



Untersuchungen zur reversen Transkription und dem Kerneintritt von HERV-K(HML-2)

Masterarbeit im Studiengang Biomedizin
zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science

vorgelegt von

Lisa Staudt

Matrikelnummer 172219

Hannover

Hannover, den 10.02.2021

Die Masterarbeit wurde im Zeitraum vom 15.06.2020 bis zum 10.02.2021 unter der Betreuung von Herr Prof. Dr. Bannert und Herr Dr. Hohn am Robert Koch-Institut (FG18) angefertigt.

Erstprüfer Prof. Dr. Jens Bohne
Institut für Virologie
Medizinische Hochschule Hannover

Zweitprüfer Prof. Dr. Nico Lachmann
Institut für Experimentelle Hämatologie
Medizinische Hochschule Hannover

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	V
Danksagung	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung.....	XIII
Abstract	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Retroviren	1
1.1.1 Klassifizierung von Retroviren.....	1
1.1.2 Aufbau eines retroviralen Partikels	2
1.1.3 Genomischer Aufbau von Retroviren	3
1.1.4 Replikationszyklus der Retroviren.....	4
1.2 Endogene Retroviren.....	8
1.2.1 HERV-K.....	8
1.3 Zelluläre Restriktionsfaktoren	9
2 Zielsetzung.....	11
3 Material & Methoden	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Zelllinien	12
3.1.2 Bakterienstämme	12
3.1.3 Enzyme	12
3.1.4 Plasmidkonstrukte.....	13
3.1.5 DNA-Längenstandards und Gelbeladungspuffer	14
3.1.6 Primer, Sonden und Templates	15
3.1.7 Verwendete Kits	18
3.1.8 Lösungen, Medien und Puffer	18
3.1.9 Antikörper und Antigene.....	20
3.1.10 Verbrauchsmaterialen	20
3.1.11 Reagenzien und Chemikalien	21
3.1.12 Geräte	21
3.1.13 Softwares	22

3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Zellbiologische Methoden	23
3.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	27
3.2.3 Serologische Verfahren.....	41
4 Ergebnisse	42
4.1 Austausch von EGFP gegen Luciferase im HERV-K _{con} CGBX.....	42
4.1.1 PCR-Amplifikation der CMV-EGFP-Reporterkassette und Subklonierung in den pCR4-TOPO XL Vektor	43
4.1.2 Mutagenese-PCR zur Generierung von Restriktionsschnittstellen für KpnI und NotI	44
4.1.3 Austausch von EGFP gegen Luciferase im TOPO-XL Vektor	46
4.1.4 Rückklonierung der Luc-Reporterkassette in HERV-K _{con} über Adel/NheI	47
4.2 Funktionalität von HERV-K _{con} Luciferase <i>in-vitro</i>	48
4.3 Vergleich der Partikelproduktion mit dem EGFP- und Luciferase-Reportersystem	49
4.4 Infektionsexperiment zur Quantifizierung von Infektions- und Integrationsereignissen	50
4.4.1 Vergleich der beiden Reportersysteme anhand von humanen Zelllinie HEK293T	51
4.4.2 Vergleich der beiden Reportersysteme anhand von humanen Zelllinie HeLa	53
4.4.3 Vergleich der beiden Reportersysteme anhand der nicht-humanen Zelllinie CrfK	54
4.5 Differenzierung zwischen viraler cDNA und Plasmid-DNA/ ankommenden Viruspartikeln durch den Einsatz von Stavudin	55
4.6 Quantifizierung der Post-entry, pre-integration Inhibition von HERV-K _{con}	58
4.7 Detektion viraler cDNA durch Mutagenese der U3-Region der 3'LTR	60
4.7.1 Generierung des SacI-Tags der U3-Region der 3'LTR	61
4.8 Einfluss des U3-Tags auf die Partikelproduktion	63
4.9 Real-time PCR zum Nachweis viraler DNA	64
4.9.1 Etablierung des Testsystems anhand einer Positivkontrolle	64
4.9.2 Nachweis der verlagerten Mutation in der 5'LTR durch eine Real-time-duplex-PCR	66
5 Diskussion	69
6 Ausblick	77
Literaturverzeichnis	78

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur mit den Hilfeleistungen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken oder Daten sind als solche kenntlich gemacht habe. Die Arbeit habe ich bisher keiner anderen Prüfungsbehörde in gleicher oder vergleichbarer Form vorgelegt. Sie wurde bisher auch nicht veröffentlicht. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit mit Hilfe eines Plagiatserkennungsdienstes auf enthaltene Plagiate überprüft wird.

Berlin, den 04.02.2021

Lisa Staudt

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bannert, der mich stets während der Masterarbeit unterstützte und mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit am Robert-Koch-Institut anzufertigen.

Des Weiteren möchte ich mich auch ganz besonders bei Dr. Oliver Hohn bedanken, der mich bei fachlichen Fragen unterstützte und nicht zuletzt ein großes Engagement bei der Begutachtung der Arbeit zeigte. Außerdem möchte ich meinen Dank der gesamten Arbeitsgruppe FG18 aussprechen. Für die Unterstützung in der ersten Zeit möchte ich mich besonders bei Martina Keller und Monika Jaensch bedanken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Bohne und Herrn Prof. Dr. Lachmann von der Medizinischen Hochschule Hannover für die externe Betreuung und Begutachtung der Arbeit danken.

Besonderer Dank kommt auch meiner Familie und meinen Freunden zu. Danke, dass ihr immer für mich da seid, an mich glaubt und mich in allen Dingen unterstützt.

Abkürzungsverzeichnis

®	Eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Amp	Ampicillin
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme
bp	Basenpaare (Einheit für die Genomgröße)
CIP	Calf Intestineal Alkaline Phosphatase
CA	Capsid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CrfK	Crandell Rees feline kidney
C _t	Threshold Cycle
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMEMc	DMEM + 5%FBS + 1% Pen/Strep
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco´s Phosphate- Buffered Saline
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Env	Envelope (Virushülle)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetal bovine serum
Fv	Friend virus susceptibility gene
g	Erdbeschleunigung (=9,81m/s ²)
Gag	Group-specific antigen
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HERMA7	Human endo-genous retrovirus monoclonal antibody
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HERVK _{con}	Proviralearer Klon mit der Konsensussequenz von HML-2
HEX	Hexachlorfluorescein
HML	Human endogenous MMTV-like
HTVL	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus

ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IN	Integrase
<i>in-vitro</i>	durchgeföhrt im Reagenzglas
kb	Kilobasen
LTR	Long-terminal repeat
Luc	Luciferase
min	Minute
ml	milliliter
MLV	Murine leukemia virus
ORF	Open reading Frame
PBS	Primerbindestelle
PEI	Polyethylenimin
PERT	qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Präintegrationskomplex
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> .
Pol	Polymerase
RLU	Relative Light Unit
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
SU	Surface Unit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Schmelztemperatur
TM	Transmembranprotein
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIM5 α	Tripartitie motif protein 5 α
U3 und U5	Unique region
V	Volt
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
VSG-G	Glykoprotein des Vesikular Stomatitis Virus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines retroviralen Partikels.....	2
Abbildung 2: Genomorganisation von Retroviren.....	3
Abbildung 3: Retroviraler Lebenszyklus.....	4
Abbildung 4: Modell der Reversen Transkription am Beispiel von HIV-1.....	6
Abbildung 5: Antivirale Restriktionsfaktoren.....	10
Abbildung 6: Austausch von EGFP gegen Luciferase in HERV-K _{con} CCGBX.....	42
Abbildung 7: Kontroll-PCR nach Subklonierung der Reporter-kassette.....	44
Abbildung 8: Restriktionsverdau des TOPO-XL Vektors nach der Mutagenese.....	45
Abbildung 9: Kontrollverdau des TOPO-XL Vektors nach dem Austausch des EGFP-Reportergens gegen die Luciferase.....	46
Abbildung 10: Kontrollverdau nach Rückklonierung der CMV-Reporter-kassette in HERV-K _{con}	47
Abbildung 11: Bestimmung der Luciferase-Aktivität nach 24h (Abbildung A) und 48h (Abbildung B).....	48
Abbildung 12: Vergleich der Virusproduktion mit dem Luciferase- bzw. EGFP-Reporter-gen.....	49
Abbildung 13: HEK293T - Vergleich der Reporteraktivität und Quantifizierung der viralen cDNA per genome equivalent.....	51
Abbildung 14: HeLa - Vergleich der Reporteraktivität und Quantifizierung der viralen cDNA per genome equivalent.....	53
Abbildung 15: CrfK - Vergleich der Reporteraktivität und Quantifizierung der viralen cDNA per genome equivalent.....	54
Abbildung 16: Logarithmische Darstellung der Reporteraktivität in % mit bzw. ohne den Zusatz von Stavudin [50mM] (A: HEK293T, B: HeLa, C: CrfK).....	56
Abbildung 17: Effekt der Inhibitorsättigung durch den Überschuss an EGFP-Reporterviren.....	58
Abbildung 18: Vorversuch zur Bestimmung der Standardmenge an Luciferase-Virus für die Coinfektion mit GFP-Reporterviren.....	59
Abbildung 19: Coinfektion mit EGFP-Reporterviren zur Detektion antiviraler Restriktionsfaktoren.....	59
Abbildung 20: Schematische Darstellung zur Verdopplung der mutierten U3-Region während der reversen Transkription.....	61
Abbildung 21: Kontrollverdau mit SacI zur Überprüfung der Mutagenese-PCR in dem TOPO-XL Vektor.....	62
Abbildung 22: Kontrollverdau nach Rückklonierung der mutierten 3'LTR in die Moleklarklone pBSKoriST bzw. CMVoriST.....	63
Abbildung 23: Vergleich der Virusproduktion mit bzw. ohne U3-Taq.....	63
Abbildung 24: Positivkontrolle zur Etablierung des PCR-Systems.....	64

Abbildung 25: Ermittlung der Detektionslimits im Hintergrund genomischer DNA humaner (A) bzw. nicht humaner Zellen (B) [100ng] pro Ansatz.	65
Abbildung 26: Kontrolle des PCR-Produktes.	66
Abbildung 27: Virale cDNA per genome equivalent (24h und 48h nach Infektion).	67
Abbildung 28: Gelelektrophorese zur Überprüfung des PCR-Produktes.	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	12
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	12
Tabelle 3: Verwendete Enzyme für die Klonierung	12
Tabelle 4: Verwendete Enzyme für die PCR.....	13
Tabelle 5: Verwendete Plasmidkonstrukte	13
Tabelle 6: Verwendete Längenstandards und Gelbeladungspuffer	14
Tabelle 7: Primer, Sonden und Templates für den PERT-Assay	15
Tabelle 8: Primer für die Klonierung.....	15
Tabelle 9: Primer für die Mutagenese	16
Tabelle 10: Primer und Sonden für die Real-time PCR.....	17
Tabelle 11: Primer für die Sequenzierung	17
Tabelle 12: Verwendete Kits	18
Tabelle 13: Zusammensetzung der Lösungen, Medien und Puffer für Zellkulturarbeiten	18
Tabelle 14: Medien und Antibiotika für die Bakterienkultur	19
Tabelle 15: Reagenzien für die Sequenzierung	19
Tabelle 16: Reagenzien für die PCR.....	19
Tabelle 17: Pufferlösungen für den Restriktionsverdau	19
Tabelle 18: Lösungen und Puffer für den p27-ELISA.....	20
Tabelle 19: Verwendete Antikörper/Antigene	20
Tabelle 20: Verwendete Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 21: Verwendete Reagenzien/Chemikalien	21
Tabelle 22: Verwendete Geräte	21
Tabelle 23: Verwendete Softwares zur Quantifizierung	22
Tabelle 24: Zellzahl für die entsprechenden Kultivierungsformate.....	23
Tabelle 25: Prozentualer Anteil der Plasmide zur Generierung von HERV-K _{con} basierten Reporterviren.....	25
Tabelle 26: Prozentualer Anteil der Plasmide zur Generierung von Reporterviren mit den Vollängenmoleklarklonen pBSKoriST und CMV-oriST	25
Tabelle 27: Zusammensetzung des Ligationsansatzes mit der Quick Ligase.....	30
Tabelle 28: Protokoll für die konventionelle PCR mit der <i>Taq</i> -Polymerase.....	32
Tabelle 29: Protokoll für die konventionelle PCR mit der <i>Pfu</i> -Polymerase	32
Tabelle 30: Cyclingprogramm für die konventionelle PCR.....	33
Tabelle 31: Ansatz für die Mutagenese-PCR	34
Tabelle 32: Cyclingprogramm für die Mutagenese-PCR.....	34
Tabelle 33: Protokoll für die Sequenzierung	35
Tabelle 34: Cyclingprogramm für die Sanger-Sequenzierung	35

Tabelle 35: Protokoll für die Real-Time duplex PCR.....	36
Tabelle 36: Cyclingprogramm für die Real-time duplex PCR.....	36
Tabelle 37: Protokoll für die OneStep RT-qPCR- Ansatz mit reverser Transkriptase.....	37
Tabelle 38: Protokoll für die OneStep RT qPCR- Ansatz ohne Reverse Transkriptase.....	37
Tabelle 39: Cyclingprogramm für die OneStep-RT qPCR.....	38
Tabelle 40: Zusammensetzung des Mastermix für den PERT-Assay.....	39
Tabelle 41: Cyclingprogramm für den PERT-Assay.....	40

Zusammenfassung

Das menschliche Genom besteht zu 8% aus retroviralen Sequenzen. Die Unterfamilie HML-2 von HERV-K ist dabei die einzige Linie, die seit der Divergenz zwischen Menschen und Schimpanse im menschlichen Genom repliziert hat. Viele der Loci sind in der menschlichen Population nicht fixiert, haben intakte Open Reading Frames (ORF) und wenig oder keinen Sequenzunterschied zwischen den flankierenden LTRs, welche bei der Integration absolut identisch sind (Belshaw und Tristem 2009). Trotzdem konnten bisher keine replikationskompetenten endogenen HERVs im menschlichen Genom identifiziert werden, was vermuten lässt, dass es einen Postentry/ Preintegration Block gibt. Zur genaueren Untersuchung möglicher Restriktionsprozesse von HERV-K(HML-2) wurden Methoden und Infektionsversuche etabliert, um Prozesse der Reversen Transkription und des Kerneintritts genauer zu analysieren.

