JSRV infizierten Zellen hinsichtlich vorhandener integrierter Proviren in spezifischen real-time PCRs untersucht. Dabei konnte bei keiner der Zellen provirale DNA nachgewiesen werden. Aufgrund der zuvor durchgeführten Fluoreszenzkontrolle 48h nach der Infektion wurde zumindest für die mit MMTV infizierten Zellen erwartet, dass integrierte Proviren nachzuweisen sind. Konstantoulas und Indik [62] konnten mithilfe der Vektor-basierten MMTV Partikel, wie sie auch hier verwendet wurden, eine Integration dieser Viren ins Genom von 293T Zellen nachweisen. Normalerweise kann die virale DNA von Beta-Retroviren nicht in den Zellkern importiert werden, dies kann nur geschehen bei sich teilenden Zellen. Bei MMTV jedoch konnte nachgewiesen werden, dass ein Import in den Zellkern bei ruhenden Zellen TNPO3-unabhängig erfolgt [62]. In den hier durchgeführten Infektionen wurden keine humanen Zellen verwendet, jedoch konnte die Integration theoretisch während der Zellteilungen erfolgen.

Für HIV-1 infizierte Zellen konnten im Vergleich hierzu integrierte Proviren nachgewiesen werden. Diese waren nach etwa 24 Stunden nach der Infektion messbar und erreichten ein Plateau nach 48 Stunden, mit etwa 0,4 Kopien pro Zelle [86].

Auch bei JSRV wurde aufgrund des Wildtyp-ähnlichen Virus, welches ein korrektes Verhältnis von Strukturproteinen zu enzymatischer Aktivität aufweisen sollte, eine nachweisbare Integration erwartet. Die schlechte Infektionseffizienz CRFK Zellen gegenüber könnte jedoch ein Grund dafür sein, dass die Integration nicht nachweisbar war.

Die Fähigkeit rekonstituierter VSV-G pseudotypisierter HERV-K(HML-2) Partikel zur Integration ins Zellgenom wurde bisher in einigen wenigen Fällen beschrieben [46, 47, 87]. Größtenteils sind jedoch HML-2 basierte VLPs nicht mehr in der Lage, bis zur Integration voranzuschreiten, da durch zelluläre Restriktionsfaktoren während des post-entry/ pre-integration Prozesses eine Inhibition erfolgt. Für die mit HERV-K infizierten Zellen konnte mit den hier durchgeführten Versuchen nachgewiesen werden, dass in der Zelle die Reverse Transkription von HERV-K erfolgt, denn es konnten für die frühen wie auch späten RT-Produkte Kopien detektiert werden, jedoch nicht LTR-circles oder integrierte Proviren.

Demzufolge ereignet sich eine zelluläre Restriktion nach der Reversen Transkription, aber vor der Bildung zirkulärer oder proviraler DNA in den CRFK Zellen. Für M-PMV, ein verwandtes Beta-Retrovirus, wurde ähnliches in bestimmten murinen Zelllinien nachgewiesen [88]. Während in einer humanen Zelllinie integrierte Proviren nachzuweisen waren, war dies in mehreren Maus-Zelllinien nicht der Fall, was auf eine Restriktion in den Mauszellen schließen lässt, welche sich post-entry nach der Reversen Transkription ereignet.

Für HERV-K ist bisher bekannt, dass der Restriktionsfaktor TRIM5 α , welcher bei HIV-1 das Uncoating inhibiert, auf HERV-K keinen Einfluss hat. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch APOBEC3G, wenn überhaupt, nur einen geringen Effekt auf die Infektiosität der VLPs hat, während APOBEC3F diese um Faktor 50 reduzierte [47]. Die Aktivität der zellulären Restriktionsfaktoren kann durch Ko-Infektion eines weiteren HERV-K Virus teilweise umgangen werden. Dies führt zu einem Überschuss an viralen Targets, an welche die Restriktionsfaktoren binden, was dann die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Infektion steigert. Kramer *et al.* zeigten, dass bei Ko-Infektion von CRFK Zellen mit VSV-G pseudotypisierten HML-2- GFP Reporterviren und HML-2 basierten Luciferase Reporterviren die Infektionseffizienz signifikant erhöht wurde [59]. Die höchste Effizienz konnte dabei erreicht werden, wenn zusätzlich zu den HML-2 Luciferase VLPs 100-mal mehr HML-2 GFP VLPs in die Infektion eingesetzt wurden. Die gleichen Resultate wurden erzielt, als dieser Versuch in der Arbeitsgruppe wiederholt wurde (*unpublished data*, [83]), wobei sich ab einer bestimmten Menge an überschüssigem Virus die Infektiosität nicht mehr steigerte.