Um die Sensitivität für Infektionsexperimente zu verstärken, wurde hierfür zunächst das auf dem HERV-K_{con}- Moleklarklon codierte EGFP-Reportergen gegen die Luciferase ausgetauscht. Anhand eines Infektionsexperimentes konnte für beide Reportersysteme gezeigt werden, dass bei den humanen Zelllinien HEK293T und HeLa eine stabile Reporteraktivität nachgewiesen werden kann. Dies lässt nicht nur eine stabile Integration des Reportergens vermuten, sondern spricht auch dafür, dass Prozesse auf Ebene des Kerneintritts erfolgreich durchlaufen werden.

Des Weiteren wurden die Reporterviren zur Identifikation zellulärer Restriktionsfaktoren eingesetzt. In Anlehnung an ein Infektionsexperiment von Kramer et al. sollte die Hypothese überprüft werden, ob es zelluläre Restriktionen gegen HERV-K(HML-2) gibt, welche durch Koinfektion mit einem anderen Virus aufgehoben werden können. Der Effekt der Inhibitorsättigung, welcher in der Vergangenheit mit CMVoriLuc-basierten Reporterviren beobachtet wurde, konnte im Rahmen des Experiments mit HERV-K_{con} nicht nachgewiesen werden (Kramer et al. 2016).

Zudem wurden Prozesse auf Ebene der Reversen Transkription näher untersucht. Hierzu galt es virale cDNA als Produkt der reversen Transkription nachzuweisen. Um zu verhindern, dass anstatt viraler cDNA kontaminierende Plasmid-DNA detektiert wird, wurde eine kurze Markersequenz in die U3-Region der 3'LTR eingefügt. Da diese während der Reversen Transkription durch intramolekulare Umlagerungen verdoppelt wird, ist diese in der viralen genomischen cDNA sowohl in der 3'LTR, als auch 5'LTR vorhanden und unterscheidet sich damit von der Sequenz der Plasmid-DNA. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass spezifisch virale cDNA in HEK293T nachgewiesen werden kann und die Mutation in der U3-Region als ein geeignetes Tool für den Nachweis viraler cDNA dient. Die Vermutung über Restriktionen auf Ebene der Reversen Transkription können damit für die humane Zelllinie HEK293T widerlegt werden.

Abstract

The human genome consists of 8% retroviral sequences. The HML-2 subfamily of HERV-K is the only lineage that has replicated in the human genome since the divergence between humans and chimpanzees. Many of the loci are not fixed in the human population, have intact open reading frames (ORF) and little or no sequence difference between the flanking LTRs, which are absolutely identical upon integration (Belshaw und Tristem 2009). Despite numerous studies, no replication-competent endogenous HERVs have yet been identified in the human genome, suggesting that there is a post-entry/pre-integration block. To precisely study possible restriction processes of HERV-K(HML-2), methods and infection experiments were established to analyze the process of reverse transcription and nuclear entry.

To improve the sensitivity for infection experiments, the EGFP-reporter gene encoded on the HERV-K_{con} molecular clone was exchanged for the luciferase gene. Based on a long-term infection experiment, it was successfully demonstrated for each reporter system that stable reporter activity can be detected in the human cell lines HEK293T and HeLa. This not only indicates a stable integration of the reporter gene, but also suggests that processes at the level of nuclear entry are being successfully completed.

Furthermore, the reporter viruses were used to identify cellular restriction factors. In accordance with an infection experiment by Kramer et al., the hypothesis was verified whether there are cellular restrictions against HERV-K(HML-2), which can be abrogated by coinfection with another virus. The effect of inhibitor saturation, which was observed in the past with CMVoriLuc-based reporter viruses, could not be demonstrated in the infection experiment with HERV-K_{con} (Kramer et al. 2016).

In addition, processes at the level of reverse transcription were investigated. The aim was to detect viral cDNA as a product of reverse transcription. To prevent contaminating plasmid DNA from being detected instead of viral cDNA, a short marker sequence was inserted into the U3-region of the 3'LTR. Since the mutated sequence is duplicated during reverse transcription by intramolecular rearrangements, it is present in both, the 3'LTR and 5'LTR, and can thus be distinguished from the contaminating plasmid DNA. This method successfully demonstrated that the mutation in the U3-region is an effective tool to specifically detect viral cDNA by a PCR system. The hypothesis about restrictions at the level of reverse transcription can thus be disproved for the cell line HEK293T.

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren wurden erstmalig vor mehr als hundert Jahren beschrieben. Damals gelang es den dänischen Forschern W. Ellerman und O. Bang, onkogene Varianten des heute bekannten aviären Sarkom-Leukose-Virus (ASLV) zu übertragen (Javier und Butel 2008).

Im Laufe des Jahrhunderts wurde die Forschung an Retroviren durch weitere maßgebliche Meilensteine vorangetrieben (Lesbats et al. 2016). Im Jahr 1970 konnte mit der Entdeckung der Reversen Transkriptase, dem Schlüsselenzym der Retroviren, das Dogma von Francis Crick erstmalig widerlegt werden. Dessen Hypothese stützt sich auf den einseitig, gerichteten Informationsfluss von der DNA, über die mRNA als Vermittler zum Protein. Mit dem Nachweis der Reverse Transkriptase konnte gezeigt werden, dass die Umschreibung viraler RNA in ein DNA-Intermediat möglich ist und ein Weg des umgekehrten Informationsflusses existiert (Modrow 2010; Reinard 2018).

Im Jahr 1980 folgte die Entdeckung von HTLV-1 (humanes T-Zell-Leukämie-Virus) durch R. Gallo. Dies galt als wissenschaftliche Sensation, da es das erste Retrovirus war, welches im Zusammenhang mit einer T-Zellleukämie nachgewiesen und isoliert werden konnte (Modrow 2010). HTLV gilt als das erste humanpathogene Retrovirus, das zweifelsfrei mit einer menschlichen Malignität assoziiert ist (McLaughlin-Drubin und Munger 2008).

Kaum ein Jahr nach R. Gallos Entdeckung, wurde das heutzutage wohl bekannteste Retrovirus identifiziert. Es handelt sich dabei um das HIV (Human Immunodeficiency Virus), welches als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS gilt und für welches bislang weder ein Impfstoff noch ein Heilmittel existiert (Gallo und Montagnier 2003; Young Nam Lee 2010).

1.1.1 Klassifizierung von Retroviren

Das International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) legte eine verbindliche Einteilung der Retroviren fest. Sie beruht auf genetischen und funktionellen Ähnlichkeiten und umfasst zwei Unterfamilien, sowie sieben Gattungen (Greenwood et al. 2018; Maclachlan et al. 2009).

Die sogenannten *Orthoretrovirinae* bilden eine große Unterfamilie, zu welcher insgesamt sechs Gattungen gehören. Diese sind die α -, β -, δ -, ϵ -, γ -Retroviren, sowie die Lentiviren. Eine Ausnahme hiervon sind die *Spumavirinae*. Sie bilden eine eigene Unterfamilie, da sie sich aufgrund vieler Merkmale (insbesondere dem Replikationszyklus) von anderen Retroviren unterscheiden (Maclachlan et al. 2009; Lindemann et al. 2013).

Eine alternative Form der Einteilung von Retroviren erfolgt in Abhängigkeit ihres Übertragungswegs. Man kann hierbei eine Unterscheidung in exogene und endogene Retroviren vornehmen. Die exogenen Retroviren werden horizontal durch Infektion übertragen. Sie weisen alle Informationen auf, die für den Replikationszyklus nötig sind und sind damit zur Expression viraler Proteine und der Partikelfreisetzung fähig (Kruse 2013; Modrow 2010).

Bei den endogenen Retroviren handelt es sich um Gensequenzen, die durch eine retrovirale Infektion und Integration in die Keimbahn von Wirbeltieren entstanden sind. In hauptsächlich inaktiver Form sind sie in fast allen Genomen von Vertebraten vorzufinden (Kruse 2013; Modrow 2010).

1.1.2 Aufbau eines retroviralen Partikels

Das Retrovirus besitzt eine charakteristisch sphärische Form mit einem Durchmesser von ca. 100nm (Zhang et al. 2015). Im Partikelinneren ist das Kapsid lokalisiert, welches aus Kapsidproteinen aufgebaut ist. Es umschließt das virale Genom, bestehend aus zwei RNA-Einzelsträngen, die mit Nucleocapsidproteinen komplexiert vorliegen. Im Capsid sind neben der viralen Nucleinsäure auch die Reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN) und Protease (Pro) lokalisiert. Die Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Replikationszyklus des Retrovirus. Nach außen hin wird das Capsid von einer Doppellipidschicht begrenzt, welche sich von der Cytoplasmamembran der infizierten Zielzelle ableitet. In der viralen Hüllmembran ist das Transmembranprotein gp41 lokalisiert, welches nach außen hin nicht-kovalent mit dem Surface-Protein (SU) verbunden ist. Beide Glycoproteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet und ermöglichen zusammen die Bindung und Fusion des Virus mit der Wirtszelle (Kruse 2013; Dudley 2011; Modrow 2010). Der Aufbau ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

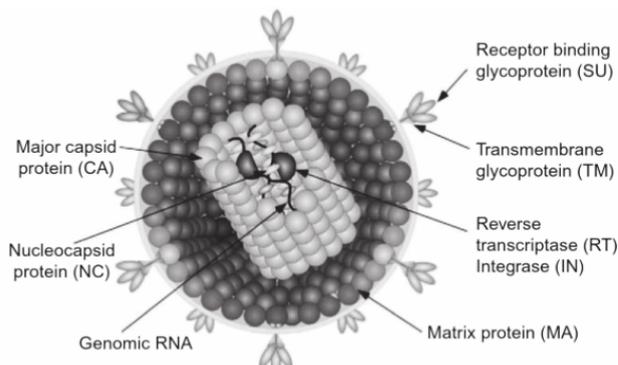


Abbildung 1: Aufbau eines retroviralen Partikels.

Nach außen hin wird das Virus von einer Cytoplasmamembran begrenzt, welche sich von der infizierten Zelle ableitet. An dessen Außenseite befinden sich die transmembranen Hüllproteine (TM), sowie die externen Glykoproteine (SU). Im Inneren des Partikels ist das Capsid (CA) lokalisiert, welches aus Capsidproteinen aufgebaut ist. Es enthält das virale RNA-Genom, sowie die viralen Enzyme (IN, PR, RT) (Übernommen aus Maclachlan und Dubovi 2017).

1.1.3 Genomischer Aufbau von Retroviren

Das retrovirale Genom umfasst eine Größe von 7-12kb und besteht aus zwei identischen RNA-Kopien mit positiver Polarität. Durch die Cap-Struktur am 5´ Ende, sowie der Polyadenylierung am 3´ Ende, besitzt das RNA-Genom die Charakteristika einer zellulären mRNA (Kruse 2013; Modrow 2010; Balvay et al. 2007).

Die Information von replikationskompetenten Retroviren ist auf mindestens drei Genschnitten codiert, welche als *gag*, *pol* und *env* bezeichnet werden. Das interne Strukturprotein Gag codiert für die Vorstufe der viralen Kernproteine. Dieses wird proteolytisch zu Matrix (MA), Capsid (CA) und Nukleocapsid (NC) Proteinen prozessiert. Unmittelbar stromabwärts der *gag*-Region folgt das *pol*-Gen, welches die genetische Information für die viralen Enzyme codiert. Sie werden als Integrase (IN), Reverse Transkriptase (RT) und Protease (PR) bezeichnet. Die Information für das Transmembranprotein (TM) gp41 und Surface-Protein (SU) gp120 ist in der *env*-Region codiert (Lindemann et al. 2013; Modrow 2010; Seitz 2016).

Im Wirtsgenom wird der codierende Abschnitt des integrierten Provirus durch wiederholende Sequenzen begrenzt, welche identisch sind und gleicher Orientierung vorliegen. Man bezeichnet diese als long terminal repeats (LTRs). Sie umfassen drei Regionen, zu welchen die R-Region, die U3- und U5-Region gehören. Die U3-Region der LTRs beinhaltet Promotoren und cis-aktive Sequenzen, welche auf die Bindung zellulärer Proteine reagieren und damit die transkriptionellen Vorgänge steuern. Für die Integration des Provirus in das Zellgenom sind hingegen wesentlich Sequenzen in der U5-Region entscheidend (Coffin et al. 1997; Gifford und Tristem 2003).

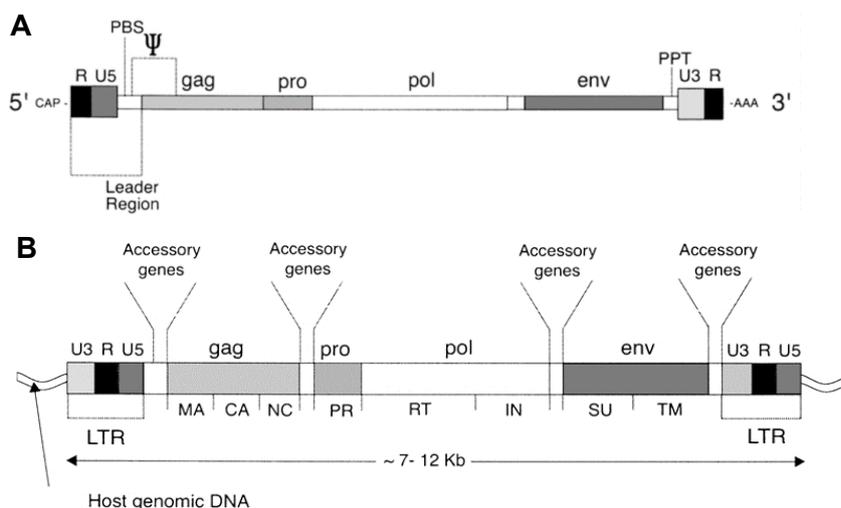


Abbildung 2: Genomorganisation von Retroviren

Abbildung A: Darstellung des RNA-Genoms mit einer 5´ Cap-Struktur und einer Polyadenylierung am 3´-Ende. Die Primerbindungsstelle (PBS) dient als Startpunkt für die reverse Transkriptase (RT).

Abbildung B: Das Provirus bezeichnet die in das Wirtsgenom integrierte Form des Virus. Während der Reversen Transkription werden die Sequenzen für die U3- und U5-Region verdoppelt, so dass funktionsfähige LTRs entstehen, welche das Genom flankieren. Dadurch hat das Provirus im Vergleich zur viralen RNA eine längere Sequenz (Übernommen aus Gifford und Tristem 2003).

Neben den essentiellen Strukturproteinen, welche in Abbildung 2 dargestellt sind, codiert das Genom von HIV auch für mehrere regulatorische Proteine. Die Proteine Tat und Rev sind für die Initiation der HIV-Replikation erforderlich. Die virale Replikation, das Budding und die Pathogenese werden von den Proteine Nef, Vif, Vpr, Vpu beeinflusst (Seitz 2016).

1.1.4 Replikationszyklus der Retroviren

Vor allem durch zwei Merkmale unterscheidet sich das Retrovirus von vielen anderen Viren. Zum einen durch die reverse Transkription und zum anderen durch die Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom. Beide Prozesse spielen eine wichtige Rolle im Replikationszyklus von Retroviren und werden im Laufe des Abschnitts genauer beschreiben (Zhang et al. 2018). Die folgende Abbildung 3 fasst alle wesentlichen Schritte des Replikationszykluses zusammen.

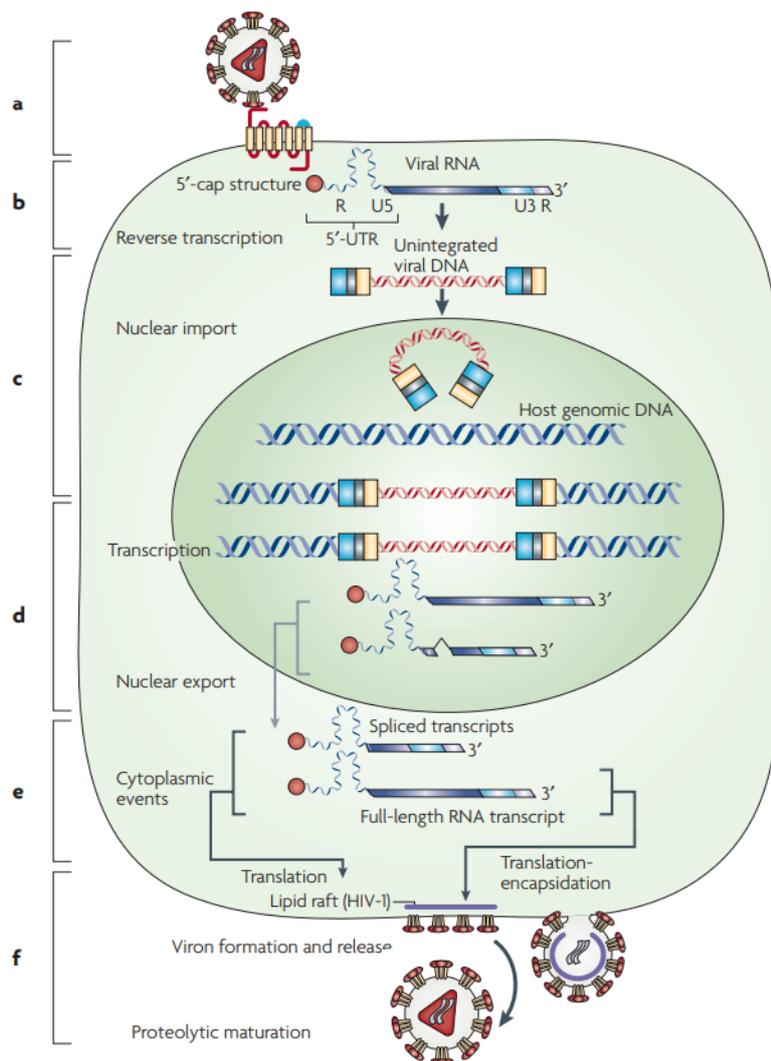


Abbildung 3: Retroviraler Lebenszyklus.

Nachdem ein Retrovirus in eine Wirtszelle eingedrungen ist (a), schreibt die reverse Transkriptase das retrovirale RNA-Genom des Virus in doppelsträngige DNA um (b). Die virale DNA wandert dann in den Zellkern und wird in das Wirtsgenom integriert (c). Virale Gene werden transkribiert und translatiert (d). Neue Viruspartikel werden gebildet und verlassen die Zellen über das Budding (e). Durch die proteolytische Spaltung reifen sie zu infektiösen Partikeln und können andere Zielzellen infizieren (f) (Übernommen aus Balvay et al. 2007).

1.1.4.1 Bindung und Eintritt in die Zielzelle (a)

Die initialen Prozesse für den Replikationszyklus von Retroviren werden durch das Transmembranprotein gp41 und Surface-Protein gp120 realisiert, welche beide in der *env*-Region des viralen Genoms codiert sind (Maclachlan und Dubovi 2017; Payne 2017). Die Bindung an die Rezeptoren der Zielzelle wird durch das Surface-Protein (SU) vermittelt. Einige Retroviren überqueren die Plasmamembran anschließend durch Fusion (z.B HIV), andere wiederum triggern die Endozytose über einen geringen pH-Wert. Als treibende Kraft ermöglicht in beiden Fällen jedoch das Transmembranprotein (TM) die Fusion mit der Zellmembran. Beim Eintritt in das Zellinnere, wird das virale Capsid ins Cytoplasma freigesetzt. Darauf folgt unmittelbar das sogenannte Uncoating, bei welchem das Kapsid zerlegt und die Nukleinsäure freigesetzt wird (Nisole und Saïb 2004; Payne 2017).

1.1.4.2 Reverse Transkription zur Umschreibung viraler RNA in cDNA (b)

Auf das Uncoating erfolgt unmittelbar die Reverse Transkription, bei welchem die Umschreibung viraler RNA in ein DNA-Intermediat erfolgt. Der Prozess unterliegt einem komplexen Mechanismus, welcher im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

1.1.4.2.1 Modell der reversen Transkription

Die Umschreibung der viralen RNA startet mit der Synthese der Minus-Strang DNA, unter Verwendung eines t-RNA (tRNA^{Lys₃}) Primers. Der Primer hat einen zellulären Ursprung und bindet an die Primerbindestelle (PBS), welche sich nahe dem 5´ Ende der viralen RNA befindet. Ausgehend von der t-RNA wird die Minus-Strang DNA in 5´-3´ Orientierung synthetisiert. Während der DNA-Synthese entsteht ein RNA/DNA-Duplex. Die Reverse Transkriptase besitzt eine RNaseH Aktivität, welche den Verdau der viralen Template-RNA im DNA/RNA-Hybrid ermöglicht (Paillart et al. 1996; Temin 1993).

Das Produkt der Minus-Strang Synthese wird auch als Strong-Stop DNA bezeichnet. Diese enthält neben der U5- auch eine R-Region, welche nun zur komplementären r-Sequenz am 3´-Ende des gleichen RNA-Moleküls transferiert wird. Dieser Prozess ermöglicht den ersten Template-Transfer. Die DNA des übertragenen Minus-Strangs dient als Primer für die RT. Damit kann diese am 3´ Ende des RNA-Templates polymerisieren und die Synthese des Minus-Strangs fortsetzen (Paillart et al. 1996; Temin 1993).

Die Verlängerung der Minus-Strang-DNA wird durch die R-Region vermittelt. Währenddessen schreitet der Abbau der viralen RNA durch die RNaseH-Aktivität der Reversen Transkriptase weiter fort. Ein Teil der viralen RNA-Sequenz ist resistent gegenüber der Degradation der RNaseH-Aktivität und bleibt deshalb erhalten. Bei dieser Sequenz handelt es sich um die Polypurine tract (PPT) Sequenz, welche als Primer für die Synthese der Plus-Strang Stop-DNA dient. Die Elongation beider DNA-Stränge schreitet bis zur PBS Sequenz dort. Die

retrovirale RNA, sowie der tRNA und PPT-Primer werden durch die RNaseH-Aktivität der RT degradiert.

Durch die Basenpaarung der komplementären PBS-Sequenzen am 3'Ende der Minus-Strang-DNA und Plus-Strang-Stop-DNA kommt es zum zweiten Strangtransfer. Die Elongation der Minus- und Plus-Strang DNA resultiert in einer doppelsträngigen DNA, welche beidseitig mit Long-terminal repeats (LTRs) flankiert ist (René et al. 2018).

Die Arbeitsgruppe von Mbisa et al. konnte zeigen, dass es mit Hilfe der Real-Time-PCR-Technologie möglich ist, verschiedene Stadien der reversen Transkription durch eine passenden Primerkombination nachzuweisen und zu quantifizieren. Das Protokoll dazu ist mit Hilfe des Modells der reversen Transkription in Abbildung 4 dargestellt (Mbisa et al. 2009).

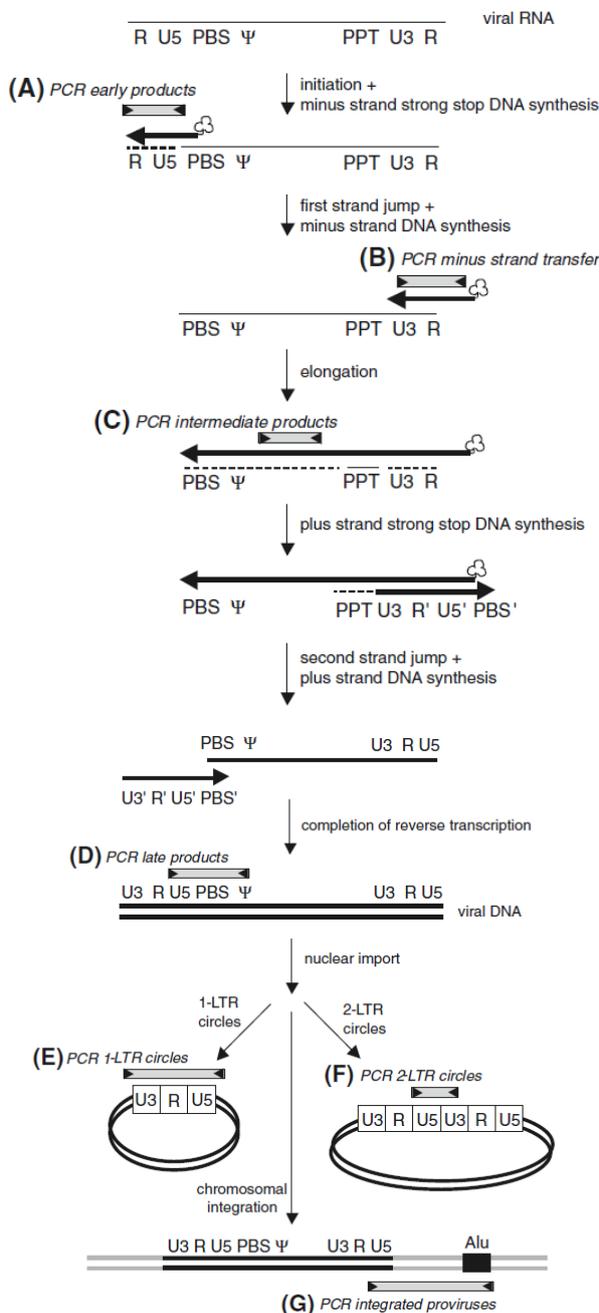


Abbildung 4: Modell der Reversen Transkription am Beispiel von HIV-1

Mit Hilfe der Real-Time-PCR ist es möglich, Produkte der reversen Transkription, sowie integrierte und nicht-integrierte (1- und 2-LTR-Kreise) DNA zu quantifizieren. Die zum Nachweis geeignete Primerkombination ist durch Pfeile markiert (Übernommen aus Mbisa et al. 2009).

1.1.4.3 Kerneintritt & Integration der viralen cDNA ins Wirtsgenom (c)

Damit die virale cDNA nach der Reversen Transkription in das Wirtsgenom integriert wird, muss diese als Bestandteil des Präintegrationskomplexes (PIC) den Zellkern passieren. Das ist für die meisten Retroviren auf direktem Wege nicht möglich, da der Zellkern durch die Anwesenheit der Kernporen eine selektive Barriere darstellt. Das Virus muss auf die Zellteilung warten, da dabei die Kernlamina aufgelöst und das Genom nicht mehr geschützt ist (Bukrinsky 2004; Nisole und Saïb 2004). Andere Gattungen, wie beispielsweise Lentiviren, haben im Vergleich dazu eine Strategie zur aktiven Überwindung der Kernhülle entwickelt und können damit auch ruhende Zellen infizieren. Welcher Prozess diesem Phänomen zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig geklärt (Kobiler et al. 2012; Nisole und Saïb 2004).