Zusammengenommen bedeutet dies, dass in der Zelle spezifische Restriktionsmechanismen mit sättigbaren Restriktionsfaktoren gegenüber HERV-K erfolgen, da nur durch Konkurrenz weiterer HERV-K(HML-2) Viren, jedoch nicht anderer Retroviren, die Infektion der Zielzellen signifikant erhöht wird.

6. Ausblick

Die Infektion mit HERV-K_{CON} sollte so wiederholt werden, dass die GFP-Expression der infizierten Zellen reproduziert werden kann. Das Infektionsprotokoll muss dahingehend optimiert werden, dass zuverlässige und stabile Infektionseffizienzen erreicht werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Dies kann z.B. durch Änderung der Temperatur bei der Spinokulation, Variation des Zeitpunkts der Infektion oder Aufreinigung der VLPs durch Ultrazentrifugation durch ein Sucrose-Kissen getestet werden. Weiterhin sollen für Infektionen andere Zelltypen hinzugezogen werden (z.B. CHO-Zellen, BHK-Zellen), um diese hinsichtlich ihrer Permissivität und Eignung für die Infektionen zu testen und zu vergleichen. Ferner kann die Bestimmung zusätzlicher Erntezeitpunkte nach der Infektion (z.B. 24h p.I.) eine genauere Charakterisierung der post-entry Inhibition ermöglichen.

Weiterhin sollen zukünftig VSV-G pseudotypisierte JSRV Partikel generiert werden, um ein besseres Entry zu gewährleisten. Eine Möglichkeit, die Infektion von JSRV in verschiedene Zelltypen zu verfolgen, wäre, ein Reporter gen in die JSRV-Sequenz einzubringen, damit anhand von GFP-Expression wie bei HERV-K(HML-2) und MMTV eine erfolgreiche Infektion gezeigt werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass mittels droplet digital PCR die Detektion von 2-LTR circles möglich war. Eine Optimierung des ddPCR-Protokolls kann erreicht werden, indem die für die jeweiligen Primer optimalen Annealing Temperaturen mittels eines Gradienten getestet werden, denn die Adaptation von real-time PCR Bedingungen an die der ddPCR ist nicht in jedem Falle optimal. Des Weiteren sollen auch für die anderen RT-Produkte spezifische ddPCRs etabliert werden, um diese dann auch dort analysieren zu können, im Vergleich zur *TaqMan* real-time PCR.

Für die Messung der Kopien der 1-LTR circles ist es notwendig, eine Sonde zu designen und diese dann in die real-time PCR einzusetzen, da die SYBR Green qPCR nicht die gewünschten Erfolge brachte und eine Quantifizierung nicht möglich war.