Im Zellkern katalysiert die Integrase die Integration ins Wirtsgenom. Durch Erkennung beider LTR-Sequenzen am Ende der viralen DNA, werden zwei Nukleotide von jedem 3'-Ende entfernt (3' Processing). Es entstehen exponierte Hydroxylgruppen an den viralen DNA-Enden, über welche die Wirts-DNA anschließend gespalten wird. Über einen Strangtransfer erfolgt anschließend die kovalente Verbindung von dem 3' Ende der viralen DNA mit dem 5' Ende der Wirts-DNA (Suzuki et al. 2012). Die Insertionsstelle ist dabei rein zufällig und kann auch in kodierenden Anteilen des Wirtsgenoms stattfinden, womit Genfunktionen zerstört werden können (Insertionsmutagenese) (Ganten 1999).

Ein geringer Prozentsatz der viralen DNA wird nicht integriert, da durch Rekombination oder End-zu-End Ligation zirkuläre Produkte entstehen (1-LTR- und 2-LTRcircles). Die zirkulären Produkte sind dead-end Produkte der reversen Transkription, welche nicht an der Ausbreitung des Virus beteiligt sind (Trono 2002).

1.1.4.4 Expression und Bildung neuer Partikelbildung (d)

Die LTRs, welche die Gensequenz des Provirus flankieren, ermöglichen die Synthese der viralen genomischen RNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Das Transkriptionsprodukt, die sogenannte mRNA, ist in zwei verschiedenen RNA-Formen vorhanden: Als gespleißte mRNA und ungespleißte Vollängen-RNA. Die ungespleißte mRNA wird als Gag-Vorläuferproteine translatiert. Eine virale Protease spaltet den Vorläufer anschließend in mehrere Untereinheiten mit unterschiedlichen Funktionen. Als Vollängen-RNA dient sie ebenfalls als genomische RNA für neue Viren. Das Env-Protein wird ebenfalls als Vorläufer aus einer gespleißten mRNA translatiert und proteolytisch gespalten, um das reife Oberflächenglykoprotein zu erhalten. Sowohl für die Transkription, als auch die Translation wird die Prozessierungsmaschinerie der Wirtszelle genutzt (Balvay et al. 2007; Chudak 2012; Arendt und Littman 2001).

1.1.4.5 Assembly und Freisetzung neuer Viruspartikel (e,f)

Nach der Synthese werden die viralen Strukturproteine zur Plasmamembran transportiert, wo die Assemblierung stattfindet. Bei HIV-1 findet dieser Prozess an cholesterinreichen Membrandomänen statt, die als Lipid Rafts bekannt sind (Balvay et al. 2007). Das unreife Virus wird durch Budding von der Wirtszelle freigesetzt. Dabei nimmt es einen Teil der Cytoplasmamembran mit, die dann die Virushülle bildet. Extrazellulär kommt es zur morphologischen Reifung zu einem infektiösen Partikel, indem die Protease die im Kapsid verpackten Vorläuferproteine proteolytisch spaltet (Berger 1987).

1.2 Endogene Retroviren

Wie bei allen Säugetieren, sind endogene Retroviren (ERV) auch beim Menschen beschrieben. Sie machen rund 8 % unseres Genoms aus und sind mit mehr als 500.000 Elementen im humanen Genom rund 20x häufiger vertreten als menschliche Gene (Hohn et al. 2013). Der Ursprung der endogenen Retroviren ist durch exogene Formen zu erklären, welche die Keimbahn im Laufe der menschlichen Evolution mehrfach infizierten. Aufgrund der Fähigkeit zur Integration in das Wirtsgenom, geht man davon aus, dass die integrierte Virussequenz in den Keimbahnzellen entsprechend der mendelschen Regeln an die folgenden Generationen weitergegeben werden konnte (Contreras-Galindo et al. 2015; Lee und Bieniasz 2007).

Obwohl viele ERV-Sequenzen im menschlichen Genom vorhanden sind, ist heutzutage kein replikationsfähiges HERV (humanes endogenes Retrovirus) bekannt. Im Laufe der Evolution haben post-insertionale Rekombinationen, Deletionen und Mutationen zur Inaktivierung geführt (Young Nam Lee 2010; Hohn et al. 2013).

1.2.1 HERV-K

HERV-K ähnelt in der Struktur einem typischen Beta-Retrovirus und lässt sich in mehrere Untergruppen unterteilen, die als HML-1 bis HML-11 (human endogenous MMTV-like) bezeichnet werden. Jede Untergruppe kann auf unterschiedliche Keimbahninfektionen durch exogene Retroviren zurückgeführt werden (Xue et al. 2020).

Das menschliche Maus-Mammatumor-Virus-ähnliche 2 (HML-2) aus der Unterfamilie von HERV-K ist dabei von besonderer Bedeutung, da sie als die zuletzt integrierten und am besten erhaltenen menschlichen Proviren gelten (Young Nam Lee 2010; Hohn et al. 2013). Das Alter konnte geschätzt werden, indem man die beiden LTR-Sequenzen miteinander vergleicht. Man geht davon aus, dass diese bei Integration absolut identisch sind. Während der Replikation der Wirts-DNA akkumuliert jede LTR unabhängig voneinander Mutationen. Es wird geschätzt, dass alle 200.000-450.000 Jahre ein Unterschied zwischen zwei LTRs auftritt. Da weniger als 5 Unterschiede zwischen den LTRs detektiert werden konnten, deutet es darauf hin, dass

HML-2 vor vielleicht weniger als 1 Million Jahren integriert hat (Lee und Bieniasz 2007; Lee 2010).

Obwohl alle HERV-K Proviren deren Fähigkeit zur Replikation verloren haben, enthält die HERV-K(HML-2)-Gruppe in vielen Genen intakte offene Leserahmen (ORFs), die für funktionelle Proteine kodieren und in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Subramanian et al. 2011; Contreras-Galindo et al. 2015; Hohn et al. 2013). Aufgrund der Funktionalität eignet sich diese Unterfamilie besonders zur Untersuchung biologischer Prozesse von HERV. Mithilfe der Konsensussequenz von HERV-K(HML-2) konnte ein Moleklarklon rekonstituiert werden, welcher als „HERV-K_{con}“ bezeichnet wird. Dieser wurde auch im Rahmen der Arbeit verwendet (Lee und Bieniasz 2007).

1.3 Zelluläre Restriktionsfaktoren

Der evolutionäre Konflikt zwischen Retroviren und ihrem Wirt hat über Millionen von Jahren zur Entstehung von antiviralen Restriktionsfaktoren geführt (Boso und Kozak 2020). Insgesamt sind drei Hauptgruppen von Restriktionsfaktoren gegen Retroviren beschrieben, welche alle im Zusammenhang mit HIV-1 entdeckt wurden, aber auch gegen andere Retroviren aktiv sind (Lee 2010; Lee und Bieniasz 2007).

Zu der ersten Gruppe von Proteinen gehört Fv-1 (Friend virus susceptibility gene), TRIM5 α und TRIM5-Cyp (Tripartite motif protein). Sie hemmen den Uncoating- Prozess, so dass die virale RNA nicht freigesetzt und die nachfolgende Reverse Transkription nicht stattfinden kann (Kramer et al. 2016; Lee 2010; Sanz-Ramos und Stoye 2013).

Die zweite Gruppe von Restriktionsfaktoren ist APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme). APOBEC3G wurde erstmals als ein antiretroviraler Faktor beschrieben, welcher in der Lage ist, Vif-defizientes HIV-1 zu hemmen. Der Hauptmechanismus beruht auf einer Desaminierung von Desoxycytidin-Resten im Minus-Strang des ssDNA-Virusgenoms während der reversen Transkription. Dadurch werden G-zu-C-Mutationen eingeführt, welche zum Abbau der revers transkribierten DNA bzw. zu letalen Mutationen des kodierenden Strangs im integrierten Provirus führen (Stavrou und Ross 2015; Lee 2010).

Der jüngst beschriebene retrovirale Restriktionsfaktor ist Tetherin. Es ist ein interferon-induzierbarer Faktor, welcher verschiedene behüllte Viren an der Zelloberfläche bindet und damit deren Freisetzung inhibiert (Hotter et al. 2013; Simon et al. 2015).

In Abbildung 5 sind die zellulären Restriktionsfaktoren und deren Wirtsort graphisch dargestellt.

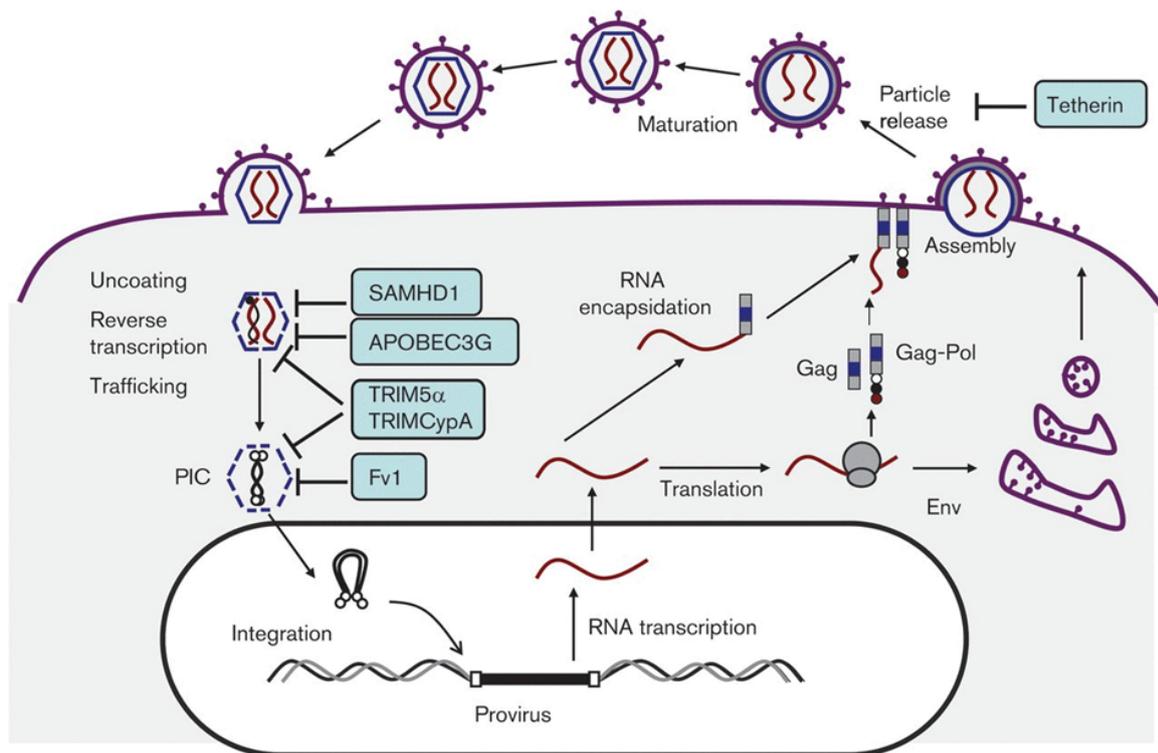


Abbildung 5: Antivirale Restriktionsfaktoren.

Beim Viruseintritt bindet TRIM5 α an das Capsid, wodurch der Uncoating-Prozess blockiert wird. APOBEC3 kann bei der Verpackung des Viruspartikel in das Capsid eingeschleust werden. Es erzeugt durch Desaminierung Mutationen in der viralen DNA, wodurch diese in der nächsten infizierten Zelle defekt ist. Tetherin bindet das Virus bei der Freisetzung und hemmt so die Virusfreisetzung und Reifung zum infektiösen Partikel (Übernommen aus Sanz-Ramos und Stoye 2013).

2 Zielsetzung

Obwohl das GFP-Reportergen ein attraktives Tool zur Abbildung molekularer Prozesse darstellt, ergeben sich Nachteile in der sensitiven Quantifizierung von Infektionsprozessen. Um diesem Problem entgegen zu wirken, soll das bislang im Plasmid HERV-K_{con} verwendete EGFP-Reportergen gegen das Luciferase-Gen ausgetauscht werden.

Mit dem neuen Plasmidkonstrukt sollen HERV-K(HML-2) basierte Reporterviren hergestellt und in einem Infektionsexperiment analysiert werden. Dazu stehen verschiedene humane und nicht-humane Zelllinien zur Verfügung. In einem parallelen Versuchsansatz sollen EGFP-Reporterviren zur Infektion eingesetzt werden, um Unterschiede in der Reporteraktivität und Sensitivität zu quantifizieren. Neben der Quantifizierung der Reporteraktivität soll virale DNA über die Detektion des Reportergens in einer Real-Time PCR nachgewiesen werden.

Darüber hinaus gilt es spezifisch virale cDNA als Produkt der reversen Transkriptase nachzuweisen. Zum Nachweis viraler cDNA werden Vollängenmolekularklone zur Herstellung von Reporterviren verwendet, welche in der U3-Region der 3'LTR verändert sind. Durch Mutagenese wird eine kurze Markersequenz eingebracht, welche während der reversen Transkription durch intramolekulare Umlagerungen verdoppelt wird und somit in der 3'LTR und 5'LTR der viralen cDNA vorhanden ist. Durch den Einsatz einer geeigneten Primerkombination dient die Mutation in der 5'LTR zum Nachweis viraler cDNA und soll über eine duplex Real-time PCR detektiert werden. Um die Sensitivität der PCR zu quantifizieren, sollen Vorversuche mit einer Positivkontrolle durchgeführt werden. Diese wurde in einer vorherigen Arbeit generiert und soll im Rahmen der Masterarbeit durch Mutagenese verändert werden, um die gewünschte Markersequenz einzufügen.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

	Charakterisierung
CrFK - <i>Crandell-Rees Feline Kidney cells</i>	Mesenchymale Zellen aus der Niere der Katze
HEK293T - <i>Human embryonal kidney cells</i>	Humane, embryonale Zellen aus der Niere
HeLa	Humane Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom

3.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

	Hersteller
One Shot™ Stbl3™ Chemically competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific
One Shot™ TOP10 Chemically competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific

3.1.3 Enzyme

Es wurden passend zu dem Hersteller empfohlene Restriktionspuffer verwendet.

3.1.3.1 Klonierung

Tabelle 3: Verwendete Enzyme für die Klonierung

	Hersteller
<i>Adel</i>	New England BioLabs
<i>DpnI</i>	Agilent Technologies
<i>KpnI</i>	New England BioLabs
<i>NheI</i>	New England BioLabs
<i>NotI</i>	New England BioLabs
<i>SacI</i>	New England BioLabs
<i>XbaI</i>	New England BioLabs
Calf Intestineal Alkaline Phosphatase (CIP) 1U/μl	Invitrogen
Turbonuclease from <i>Serratia marcescens</i>	Sigma-Aldrich GmbH

3.1.3.2 PCR

Tabelle 4: Verwendete Enzyme für die PCR

	Hersteller
DreamTaq™ Hot Start Green DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Plasmidkonstrukte

Die im folgenden aufgelisteten Plasmide wurden im Rahmen der Arbeit verwendet.

Amp^r = β -Lactamase-Gen (vermittelt Ampicillin-Resistenz, Kan^r /Neo^r = Neomycin-Phosphotransferase-Gen (vermittelt Kanamycin- und Neomycin-Resistenz)

Tabelle 5: Verwendete Plasmidkonstrukte

	Charakterisierung	Resistenz	Bezugsquelle
CMVoriLuc	Exprimiert die <i>Firefly</i> -Luciferase unter Kontrolle des EF1 α Promotors, sowie das HERV-K (HML-2) Genom	Amp ^r	Philipp Kramer, FG 18, RKI
CMV-oriST HERV	HERV-K113 Moleklarklon mit einem CMV-Promotor, statt der U3-Region in der 5'LTR	Amp ^r	(Lausch 2013)
HERV-K_{con} - Luciferase CCGBX	Reporterplasmid, welches die Konsensussequenz von HERV-K (HML-2) („HERVK _{con} “) enthält und für die <i>Firefly</i> -Luciferase in der <i>env</i> -Region codiert	Amp ^r	Im Rahmen der Arbeit generiert
HERV-K_{con}GFP CCGBX	Reporterplasmid, welches die Konsensussequenz von HERV-K (HML-2) („HERVK _{con} “) enthält und für EGFP in der <i>env</i> -Region codiert	Amp ^r	(Lee und Bieniasz 2007)
K_{con}GFP	Codiert für die viralen Proteine Gag, Protease (Pro) und Polymerase (Pol)	Amp ^r	(Lee und Bieniasz 2007)

pBSKoriST-HERV	HERV-K113 Moleklarklon mit Rckmutation der nicht synonymen und stillen Mutationen	Amp ^r	(Lausch 2013)
pcDNA4	Leervektor	Amp ^r	Invitrogen
pCR-XL-TOPO®	Vektorkonstrukt fr die Klonierung langer (3–10 kb) PCR-Produkte	Kan ^r , Neo ^r	Invitrogen
Rev Ursprung: HIV	Involviert in den Export ungesplicerter mRNA	Amp ^r	(Hanke et al. 2013)
Positivkontrolle (PTC)	Enthlt den Sac-Taq in der 5´LTR und das gag-Gen im pCR ₄ TOPO	Amp ^r	Im Rahmen der Arbeit generiert
Staufen-1	Humanes dsRNA-bindendes Protein, erhht die Partikelproduktion	Amp ^r	(Hanke et al. 2013)
VSV-G	Glykoprotein des Vesikular-Stomatitis Virus	Amp ^r	Addgene Catalog #138479

3.1.5 DNA-Lngenstandards und Gelbeladungspuffer

Tabelle 6: Verwendete Lngenstandards und Gelbeladungspuffer

	Hersteller
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
6x TriTrack DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific

3.1.6 Primer, Sonden und Templates

Die im Folgenden tabellarisch aufgelisteten Primer wurden für PCR- basierte Verfahren, wie den PERT-Assay, Mutagenese oder die Sangersequenzierung genutzt. Die Primer wurden für den Gebrauch auf eine Arbeitskonzentration von 10µM verdünnt.

3.1.6.1 PERT-Assay

Tabelle 7: Primer, Sonden und Templates für den PERT-Assay

	Sequenz	Hersteller
Horie2010_PERT-For	5'-TCC TGC TCA ACT TCC TGT CGA G-3'	IDT
Horie2010_PERT-Rev	5'-CAC AGG TCA AAC CTC CTA GGA ATG-3'	IDT
MS2-PERT_Horie-Probe (FAM)	5'-TCT TTA GCG AGA CGC TAC CAT GGC TA-3'	IDT
MS2-RNA-Template		Sigma-Aldrich

3.1.6.2 Klonierung

Tabelle 8: Primer für die Klonierung

	Sequenz	Hersteller
Adel-5865- For	5'-CAC CCA GTG TCA AGT CTT ACA CCT-3'	IDT
Adel-5857- For	5'-CAA CAT TGC ACC CAG TGT CAA GTC-3'	
KpnI-Luc-For	5'-ATG CGG TAC CGC CGC ATG GAA GAC GCC AAA-3'	
Nhe-Rev	5'-GCT AGC TGT AGG GGT GGG TT-3'	
Not-Luc-Rev	5'-GCA TGC GGC CGC TTA CAC GGC GAT CTT TCC G-3'	
oriST-XbaI-For	5'-GAA GCT GAC GCA GTT AGC TAC-3'	
oriST-NotI-Rev	5'-AAC AAA AGC TGG AGC ACC C-3'	

3.1.6.3 Mutagenese

Tabelle 9: Primer für die Mutagenese

	Sequenz	Hersteller
KpnI-For	5'-CTA GAG AAC CCA CTG CTG GTA CCT GGC ATG GTG AGC AAG G-3'	IDT
KpnI-Rev	5'-CCT TGC TCA CCA TGC CAG GTA CCA GCA GTG GGT TCT CTA G-3'	
KpnI-mut-For	5'-GCT ATG CAT CAA GCT TGG AGC CGA GCT CGG ATC CAC TA-3'	
KpnI-mut-Rev	5'-TAG TGG ATC CGA GCT CGG CTC CAA GCT TGA TGC ATA GC-3'	
NotI-For	5'-CAA GTA AAG GAA ATT TGC GGC CGC AGG AAC TGA GGC AAT TGC A-3'	
NotI-Rev	5'-TGC AAT TGC CTC AGT TCC TGC GGC CGC AAA TTT CCT TTA CTT G-3'	
NotI-mut-For	5'-ACA CTG GCG ATC GCT CGA GCA TGC ATC AGG AGG GCC CA-3'	
NotI-mut-Rev	5'-TGG GCC CTC CTG ATG CAT GCT CGA GCG ATC GCC AGT GT-3'	
mutU3Taq1-Rev	5'-AGG AGA CAG ATG CCT GAG CTC TGT CTC AAC TGC AAG AG-3'	
mutU3Taq2-For	5'-CTC TTG CAG TTG AGA CAG AGC TCA GGC ATC TGT CTC CT-3'	
mutU3Taq3-Rev	5'-GGA GAC AGA TGC CTT CCT CTG AGC TCA ACT GCA AGA GGC ATT CCT TC-3'	

3.1.6.4 Real-Time PCR

Tabelle 10: Primer und Sonden für die Real-time PCR

	Sequenz	Hersteller
catGAPDH-For	5'-GGT GAT GCT GGT GCT GAG TAT-3'	IDT
catGAPDH-Probe (HEX)	5'-CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC TGG G-3'	
catGAPDH-Rev	5'-TGG TTC ACG CCC ATC ACA A-3'	
EGFP-Forward	5'-ACT ACA ACA GCC ACA ACG TCT ATA TCA-3'	
EGFP-Probe (FAM)	5'-CCG ACA AGC AGA AGA ACG GCA TCA-3'	
EGFP-Reverse	5'-GGC GGA TCT TGA AGT TCA CC-3'	
HERV pFor	5'-CCA ACG TGG AGG CTT TTC TCT AG-3'	
HERV pVL-1-Rev	5'-ATC ACC CTA GCT TCT TCC GA-3'	
HERV Probe (FAM)	5'-AGG TAC GCT CGA GCG TGG TCA TTG AGG-3'	
Luc-For	5'-AAC AAT CCG GAA GCG ACC AA-3'	
Luc-Probe (FAM)	5'-ACT GGG ACG AAG ACG AAC AC-3'	
Luc-Rev	5'-ACA CCT GCG TCG AAG ATG TT-3'	
U3-Taq-For	5'-TGC CTC TTG CAG TTG AGC TC-3'	
U3-Taq-Probe (FAM)	5'-AAG GCA TCT GTC TCC TGC CTG TC-3'	
U3-Taq-Rev	5'-CTA GAG AAA AGC CTC CAC GTT GG-3'	

3.1.6.5 Sequenzierung

Tabelle 11: Primer für die Sequenzierung

	Sequenz	Hersteller
Luc-N-term-For	5'-GTA CCG AAA GGT CTT ACC G-3'	IDT
Luc-N-term-Rev	5'-CCT TAT GCA GTT GCT CTC C-3'	
M13-For	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'	
M13-Rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	

3.1.7 Verwendete Kits und deren Hersteller

Tabelle 12: Verwendete Kits

	Hersteller
HS-Mg RT Activity Kit (Cavidi-Assay)	Cavidi AB
Lipofectamine 3000 Transfection Kit	Thermo Fisher Scientific
Luciferase 1000 Assay System	Promega Corporation
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN GmbH
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN GmbH
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH
QIAquick Gel extraction Kit	QIAGEN GmbH
Quick Ligation™ Kit	New England BioLabs
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
SensiFAST Probe No-Rox Kit	Bioline
SensiFAST Probe No-Rox One Step Kit	Bioline
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen
Turbo DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific

3.1.8 Lösungen, Medien und Puffer

3.1.8.1 Zellkultur

Tabelle 13: Zusammensetzung der Lösungen, Medien und Puffer für Zellkulturarbeiten

	Hersteller/Zusammensetzung
DMEM	Robert Koch-Institut
DMEMc	DMEM + 5%FBS + 1%Pen/Strep
FBS	Merck/ Biochrom
PBS	0,01 M NaH ₂ PO ₄ , 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,2
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich GmbH/ Biochrom

3.1.8.2 Bakterienkultur

Tabelle 14: Medien und Antibiotika für die Bakterienkultur

	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH
Kanamycin	Sigma-Aldrich GmbH
LB-Agar [20g/l Agar]	Robert-Koch-Institut
LB-Medium	Robert-Koch-Institut
S-O.C Medium	Invitrogen

3.1.8.3 Sequenzierung

Tabelle 15: Reagenzien für die Sequenzierung

	Hersteller
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	Thermo Fisher Scientific
BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	Thermo Fisher Scientific

3.1.8.4 PCR-basierte Verfahren

Tabelle 16: Reagenzien für die PCR

	Hersteller/Zusammensetzung
2x Lysis-Puffer	0,25% Triton X-100, 50mM KCl, 100mM TrisHCl, 40% Glycerol, pH 7,4
RNase OUT™ [40U/μl]	Thermo Fisher Scientific
SensiFAST™ Probe No-ROX Master Mix	Bioline

3.1.8.5 Restriktionsverdau/ DNase-Verdau

Tabelle 17: Pufferlösungen für den Restriktionsverdau

	Hersteller
10x Buffer Benzonase	500mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 1mg/ml BSA, pH=8
CutSmart Puffer	New England BioLabs
10x Fast Digest Puffer	Thermo Fisher Scientific
1x TAE Puffer	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 7,2

3.1.8.6 ELISA

Tabelle 18: Lösungen und Puffer für den p27-ELISA

	Zusammensetzung
Blockierlösung	2% Milchpulver 1x PBS
PMT	2% Milchpulver in 1xPBS 10% Tween
Waschpuffer	1x PBS 10 % Tween

3.1.9 Antikörper und Antigene

Tabelle 19: Verwendete Antikörper/Antigene

	Hersteller
α -rabbit IgG Peroxidase Antikörper	Sigma
<i>Human endogenous retrovirus monoclonal antibody</i> (HERMA7)	Dr. Klaus Boller, PEI
VD K140 p5B (α -oriHERV p27-CA Kaninchenserum)	Dr. Oliver Hohn, Robert Koch-Institut

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 20: Verwendete Verbrauchsmaterialien

	Hersteller
24-Well/12-well/6-well-Platte	Techno Plastic Products AG
96-Well-PCR-Platte	Bio-Rad
Microseal PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad
Nitrocellulose Membran 0,45 μ m	Bio-Rad
Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific
PCR SingleCap 8er-SoftStrips (200 μ l)	Biozym Scientific
Pipettenspitzen	ART, Biozym, Brand, Sorenson, VWR
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 20ml)	Techno Plastic Products AG
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Zellkulturflasche	Techno Plastic Products AG
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Techno Plastic Products AG

3.1.11 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 21: Verwendete Reagenzien/Chemikalien

	Hersteller
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Agarose	Carl Roth GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH
Polybrene [1mg/μl]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Polyethylenimine (PEI) [2,5μg/μl]	Polysciences, Inc
Reporter Lysis 5x Buffer	Promega Corporation
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck
Stavudin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Succrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3.1.12 Geräte

Tabelle 22: Verwendete Geräte

	Hersteller
Avanti J-20 XP Zentrifuge	Beckman Coulter
Brutschrank für Bakterien	Heraeus
CO ₂ -Inkubator Zellkultur	Thermo Fisher Scientific
Coulter Particle Count & Size Analyzer Z2	Coulter Electronics Inc.
ELISA Reader Sunrise	Tecan Group
FACS-Calibur E3476	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS100	Nikon
Geldoc Transilluminator	PHASE GmbH
Gelschlitten	Bio-Rad
Heizblock	Grant Instruments
Inkubationsschüttler C24	New Brunswick Scientific
Laminar-Flow Kabine Aura PCR	EuroClone
LUMIstar Omega	BMG LABTECH GmbH
NanoDrop 1000 Spectrometer	PEQLAB
Pipetten	Eppendorf

Pipettierhilfe - Accu-jet® pro	BRANDT
Real-Time PCR Detection System C1000	Bio-Rad
Sterilbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	Bio-Rad
Ultrazentrifuge Optima L-Look	Beckman Coulter
Wasserbad	PolyScience
Zentrifuge Biofuge Primo R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Mikro200R	Hettich

3.1.13 Softwares

Tabelle 23: Verwendete Softwares zur Quantifizierung

	Entwickler
CellQuestPro	BD Biosciences
CFX Maestro	Bio-Rad
ELISA Software: Easy Reader	Etabliert von Dr. S. Norley, RKI
Geneious R11	Biomatters Ltd.
GraphPad Prism 8	GraphPad Prism Software Inc.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Zur Generierung der Forschungsergebnisse wurden humane (HEK293T/HeLa) und nicht-humane (CrFK) Zelllinien verwendet, die bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert wurden. Die Kultivierung wurde mit Dubecco's MEM (DMEM) durchgeführt, das mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen und durch die entsprechende Menge an frischem Medium ersetzt. Um zu vermeiden, dass die kultivierten Zellen absterben oder zu dicht anwachsen, wurden die Zellen subkultiviert (bzw. geerntet), wenn eine Konfluenz von 80-90% erreicht war. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend wurden diese mit 2ml Trypsin/EDTA versetzt, welches die Adhäsionsmoleküle der Zellen abbaut und diese vom Boden der Zellkulturflasche ablöst (Gori 1964).