7. Literaturverzeichnis

1. Modrow, S., et al., *Molecular virology*. 2013: Springer.
2. Kurth, R. and N. Bannert, *Retroviruses: molecular biology, genomics and pathogenesis*. 2010: Horizon Scientific Press.
3. van Regenmortel, M.H., et al., *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2000: Academic Press.
4. Barré-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 868-871.
5. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980. **77**(12): p. 7415-7419.
6. Malim, M.H. and P.D. Bieniasz, *HIV restriction factors and mechanisms of evasion*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012: p. a006940.
7. Nisole, S., J.P. Stoye, and A. Saïb, *TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence*. *Nature Reviews Microbiology*, 2005. **3**(10): p. 799.
8. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 848.
9. Butler, S.L., M.S.T. Hansen, and F.D. Bushman, *A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo*. *Nature Medicine*, 2001. **7**: p. 631.
10. Mbisa, J.L., et al., *Real-time PCR analysis of HIV-1 replication post-entry events*. *Methods Mol Biol*, 2009. **485**: p. 55-72.
11. Bittner, J.J., *Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice*. *Science (New York, NY)*, 1936. **84**(2172): p. 162-162.
12. Dzuris, J.L., T.V. Golovkina, and S.R. Ross, *Both T and B cells shed infectious mouse mammary tumor virus*. *Journal of virology*, 1997. **71**(8): p. 6044-6048.
13. Holt, M., E. Shevach, and G. Punkosdy, *Endogenous mouse mammary tumor viruses (mtv): new roles for an old virus in cancer, infection, and immunity*. *Frontiers in oncology*, 2013. **3**: p. 287.
14. Mertz, J.A., et al., *Mouse mammary tumor virus encodes a self-regulatory RNA export protein and is a complex retrovirus*. *Journal of virology*, 2005. **79**(23): p. 14737-14747.
15. Marrack, P., E. Kushnir, and J. Kappler, *A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumour virus*. *Nature*, 1991. **349**(6309): p. 524.
16. Demartini, J.C., R.H. Rosadio, and M.D. Lairmore, *The etiology and pathogenesis of ovine pulmonary carcinoma (sheep pulmonary adenomatosis)*. *Veterinary microbiology*, 1988. **17**(3): p. 219-236.
17. Caporale, M., et al., *Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep*. *J Virol*, 2006. **80**(16): p. 8030-7.
18. Palmarini, M., et al., *Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep*. *Journal of virology*, 1999. **73**(8): p. 6964-6972.
19. Smit, A.F., *Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes*. *Current opinion in genetics & development*, 1999. **9**(6): p. 657-663.
20. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 2001. **409**(6822): p. 860-922.
21. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. *science*, 2001. **291**(5507): p. 1304-1351.
22. Boeke, J. and J. Stoye, *Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements*. 1997.
23. Bannert, N. and R. Kurth, *The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006. **7**: p. 149-73.
24. Tristem, M., *Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database*. *Journal of virology*, 2000. **74**(8): p. 3715-3730.
25. Johnson, W.E. and J.M. Coffin, *Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(18): p. 10254-10260.

26. Callahan, R., et al., *Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. **79**(18): p. 5503-5507.
27. Ono, M., et al., *Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome*. Journal of virology, 1986. **60**(2): p. 589-598.
28. Löwer, R., J. Löwer, and R. Kurth, *The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(11): p. 5177-5184.
29. Subramanian, R., et al., *Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses*. Retrovirology, 2011.
30. Löwer, R., et al., *A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cells*. Virology, 1993. **192**(2): p. 501-511.
31. Armbruster, V., et al., *A novel gene from the Human Endogenous Retrovirus K expressed in transformed cells* Clinical Cancer Research, 2002.
32. Kurth, R. and N. Bannert, *Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses*. International journal of cancer, 2010. **126**(2): p. 306-314.
33. Ehlhardt, S., et al., *Human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) Rec expression and transcriptional activities in normal and rheumatoid arthritis synovia*. The Journal of rheumatology, 2006. **33**(1): p. 16-23.
34. Fuchs, N.V., et al., *Human endogenous retrovirus K (HML-2) RNA and protein expression is a marker for human embryonic and induced pluripotent stem cells*. Retrovirology, 2013. **10**(1): p. 115.
35. Büscher, K., et al., *Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines*. Melanoma research, 2006. **16**(3): p. 223-234.
36. Mi, S., et al., *Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 785.
37. Blond, J.-L., et al., *An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor*. Journal of virology, 2000. **74**(7): p. 3321-3329.
38. Löwer, R., et al., *Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses*. Journal of General Virology, 1984. **65**(5): p. 887-898.
39. Muster, T., et al., *An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells*. Cancer research, 2003. **63**(24): p. 8735-8741.
40. Wildschutte, J.H., et al., *The distribution of insertionally polymorphic endogenous retroviruses in breast cancer patients and cancer-free controls*. Retrovirology, 2014. **11**(1): p. 62.
41. Douville, R., et al., *Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. Annals of neurology, 2011. **69**(1): p. 141-151.
42. Büscher, K., et al., *Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines*. Cancer research, 2005. **65**(10): p. 4172-4180.
43. Schmitt, K., et al., *Transcriptional profiling of human endogenous retrovirus group HERV-K (HML-2) loci in melanoma*. Genome biology and evolution, 2013. **5**(2): p. 307-328.
44. Galli, U.M., et al., *Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors*. Oncogene, 2005. **24**(19): p. 3223.
45. Chen, T., et al., *The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating β -catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells*. Leukemia, 2013. **27**(7): p. 1469.
46. Dewannieux, M., et al., *Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements*. Genome Res, 2006. **16**(12): p. 1548-56.
47. Lee, Y.N. and P.D. Bieniasz, *Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus*. PLoS Pathog, 2007. **3**(1): p. e10.
48. Turner, G., et al., *Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans*. 2001.
49. Moyes, D.L., et al., *The distribution of the endogenous retroviruses HERV-K113 and HERV-K115 in health and disease*. Genomics, 2005. **86**(3): p. 337-341.
50. Garcia-Montojo, M., et al., *Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review*. Critical reviews in microbiology, 2018: p. 1-24.