Nach einer Inkubationszeit von 3-4min im CO₂-Inkubator, wurde die Trypsinwirkung durch die Zugabe von 8ml DMEM abgestoppt. Für eine Subkultivierung wurden die Zellen in Abhängigkeit der Konfluenz im Verhältnis 1/10 bzw. 1/20 gesplittet.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Verwendung von Zellen für eine Transfektion bzw. Infektion, wurde entsprechend dem Kultivierungsformat eine definierte Zellmenge ausgesät. Die Zellzahl wurde hierfür mit dem Coulter-Particle Count & Size Analyzer bestimmt. 10µl der gewonnenen Zellsuspension wurde dafür in 10ml Isoton (1:10000) verdünnt. Für die Messung mit dem Coulter- Particle Count & Size Analyzer wurden entsprechend dem Zelltyp und der Zellgröße bestimmte Messeinstellungen vorgenommen.

Die entsprechenden Zellzahlen für das jeweilige Kultivierungsformat sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Zellzahl für die entsprechenden Kultivierungsformate

	Zellzahl pro well/Schale
Zellkulturschale 150cm ²	8*10 ⁶
6-well Platte	3*10 ⁵
12-well Platte	2*10 ⁵
24-well Platte	1*10 ⁵
96-well Platte	0.1*10 ⁵

3.2.1.3 Transfektion

Die Transfektion bezeichnet das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen (Gressner et al. 2007). Im Rahmen der Masterarbeit wurden dafür zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Dazu gehört die lipidvermittelte Transfektion mit Lipofektamin und die polymervermittelte Transfektion mit Polyethylenimine (PEI).

3.2.1.3.1 Transfektion mit Lipofektamin

Die Transfektion mit Lipofektamin ermöglicht eine Aufnahme von DNA über Liposomen. Lipofektamin besteht aus positiv geladenen Lipidmolekülen, welche in wässriger Phase Liposomen ausbilden und dadurch in der Lage sind, die negativ geladene DNA zu komplexieren und sich an die Zelloberfläche anzulagern. Die DNA kann so direkt über Fusion ins Cytoplasma der Zelle gelangen (Schedel 2011).

Die Transfektion mit Lipofektamin wurde in 96-well durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen am Vortag ausgesät, sodass eine Konfluenz von 80% erreicht wurde. Entsprechend der Herstellerangaben wurden für die Transfektion in 96-well insgesamt 100ng Plasmid-DNA pro Ansatz verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Angaben von Thermo Fisher Scientific.

Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h bzw. 48h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.3.2 Polymervermittelte Transfektion mit PEI

Die polymervermittelte Transfektion mit PEI wurde insbesondere für die Generierung von Reporterviren angewandt. Die Transfektionsmethode beruht auf dem Prinzip, dass das kationische Reagenz mit der negativ geladenen DNA zu Partikeln kondensiert. Diese können an die Oberfläche der Zelle binden und über Endozytose aufgenommen werden (Sonawane et al., 2003)

Für den Transfektionsversuch wurden HEK293T-Zellen geerntet und in eine 150cm² Zellkulturschale ausgesät. Der Ansatz wurde für 24h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Transfektion der HEK293-Zellen fand am darauffolgenden Tag statt. Hierfür wurde 2ml basales DMEM (ohne den Zusatz von FBS und Penicillin/Streptomycin) in ein Falcon vorgelegt und die zu transfizierenden Plasmide anschließend in der vorgeschriebenen Einsatzkonzentration zugegeben.

Die Einsatzkonzentrationen für die Generierung verschiedener Reporterviren sind den folgenden Tabellen 25 und 26 zu entnehmen. Die Prozentangabe bezieht sich auf eine Transfektionsmenge von 12µg/Zellkulturschale.

Tabelle 25: Prozentualer Anteil der Plasmide zur Generierung von HERV-K_{con}-basierten Reporterviren

HERV K _{con}	50%
conGPP	30%
Rev	10%
VSV-G	10%

Tabelle 26: Prozentualer Anteil der Plasmide zur Generierung von Reporterviren mit den Vollängenmoleklarklonen pBSKoriST und CMV-oriST

Staufen-1 wurde eingesetzt um die Partikelproduktion zu steigern (Hanke et al. 2013).

pBSKoriST bzw. CMVoriST	85%
VSV-G	10%
Staufen-1	5%

Nach Zugabe der Plasmide wurde die Transfektionsreagenz Polyethylenimine (PEI) im Verhältnis 1:3 zu dem Transfektionsansatz zupipettiert und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit mit der Transfektionsreagenz wurde das alte Medium aus den Zellkulturschalen abgenommen und durch frisches DMEMc ersetzt. Nach 15min wurde je 2ml des Transfektionsansatzes vorsichtig zu jeder Zellkulturschale zugegeben und für 8h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium durch die äquivalente Menge an frischem DMEMc ausgetauscht.

Die im Zellkulturüberstand vorhandenen Reporterviren wurden nach 48h bzw. 72h gesammelt und vereinigt.

3.2.1.4 Ultrazentrifugation

Das Verfahren der Ultrazentrifugation wurde eingesetzt, um die Viruspartikel aus den Zellkulturüberständen zu sedimentieren. Hierfür wurde der Virusüberstand bei 1400rpm für 5min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Falcon überführt und durch einen 0,45µM Sterilfilter filtriert. Anschließend wurde je 5 ml einer 20%-igen Sucrose-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen vorlegt und vorsichtig mit 32ml des filtrierten Überstands überschichtet. Dieser Ansatz wurde im nächsten Schritt bei 31000rpm und 4°C für 3h zentrifugiert.

Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in 100-300µl DMEMc resuspendiert. Die Suspension wurde in PCR-Tubes aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.2.1.5 Infektion humaner und nicht humaner Zelllinien mit Reporterviren

Die generierten Viruspartikel wurden anhand des p27-Capsidgehalts bzw. der RT-Aktivität normalisiert und anschließend für Infektionsexperimente genutzt.

Hierfür wurden die humanen bzw. nicht-humanen Zellen in einem geeigneten Kultivierungsformat ausgesät und bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zielzellen infiziert. Hierfür wurde die kalkulierte Virusmenge mit Medium aufgefüllt und Polybrene versetzt. Das Medium der Zellen wurde daraufhin vollständig abgenommen und die Virussuspension vorsichtig zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C für 2h im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inokulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium zu den Zellen zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 24h bzw. 48h bei 37°C im Brutschrank. Um die infizierten Zellen quantifizieren zu können, wurde entsprechend dem GFP-Reportersystem eine FACS-Analyse durchgeführt. Bei den Luciferase-Reporterviren wurde die Luciferaseaktivität mittels eines Luciferase-Assays bestimmt.

Die beiden Quantifizierungsmethoden werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

3.2.1.6 Durchflusszytometrie zur Phänotypisierung von infizierten Zellen

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine Charakterisierung von Einzelzellen aufgrund ihrer zellulären Eigenschaften. In einer großen Anzahl an Zellen können gleichzeitig mehrere Marker, wie beispielsweise die Größe oder Fluoreszenz gemessen werden (Boujard et al. 2014).

Bei einer durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen durch einen Hüllstrom verdünnt und als Einzelzellsuspension in eine Flusszelle eingebracht. Die Zellen werden nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt und können so analysiert werden (Sack et al. 2007).

Für die vorliegende Arbeit wurden GFP-Reporterviren generiert, welche bei einer erfolgreichen Infektion die virale DNA in das Genom der Zelle integrieren können. Dadurch exprimiert die infizierte Zelle den Fluoreszenzfarbstoff GFP. Man macht sich dies beim FACS zunutze, da der Fluoreszenzfarbstoff mit einem Laserstrahl angeregt und die Zelle dadurch als infiziert charakterisiert werden kann.

Um die Zellen im FACS messen zu können, wurden diese zu unterschiedlichen Messzeitpunkten nach Infektion geerntet und bei 1200g für 10min zentrifugiert. Anschließend folgten zwei Waschstufen mit PBS. Das Zellpellet wurde daraufhin zur Fixierung in 250µl 2%-igem PFA aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Die Messung der GFP-positiven Zellen erfolgte entsprechend eines in der Arbeitsgruppe etablierten Templates. Hierzu war es notwendig, vor der Messung nicht-infizierte Zellen zu messen. Anhand dieser Messung kann ein Marker gesetzt werden, durch den die infizierten Zellen in der Auswertung eingegrenzt werden können.

3.2.1.7 Luciferase-Assay

Neben dem EGFP-Reportergen, wurde die *Firefly*-Luciferase als neues Reportersystem in HERV K_{con} etabliert. Um die Aktivität des Reporterenzym bestimmen zu können, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Hierbei macht man sich die besondere Eigenschaft des Luciferase-Enzyms zunutze, das in Gegenwart von ATP, Mg²⁺ und O₂ die Oxidation von Luciferin katalysiert (Smale 2010; Promega 2017).



Als Endprodukt entsteht neben Oxyluciferin auch Licht, welches mit Hilfe eines Luminometers detektiert werden kann. Da die Stärke der Lichtemission mit der Menge an infizierten Zellen korreliert, kann mit der Quantifizierung des Signals auch indirekt eine Aussage über die Stärke der Infektion gemacht werden (Smale 2010).

Für die Durchführung der Luciferase-Assays wurden die Zellen zuvor lysiert, da dies die Freisetzung des Reporterenzym ermöglicht. Der Versuchsablauf erfolgte entsprechend der Herstellerangaben von Promega.

Von dem entstandenen Zelllysat wurden 22,5µl für die Aktivitätsbestimmung der Luciferase eingesetzt und dazu in eine weiße 96-well Platte überführt. Die Luciferaseaktivität wurde durch die Zugabe von 50µl/well Luciferasesubstrat gemessen.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Die Vervielfältigung von Vektor-DNA erfolgte *in-vitro* in Bakterienzellen. Hierbei wurde die Hitzeschock-Methode zur Transformation der DNA angewandt.

Für die Transformation wurden im ersten Schritt 50µl kompetente *E. coli* Bakterien mit 1-5µl Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Dies führt dazu, dass Poren in der Zellmembran der Bakterien erzeugt werden, wodurch die Plasmid-DNA in die Zelle gelangt. Anschließend wurde

der Transformationsansatz durch eine Inkubation auf Eis abgekühlt, was verhindert das sich der Prozess umkehrt (Panja et al. 2008).

Nach der zweiminütigen Inkubationszeit auf Eis wurde 250µl S.O.C Medium zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 1h im Schüttler bei 180rpm inkubiert. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation wurden je 50-200µl der Zellsuspension auf LB-Platten ausplattiert und im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion auf transformierte Bakterien erfolgte über eine Ampicillin- bzw. Kanamycin-Resistenz, welche auf dem Vektor codiert ist.

3.2.2.2 Plasmidpräparation

Die Isolation kleiner DNA-Mengen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit, für größere Plasmidmengen wurde das QIAprep Spin Maxiprep Kit verwendet.

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 5ml LB-Medium gelöst, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin:100 µg/ml bzw. Kanamycin: 50 µg/ml) versetzt war.

Zur anschließenden Isolation kleiner DNA-Mengen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit wurde die Suspension über Nacht bei 37°C und 180rpm im Schüttler inkubiert. Für die Gewinnung größerer DNA-Mengen mithilfe des QIAprep Spin Maxiprep Kits wurde die Einzelkolonie ebenfalls in 5ml LB-Medium gelöst und nach einer Inkubationszeit von ca. 4h in 250ml (high-copy plasmid) bzw. 500ml (low-copy plasmid) LB-Medium mit Kanamycin bzw. Ampicillin überführt. Zur Überprüfung der isolierten DNA wurde anschließend ein Restriktionsverdau bzw. eine Sangersequenzierung durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Spektrometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektrometrisch bei 260nm (A₂₆₀) bestimmt. Die in den Nukleinsäuren enthaltenen Basen weisen bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum auf. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50ng/µl DNA (Schulz, 2015).

Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wurde ebenfalls die Absorption bei 280nm (A₂₈₀) bestimmt und als Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ dargestellt. Der Quotient sollte idealerweise 1,8–2,0 betragen, was einer sauber extrahierten DNA entspricht (Arnemann 2019).

3.2.2.4 Restriktionsverdau – Analytischer und präparativer Ansatz

Die Restriktionsanalyse diente der Charakterisierung der Plasmide (analytischer Ansatz) bzw. der Isolation der Spaltprodukte (präparativer Ansatz) zur Generierung neuer Vektorkonstrukte. Für den Verdau wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, welche spezifische Sequenzmotive auf der DNA erkennen und diese gezielt an diesen Positionen schneiden. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Längen, welche unter Verwendung einer Agarosegelelektrophorese analysiert bzw. isoliert werden können.

Bei dem analytischen Restriktionsverdau betrug das Gesamtvolumen pro Ansatz 15µl und wurde unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 0,3-0,5µg Plasmid-DNA, 1x Puffer und 0,5µl Enzym. Für den präparativen Restriktionsverdau wurde ein Gesamtvolumen von 50µl gewählt, wobei jedoch 2-3µg Plasmid-DNA und 2µl Enzym eingesetzt wurden. Die restlichen Parameter blieben unverändert. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte bei 37°C für 15-60min.

Im Zuge eines präparativen Restriktionsverdaus wurde nach der Inkubationszeit 1µl der Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) zu der Vektor-DNA zugegeben und für weitere 30min bei 37°C inkubiert. Das Enzym entfernt die 5´Phosphatgruppe und vermindert damit die Religation des Vektors. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben anschließend für 15min bei 65°C inkubiert. Zu Kontrollzwecken wurde das ungeschnittene Plasmid bei jedem Verdau mitgeführt. Hierbei wurde die entsprechende Menge an Enzym durch Wasser ersetzt.

3.2.2.5 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mittels einer Gelelektrophorese größenabhängig im Polymergel aufgetrennt werden. Da die DNA aufgrund ihres Phosphat-Rückgrats eine negative Ladung aufweist, wandert diese beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Kathode. Dabei ist deren Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Größe, da große Fragmente im Polymergel stärker zurückgehalten werden als kurze Fragmente (Knippers 2006).

Für die Herstellung des Polymergels wurde Agarose in 100ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde die Agarosekonzentration auf 0,8-2% angepasst. Das flüssige Gel wurde nach dem Aufkochen mit Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelapparatur gegossen. Die Zugabe von Ethidiumbromid dient der Visualisierung der DNA-Fragmente. Es handelt sich um einen Farbstoff, der in die DNA interkaliert und unter UV-Licht sichtbar wird, wodurch das Bandenmuster im Transilluminator dargestellt werden kann. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten in die mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

Die Proben wurden vor der Beladung auf das Gel im Verhältnis 1:6 mit 6x DNA-Loading-Dye versetzt. Abhängig von der Größe des DNA-Fragments wurde der GeneRuler 1kb (plus) DNA Ladder oder der GeneRuler 100bp DNA Ladder als Größenstandard verwendet. Die Elektrophorese wurde 60-90min bei 90V durchgeführt. Im Transilluminator konnten die DNA-Banden mittels UV-Licht ausgewertet werden.

3.2.2.6 Gelextraktion von Plasmid-DNA

Für die DNA-Isolation aus dem Agarose-Gel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Die DNA-Bande wurde hierzu unter dem Transilluminator visualisiert und mithilfe eines Skalpell's herausgeschnitten.

Die Durchführung fand entsprechend der Herstellerangaben statt. Für kleine DNA-Mengen wurde die DNA abweichend von den Herstellerangaben in nur 20µl Elutionspuffer eluiert. Die Konzentration der extrahierten Plasmid-DNA wurde spektrometrisch mit dem Nanodrop bestimmt. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.2.7 Klonierung von DNA

Eine Klonierung ermöglicht die Generierung neuer Expressionsvektoren, durch das Einbringen eines DNA-Fragments in einen Vektor. Um Vektor und DNA-Fragment miteinander zu verknüpfen, mussten beide Komponenten im Zuge eines Restriktionsverdau's mit denselben Enzymen geschnitten werden. Es entstehen dadurch komplementäre Enden, welche im Zuge einer Ligationsreaktion kovalent verknüpft werden können. Hierzu wurde die QuickLigase verwendet, ein Enzym, welches über freie 3'-OH-Gruppen und 5'-Phosphat-Enden neue Phosphodiesterbindungen knüpfen kann.

Die Ligationsreaktion wurde entsprechend den Vorgaben des QuickLigase Kits von BioLabs durchgeführt. In einem finalen Volumen von 20µl wurden jeweils 50ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Menge an Insert wurde gemäß der folgenden Formel kalkuliert.

$$\text{Masse Insert (ng)} = \frac{\text{Vektormasse (ng)} \cdot \text{Insertlänge (bp)}}{\text{Vektorlänge (bp)}}$$

In der Tabelle 27 sind alle Bestandteile der Ligationsreaktion zusammengefasst.

Tabelle 27: Zusammensetzung des Ligationsansatzes mit der Quick Ligase

	µl/Ansatz
Quick Ligase Reaction Buffer (2x)	10
Quick Ligase (2x)	1
Vektor-DNA (50ng)	Xµl
Insert-DNA	Xµl
Nuklease-freies Wasser	ad. 20

Der Ligationsansatz wurde für 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli* transformiert.

3.2.2.8 Isolation genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA wurde das QIAamp DNA Mini Kit genutzt. Die Isolation wurde entsprechend dem Protokoll „DNA Purification from Blood or Body Fluids“ durchgeführt. Nach der Isolation wurde die DNA normalisiert und als Template in der Real-Time-PCR eingesetzt.

3.2.2.9 Isolation viraler RNA

Zur Extraktion der viralen RNA wurde das QIAamp Viral RNA Kit verwendet. Die Versuchsschritte wurden dabei entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Das Turbo-DNase *free* Kit wurde nach der RNA-Isolation verwendet, um DNA-Rückstände zu eliminieren. Die RNA konnte anschließend als Template in der qRT-PCR eingesetzt werden, um die Anzahl der Viruskopien zu quantifizieren.

3.2.2.10 PCR-basierte Methoden

Die Polymerase-Chain Reaktion wurde im Zuge der Arbeit vielfach für unterschiedliche Zielstellungen verwendet. Hierzu gehören neben der Vervielfältigung von DNA für die Klonierung, auch die Mutagenese und die Sangersequenzierung.

Das PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: Die Denaturierung dient der Trennung des DNA-Doppelstrangs, das Annealing der Primerhybridisierung und die Elongation der DNA-Vervielfältigung. Im Folgenden wird die Durchführung der PCR-basierten Verfahren kurz erläutert.

3.2.2.10.1 Konventionelle PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt *in-vitro* eine Amplifikation ausgewählter Sequenzabschnitte aus geringen Ausgangsmengen von DNA. Für die Durchführung der PCR wurden entsprechend der Zielsetzung die Maxima *Taq* DNA-Polymerase bzw. die *Pfu*-Polymerase verwendet. Die Maxima *Taq*-Polymerase wird vorwiegend für die TA-Klonierung verwendet, da das Enzym durch die fehlende *proof-reading* Funktion 3'-Überhänge erzeugt, welche die Ligationsreaktion im Vektor ermöglichen. Diese Funktion ist bei der *Pfu*-Polymerase nicht vorhanden. Dennoch bieten sich durch die vorhandene *proof-reading* Funktion einige Vorteile. Das Enzym arbeitet genauer und ist weniger fehleranfällig, weshalb Mutationen in der amplifizierten Sequenz deutlich weniger auftreten. Das Protokoll für die Durchführung der PCR mit der Maxima *Taq*-Polymerase bzw. der *Pfu*-Polymerase ist in der Tabelle 28-30 dargestellt.

Tabelle 28: Protokoll für die konventionelle PCR mit der *Taq*-Polymerase

	Endkonzentration	µl/Ansatz
Maxima <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5U/µl)	1U	0,2
10x Hot Start Puffer	1x	2,5
dNTPs (10mM)	0,2mM	0,5
MgCl ₂ (25mM)	2mM	2
Primer-Forward (10µM)	200mM	0,5
Primer-Reverse (10µM)	200mM	0,5
RNAse-free H ₂ O		17,8
Template-DNA (10-20ng)		1
total		25µl

Tabelle 29: Protokoll für die konventionelle PCR mit der *Pfu*-Polymerase

	Endkonzentration	µl/Ansatz
2x Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix	1x	12,5
DMSO (100%)	2%	0,5
Primer-Forward (10µM)	200nM	0,5
Primer-Reverse (10µM)	200nM	0,5
RNAse-free H ₂ O		10
Template-DNA (10-20ng)		1
total		25µl

Tabelle 30: Cyclingprogramm für die konventionelle PCR

Die Annealingtemperatur variierte je nach Länge und Basenzusammensetzung der verwendeten Primer.

		Programm	
	DNA-Denaturierung	5min	95°C
Amplifikation <i>35 Zyklen</i>	DNA-Denaturierung	15sec	95°C
	Hybridisierung	30sec	54-56°C
	Elongation	1min/kb	72°C

Für die Verwendung des PCR-Produktes für Klonierungszwecke wurde der PCR-Ansatz alternativ in 50µl angesetzt.

3.2.2.10.2 Zielgerichtete Mutagenese

Die Generierung einer Mutation zur Einführung bzw. dem Auslöschen von Restriktionsschnittstellen erfolgte mithilfe des QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenese Kits von Agilent.

Das PCR-basierte Verfahren ermöglicht das Einbringen von bis zu fünf verschiedenen Mutationen in eine Sequenz. Pro gewünschter Mutagenese wird ein Primer verwendet, welcher eine Länge von ca. 35-50 Nukleotiden umfasst und die gewünschte Mutation mittig trägt. Ebenso zeichnen sich die Primer dadurch aus, dass der GC-Gehalt mindestens 40% umfasst und eine Schmelztemperatur (T_M) von $\geq 75^\circ\text{C}$ erreicht wird.

Die einzelnen Reagenzien und das Cyclingprogramm für die Mutagenese-PCR sind den Tabellen 31 und 32 zu entnehmen.

Tabelle 31: Ansatz für die Mutagenese-PCR

Reagenzien	Endkonzentration	µl/Ansatz für Template >5kb
Quikchange Multi Reaction Buffer, 10x	1x	2,5
Quik Solution, 25x	1x	0,2
Mutageneseprimer	Xµl (100 ng pro Primer für 1–3 primers)	1
dNTP Mix, 25x	1x	1
QuikChange Multi enzyme blend	2,5U	1
H ₂ O		ad. 25
Plasmid-DNA (100ng/µl)		1
total		25µl

Tabelle 32: Cyclingprogramm für die Mutagenese-PCR

		Programm	
	Initiale DNA-Denaturierung	1min	95°C
Amplifikation <i>30 Zyklen</i>	DNA-Denaturierung	1min	95°C
	Hybridisierung	30sec	55°C
	Elongation	2min/kb Plasmidlänge	65°C

Nach der Mutagenese wurde 1µl des Enzyms DpnI zu jedem PCR-Produkt zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Es handelt sich hierbei um eine Endonuklease, mit der besonderen Eigenschaft spezifisch methylierte DNA zu schneiden (Li et al. 1999). Dadurch kann die parenterale Template-DNA verdaut werden. Das mutierte Plasmidkonstrukt wurde anschließend mit der Hitzeschock-Methode in kompetente Bakterienzellen transformiert und gemäß der entsprechenden Resistenz auf einer LB-Platte ausgestrichen.

3.2.2.10.3 PCR-Sequenzierung nach Sanger

Um Informationen zur Basenabfolge der Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierungsmethode beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger, bei welchem ein BigDyePremix eingesetzt wird, welcher fluoreszenzfarbstoff-markierte 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) enthält.

Die ddNTPs zeichnen sich durch eine fehlende 3'Hydroxygruppe aus. Beim Einbau der ddNTPs ist eine DNA-Verlängerung durch eine DNA-Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung fehlt. Es entstehen lineare DNA-Abschnitte unterschiedlicher Längen, welche im Sequenziergerät der Größe nach aufgetrennt werden können (Buselmaier 2015).

Die Sequenzierung wurde entsprechend der Bedingungen in Tabelle 33 und 34 durchgeführt.

Tabelle 33: Protokoll für die Sequenzierung

Reagenzien	µl/Ansatz
5x ABI-Puffer	2
BigDye 3.1	0,5
Sequenzierprimer (10µM)	0,5
Plasmid-Template (150-300ng)	1
H ₂ O	ad.10
total	10µl

Tabelle 34: Cyclingprogramm für die Sanger-Sequenzierung

		Programm	
	Initiale DNA-Denaturierung	2min	96°C
Amplifikation <i>30 Zyklen</i>	DNA-Denaturierung	10sec	96°C
	Hybridisierung	5sec	55°C
	Sequenzierung	4min	60°C

3.2.2.10.4 Duplex Real-time PCR

Die Real-time-PCR erlaubt eine Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit. Die Detektion erfolgt dabei sequenzspezifisch durch die Verwendung von fluorophormarkierten TaqMan-Sonden. Die Sonde ist 5'-terminal mit einem Reporterfarbstoff und 3'-terminal mit einem Quencher gekoppelt. Während beide Fluorophore benachbart sind, wird die Reporterfluoreszenz durch den Quencher absorbiert. Bei erfolgreicher Hybridisierung trifft die verwendete DNA-Polymerase auf die TaqMan-Sonde, welche durch deren endonukleolytische Aktivität hydrolysiert wird. Dieser Prozess sorgt für eine räumliche Trennung des Reporterfarbstoffes vom Quencher, wodurch der Reporter bei Anregung fluoresziert (Mayr 2007).