51. Hohn, O., K. Hanke, and N. Bannert, *HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 246.
52. Bannert, N. and R. Kurth, *Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14572-9.
53. Wang, Y., et al., *Comparative studies of frameshifting and nonframeshifting RNA pseudoknots: a mutational and NMR investigation of pseudoknots derived from the bacteriophage T2 gene 32 mRNA and the retroviral gag-pro frameshift site*. Rna, 2002. **8**(8): p. 981-996.
54. Jacks, T., et al., *Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region*. Cell, 1988. **55**(3): p. 447-458.
55. Harger, J.W., A. Meskauskas, and J.D. Dinman, *An 'integrated model' of programmed ribosomal frameshifting*. Trends in biochemical sciences, 2002. **27**(9): p. 448-454.
56. Giedroc, D.P., C.A. Theimer, and P.L. Nixon, *Structure, stability and function of RNA pseudoknots involved in stimulating ribosomal frameshifting*. Journal of molecular biology, 2000. **298**(2): p. 167-185.
57. Marcheschi, R.J., D.W. Staple, and S.E. Butcher, *Programmed ribosomal frameshifting in SIV is induced by a highly structured RNA stem-loop*. Journal of molecular biology, 2007. **373**(3): p. 652-663.
58. Hohn, O., et al., *Development of an antigen-capture ELISA for the detection of the p27-CA protein of HERV-K (HML-2)*. Journal of virological methods, 2016. **234**: p. 186-192.
59. Kramer, P., et al., *The human endogenous retrovirus K (HML-2) has a broad envelope-mediated cellular tropism and is prone to inhibition at a post-entry, pre-integration step*. Virology, 2016. **487**: p. 121-128.
60. Hanke, K., et al., *The Rec protein of HERV-K (HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT)*. International journal of cancer, 2013. **132**(3): p. 556-567.
61. Chudak, C., et al., *Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K (HML-2)*. Retrovirology, 2013. **10**(1): p. 140.
62. Konstantoulas, C.J. and S. Indik, *Mouse mammary tumor virus-based vector transduces non-dividing cells, enters the nucleus via a TNPO3-independent pathway and integrates in a less biased fashion than other retroviruses*. Retrovirology, 2014. **11**: p. 34.
63. Stewart, S.A., et al., *Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells*. Rna, 2003. **9**(4): p. 493-501.
64. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method*. methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
65. Hindson, B.J., et al., *High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number*. Analytical chemistry, 2011. **83**(22): p. 8604-8610.
66. Malnati, M.S., et al., *A universal real-time PCR assay for the quantification of group-M HIV-1 proviral load*. Nature protocols, 2008. **3**(7): p. 1240.
67. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the national academy of sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
68. Vermeire, J., et al., *Quantification of reverse transcriptase activity by real-time PCR as a fast and accurate method for titration of HIV, lenti-and retroviral vectors*. PloS one, 2012. **7**(12): p. e50859.
69. Horie, M., et al., *Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes*. Nature, 2010. **463**(7277): p. 84.
70. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature, 1970. **227**(5259): p. 680.
71. Hohn, O., et al., *Development of an antigen-capture ELISA for the detection of the p27-CA protein of HERV-K(HML-2)*. J Virol Methods, 2016. **234**: p. 186-92.
72. Holloway, J.R., et al., *Gorillas have been infected with the HERV-K (HML-2) endogenous retrovirus much more recently than humans and chimpanzees*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019: p. 201814203.
73. Beimforde, N., et al., *Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113*. Virology, 2008. **371**(1): p. 216-25.
74. Kofman, A., et al., *HIV-1 gag expression is quantitatively dependent on the ratio of native and optimized codons*. Tsitologija, 2003. **45**(1): p. 86-93.
75. Hohn, O., et al., *CMV-promoter driven codon-optimized expression alters the assembly type and morphology of a reconstituted HERV-K (HML-2)*. Viruses, 2014. **6**(11): p. 4332-4345.

76. Shehu-Xhilaga, M., S.M. Crowe, and J. Mak, *Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity*. Journal of virology, 2001. **75**(4): p. 1834-1841.
77. Chudak, C., *Expression und zelluläre Kontrollmechanismen der Replikation humaner endogener Retroviren* 2008.
78. Rai, S.K., et al., *Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(8): p. 4443-4448.
79. Palmarini, M., et al., *In vitro infection of ovine cell lines by Jaagsiekte Sheep Retrovirus*. J Virol, 1999.
80. Miller, A.D. *Hyaluronidase 2 and its intriguing role as a cell-entry receptor for oncogenic sheep retroviruses*. in *Seminars in cancer biology*. 2008. Elsevier.
81. Mastromarino, P., et al., *Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH*. Journal of General Virology, 1987. **68**(9): p. 2359-2369.
82. Burns, J.C., et al., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(17): p. 8033-8037.
83. Hohn, O., et al., *Characterisation of the post entry inhibition of reconstituted HML-2 viruses*. 2018.
84. Lu, G., et al., *HIV-1 infection is blocked at an early stage in cells devoid of mitochondrial DNA*. PloS one, 2013. **8**(10): p. e78035.
85. Anderson, J.L. and T.J. Hope, *APOBEC3G restricts early HIV-1 replication in the cytoplasm of target cells*. Virology, 2008. **375**(1): p. 1-12.
86. Butler, S.L., M.S. Hansen, and F.D. Bushman, *A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo*. Nature medicine, 2001. **7**(5): p. 631.
87. Brady, T., et al., *Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus*. Genes Dev, 2009. **23**(5): p. 633-42.
88. Wang, G.Z. and S.P. Goff, *Postentry restriction of Mason-Pfizer monkey virus in mouse cells*. Journal of virology, 2015. **89**(5): p. 2813-2819.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenie der Retroviren..	6
Abb. 2: struktureller Aufbau eines Retroviruspartikels am Beispiel von HIV-1	7
Abb. 3: RNA-Genom eines infektiösen Viruspartikels	8
Abb. 4: Replikationszyklus eines Retrovirus	10
Abb. 5: Reversen Transkription am Beispiel von HIV-1	12
Abb. 6: genomische Organisation der β -Retroviren	13
Abb. 7: Integrationszeitpunkte ausgewählter HERV Familien. [23]	15
Abb. 8: genomische Organisation eines HERV-K(HML-2) Provirus	18
Abb. 9: Prinzip des PERT Assays	37
Abb. 10: verschiedene Reportervirussysteme	45
Abb. 11: mit CMV oriEGFP bzw. K _{CON} -GFP transfizierte, GFP-exprimierende 293T Zellen	46
Abb. 12: cDNA Kopien verschiedener Reporterviren	47
Abb. 13: p27 Konzentration der verschiedenen Reporterviren	48
Abb. 14: RT-Aktivität der verschiedenen Reporterviren	49
Abb. 15: cDNA Kopien von oriHERV bzw. HERV K _{CON} Reporterviren mit variierendem Anteil an oricoGPP	50
Abb. 16: p27 Konzentration der Reporterviren mit variierendem Anteil an zugesetztem oricoGPP	51
Abb. 17: RT-Aktivität der Reporterviren mit variierendem Anteil an zugesetztem oricoGPP	52
Abb. 18: Konstruktion der Slippery Site Konstrukte	53
Abb. 19: zelluläre Expression der verschiedenen Gag-Vorläuferproteine	54
Abb. 20: RT-Aktivität der mutierten Reportervirus-Partikel	55
Abb. 21: p27 Gehalt der Slippery Site Mutanten VLPs	56
Abb. 22: cDNA Kopien in VLPs mit unterschiedlichen Anteilen der Pro-Pol Slippery Site Mutante	57
Abb. 23: RT-Aktivität der VLPs mit unterschiedlichen Anteilen der Pro-Pol Slippery Site Mutante	58
Abb. 24: p27 Gehalt der VLPs mit unterschiedlichen Anteilen der Pro-Pol Slippery Site Mutante	59
Abb. 25: MMTV-Vektorsystem und JSRV Vollängenkonstrukt pCMV2JS ₂₁	60
Abb. 26: RT-Aktivität der für die Infektionsversuche eingesetzten Virusüberstände	61
Abb. 27: cDNA Kopien der VLPs für den Infektionsversuch	62
Abb. 28: GFP-exprimierende CRFK und HEK 293T Zellen	63
Abb. 29: Primerdesign MMTV	64
Abb. 30: Primerdesign JSRV	65
Abb. 31: Agarosegel der MMTV und JSRV-Primer Test-PCR	66
Abb. 32: Gradienten PCR	67
Abb. 33: Standardkurven für MMTV	68
Abb. 34: Standardkurven für JSRV	69
Abb. 35: GFP-Expression infizierter CRFK Zellen 48h p.i.	71
Abb. 36: HERV spezifische real-time PCR für die early RT-Produkte (Set A)	72

Abb. 37: MMTV-spezifische real-time PCR für die early RT-Produkte (Set A).....	73
Abb. 38: JSRV-spezifische real-time PCR für die early RT-Produkte (Set A)	74
Abb. 39: HERV spezifische real-time PCR für die late RT-Produkte (Set D).....	75
Abb. 40: MMTV-spezifische real-time PCR für die late RT-Produkte (Set D).....	76
Abb. 41: JSRV-spezifische real-time PCR für die late RT-Produkte (Set D)	76
Abb. 42: HERV 2-LTR circles RT-Produkte und integrierte Proviren (Set F, G).....	77
Abb. 43: MMTV- bzw. JSRV 2-LTR circles RT-Produkte und integrierte Proviren (Set F, G)	77
Abb. 44: Amplifikationskurven der JSRV-spezifischen qPCR für die 2-LTR circles	78
Abb. 45: 1-D Plot der ddPCR mit den Proben der JSRV 2-LTR circles Standardreihe	79
Abb. 46: 1-D Plots der ddPCR Reaktionen dreier Proben infizierter CRFK Zellen.....	81

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der Komponenten für einen PCR-Mastermix	29
Tab. 2: Thermocycler-Programm für die konventionelle PCR.....	29
Tab. 3: Komponenten des TaqMan real-time PCR Mastermixes.....	30
Tab. 4: Komponenten der SYBR Green real-time PCR Mastermixes.....	30
Tab. 5: Reaktionsansatz für die ddPCR	31
Tab. 6: Komponenten des Ansatzes für die Mutagenese-PCR	33
Tab. 7: Mutagenese-PCR Bedingungen	33
Tab. 8: typischer Reaktionsansatz eines Adel Verdaus.....	34
Tab. 9: Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR.....	36
Tab. 10: Komponenten des Mastermixes für den PERT.....	38
Tab. 11: PCR-Bedingungen des PERT Assays	38
Tab. 12: verwendete Zelllinien.....	38
Tab. 13: verwendete Zellzahlen und eingesetzte DNA-Menge in verschiedenen Transfektionsformaten	39
Tab. 14: Transfektionsprotokoll der verschiedenen Viren.....	40
Tab. 15: Infektionsformate mit den jeweils eingesetzten Zellzahlen	40
Tab. 16: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE	42

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zu allererst bei Herrn Prof. Dr. Norbert Bannert, der es mir ermöglicht hat, meine Masterarbeit im FG18 am Robert Koch-Institut durchführen zu können. Weiterhin möchte ich ihm für jegliche Unterstützung danken und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Rupert Mutzel, der freundlicherweise die Begutachtung meiner Arbeit von Seiten der FU Berlin übernommen hat.

Für jegliche Unterstützung, Planung und Hilfestellung möchte ich insbesondere Dr. Oliver Hohn danken, der mir stets zur Seite stand und mich auch in schwierigen Phasen ermutigte, weiterzumachen. Weiterhin danke ich ihm für sein großes Engagement den schriftlichen Teil der Arbeit betreffend.

Schließlich möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe meinen Dank aussprechen. Sie waren mir bei Fragen und Problemen jederzeit behilflich und erleichterten mir den Laboralltag durch das hervorragende Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt dabei Anja Wolf. Des Weiteren möchte ich mich für die technische Unterstützung bei Martina Keller und Michelle Stuck bedanken.

Zuletzt möchte ich mich insbesondere bei meiner Familie bedanken, die stets hinter mir stand und mich unterstützte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich,

Luise

Krüger

4516018

Vorname

Name

Matrikelnummer

14.08.1990

Berlin

geboren am

geboren in

an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig 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