Für die Durchführung der Real-time PCR wurde das folgende Protokoll in Tabelle 35 und 36 verwendet.

Tabelle 35: Protokoll für die Real-Time duplex PCR

Die Real-Time-Duplex-qPCR wurde mit zwei Primerpaaren und Sonden durchgeführt, was die Quantifizierung zweier Zielsequenzen erlaubt.

	Endkonzentration	µl/Ansatz
2x Bioline Sensifast	1x	10
Forward-Primer (10µM)	400nM	0,8
Reverse-Primer (10µM)	400nM	0,8
Probe (10µM)	200nM	0,4
catGAPDH-Forward (10µM)	200nM	0,4
catGAPDH-Reverse (10µM)	200nM	0,4
catGAPDH Probe (10µM)	100nM	0,2
RNAse-free H ₂ O		2
genomische DNA (70 -80ng/µl)		5
total		20µl

Tabelle 36: Cyclingprogramm für die Real-time duplex PCR

	Programm	
Initiale DNA-Denaturierung	5min	95°C
Amplifikation 45 Zyklen	DNA-Denaturierung	15sec 95°C
	Hybridisierung	1min 54°C
	Elongation	20sec 72°C

Die absolute Quantifizierung wurde anhand einer Kalibrierkurve durchgeführt, basierend auf einer Verdünnungsreihe von Plasmid DNA.

3.2.2.10.5 One-Step real time RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion dient dem Nachweis von RNA. Dabei wird in einem Versuchsansatz die Umschreibung der RNA in cDNA mit der spezifischen Amplifikation der cDNA kombiniert.

Um mögliche DNA-Kontaminationen nachweisen zu können, wurde zu jeder RNA-Probe ebenfalls ein Ansatz ohne Reverse-Transkriptase in der PCR mitgeführt.

Das Protokoll und das Cyclingprogramm ist in den Tabellen 37-39 dargestellt.

Tabelle 37: Protokoll für die OneStep RT-qPCR- Ansatz mit reverser Transkriptase.

Der Ansatz der reversen Transkriptase dient der Quantifizierung viraler RNA.

	Endkonzentration	µl/Ansatz
2x SensiFAST Probe No-ROX One-Step MM	1x	10
RNAse Inhibitor		0,4
Reverse Transkriptase		0,2
HERV-pFor (10µM)	400nM	0,8
HERV pVL-Rev1 (10µM)	400nM	0,8
HERV Probe (FAM) (10µM)	200nM	0,4
RNAse-free H ₂ O		2,4
virale RNA		5
total		20µl

Tabelle 38: Protokoll für die OneStep RT qPCR- Ansatz ohne Reverse Transkriptase.

Der Ansatz ohne RT dient der Detektion von DNA-Kontaminationen

	Endkonzentration	µl/Ansatz
2x SensiFAST Probe No-ROX MM	1x	10
HERV-pFor (10µM)	400nM	0,8
HERV pVL-Rev1 (10µM)	400nM	0,8
HERV Probe (FAM) (10µM)	200nM	0,4
RNAse-free H ₂ O		3
virale RNA		5
total		20µl

Tabelle 39: Cyclingprogramm für die OneStep-RT qPCR

		Programm	
	Reverse Transkription	15min	42°C
	Inaktivierung der RT	30sec	95°C
Amplifikation <i>45 Zyklen</i>	DNA-Denaturierung	30sec	95°C
	Hybridisierung	1min	54°C
	Elongation	20sec	72°C

Die absolute Quantifizierung wurde anhand einer Kalibrierkurve durchgeführt, basierend auf einer Verdünnungsreihe von Plasmid DNA.

3.2.2.10.6 qPCR-based product-enhanced reverse transcriptase (PERT) - Assay

Ein gemeinsamer Bestandteil aller Retroviren ist die Reverse Transkriptase (RT). Um die Aktivität dieses Enzyms quantifizieren zu können, wurde das PERT-Assay angewandt.

In dem Assay wird ein bekanntes, exogenes RNA-Template verwendet, welches zu den lysierten Virusproben hinzugegeben wird. Die Anwesenheit der viralen Reversen Transkriptase sorgt dafür, dass das RNA-Template in cDNA konvertiert wird. Dabei ist die Menge an cDNA direkt proportional zu der Aktivität der RT und lässt sich deshalb über eine quantitative PCR (qPCR) bestimmen.

Zur Durchführung wurde zunächst ein Mastermix für die qPCR angesetzt. Hierfür wurden die in Tabelle 40 aufgelisteten Reagenzien genutzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz anschließend im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 40: Zusammensetzung des Mastermix für den PERT-Assay.
Die Endkonzentration bezieht sich auf ein Volumen von 20µl.

Komponenten	Endkonzentration	µl/Ansatz
2x SensiFAST Probe No-ROX Mix	1x	8
Rnase Out 1:10	0,02U/µl	0,1
Horie2010_PERT-F (10µM)	500nM	1
Horie2010_PERT-R (10µM)	500nM	1
MS2-PERT_Horie-Probe (FAM) 10µM	250nM	0,5
MS2 RNA Template (0,8µg/µl)	4ng	0,1
RNase-free H ₂ O		0,3

Anschließend wurden die Virusproben bzw. die Standardreihe vorbereitet. Für die Generierung der Standardreihe wurde der HIV-1 rRT Standard Lenti aus dem Cavid Kit verwendet. Dieser ermöglicht die absolute Quantifizierung basierend auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten. Abweichend zu den Herstellerangaben wurden die 12 Verdünnungsstufen mit DMEMc angesetzt.

Um die Viruspartikel zu lysieren, wurde im nächsten Schritt eine Lyse-reagenz angesetzt. Hierfür wurde RNaseOut im Verhältnis 1:50 in 2xLysis-Puffer verdünnt. Mit einer Mehrwegpipette wurde jeweils 5µl der Lyse-reagenz in jedes Well einer 96-well Platte vorgelegt. Anschließend wurde dieselbe Menge an vorbereiteter Virusprobe bzw. Standard zugegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Lyse abzustoppen, wurde nach Ende der Inkubationszeit 90µl Wasser in jedes Well der Platte zugegeben.

Anschließend wurden je 11µl/well des Mastermix in eine vorgekühlte 96-well PCR-Platte überführt. Danach wurden 9µl der lysierten Proben zugegeben, um ein Endvolumen von 20µl zu erreichen. Die PCR-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und im CFX96 Real-Time Cycler gemessen.

Der PERT wurde gemäß dem in Tabelle 41 aufgelisteten Cyclingverfahren durchgeführt.

Tabelle 41: Cyclingprogramm für den PERT-Assay

		Programm	
	RT-Reaktion	20min	42°C
	Polymeraseaktivierung	10min	95°C
Amplifikation <i>45 Zyklen</i>	DNA-Denaturierung	30sec	95°C
	Hybridisierung	30sec	60°C
	Elongation	15sec	72°C

3.2.3 Serologische Verfahren

3.2.3.1 Antigen-capture ELISA zum Nachweis von p27

Der Nachweis von HERV-K(HML-2) erfolgte mittels eines Antigen-capture -ELISAs, welcher das Capsid-Protein p27 detektiert. Der ELISA ist ein serologisches Verfahren, welches sich Antigen-Antikörper Reaktionen zunutze macht. Im Falle des Antigen-Capture ELISAs wird das entsprechende Antigen zwischen zwei Antikörpern festgehalten (Stöcker und Schlumberger 2019).

Für die Durchführung wurde zunächst eine 96-well Mikrotiterplatte mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Hierfür wurde der p27-spezifische Antikörper *Human endogenous retrovirus monoclonal antibody* (HERMA7) verwendet, welcher im Verhältnis 1:50 in Carbonat-Bicarbonat Puffer verdünnt wurde. Hiervon wurde 50µl in jedes Well der Platte überführt. Die Platte wurde anschließend mit einer Folie versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die vorbeschichtete Platte wurde am darauffolgenden Tag 3x mit Waschlösung (0,05% Tween in PBS (P/T) gewaschen und mit 2% Milchpulver in PBS (P/M) für 1h bei 37°C blockiert. Dieser Schritt verhindert eine unspezifische Bindung von Antikörpern auf der Plattenoberfläche.

Anschließend wurden die Virusüberstände für 5min mit 0,2% Tween inaktiviert. Das Reagenz spaltet die Hüllproteine des Virus und führt so zur Inaktivierung. Zur Quantifizierung wurde als Standard das rekombinante p27-Protein genutzt, welches 1:1000 in PBS verdünnt wurde. Die Virusüberstände, sowie der Standard wurden auf der Platte anschließend im Verhältnis 1:3 in P/M/T (PBS mit 2% Milchpulver und 0,05% Tween) titriert.

Anschließend wurde die Platte erneut für eine 1h bei 37°C inkubiert und dreimal mit der Waschlösung gewaschen. Von dem vorverdünnten Primärantikörper VD K140 p5B AK (1:400 in P/M/T) wurde 50µl in jedes Well pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift (0,05% Tween in PBS), um die ungebundenen Anteile zu entfernen.

Danach wurde 50µl/well des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers A5045 (1:2500 in P/M/T vorverdünnt) aufgetragen und die Platte erneut für 1h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte erneut ein Waschschrift (0,05% Tween in PBS).

Anschließend wurde 100µl/well (Tetramethylbenzidin) TMB hinzugegeben. Die Reaktion wurde inkubiert bis eine intensive Blaufärbung zu erkennen war. Durch die Zugabe von 25µl/well 5%-iger H₂SO₄-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt. Die Extinktionswerte wurden im ELISA-Lesegerät bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 620nm gemessen

4 Ergebnisse

4.1 Austausch von EGFP gegen Luciferase im HERV-K_{con} CCGBX

Um die Sensitivität für Infektionsexperimente mit HERV-K(HML-2)-basierten Reporterviren zu verstärken, wurde das Reportersignal EGFP in der *env*-Region von HERV-K_{con}GFP gegen das Luciferase-Gen ausgetauscht.

Das Klonierungsvorhaben konnte im Ursprungsvektor HERV-K_{con}GFP nicht durchgeführt werden, da geeignete Restriktionsschnittstellen 5'- und 3'-gelegen von der EGFP-Sequenz laut Sequenzierung nicht vorhanden waren. Für die Durchführung einer Mutagenese-PCR zur Generierung von Restriktionsschnittstellen war der Vektor ebenfalls ungeeignet, da das Vektorkonstrukt zwei lange terminale Wiederholungen (LTRs) enthält. Dies hat nach früheren Erfahrungen in der Arbeitsgruppe vermutlich homologe Rekombinationsereignisse zur Folge, wenn man die DNA-Sequenz in kompetente Bakterienstämme transformieren würde (Yamada et al. 1995). Die Region zwischen den LTRs wird deletiert, wodurch Klone generiert werden, welche nicht mehr der Länge des ursprünglichen Plasmids entsprechen (Mager und Goodchild 1989). Um diesem Problem zu entgehen, wurde für das Klonierungsvorhaben eine Subklonierung durchgeführt, welche in Abbildung 6 schematisch dargestellt ist.

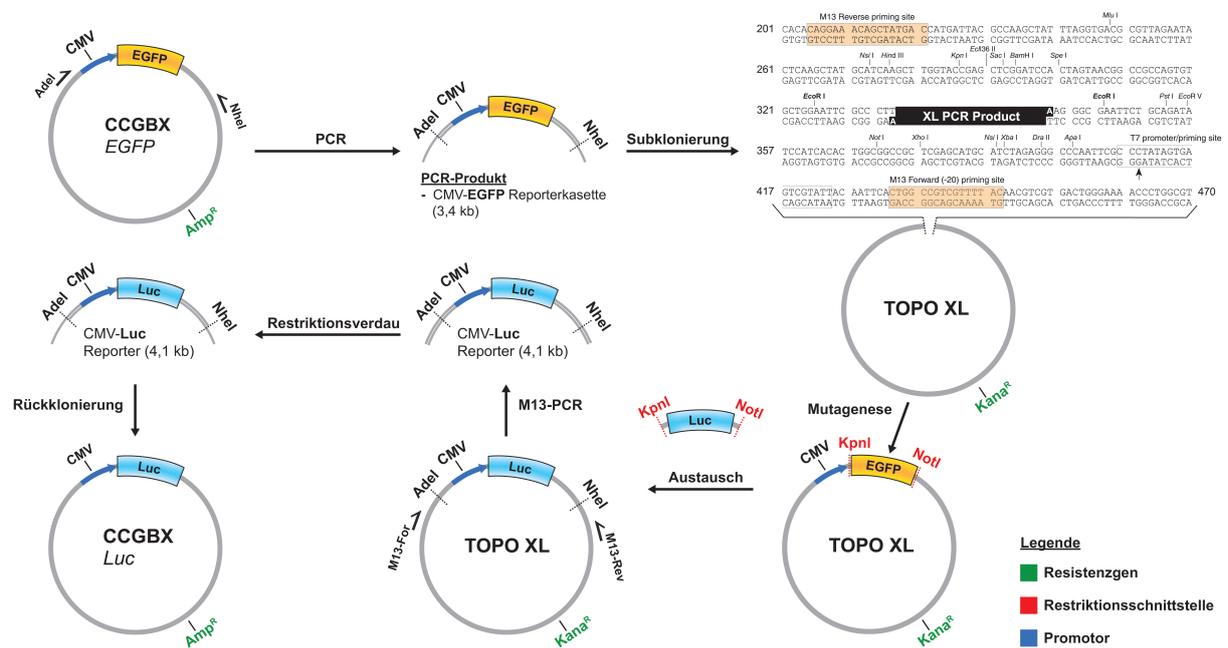


Abbildung 6: Austausch von EGFP gegen Luciferase in HERV-K_{con} CCGBX.

Schematische Darstellung der Subklonierungsstrategie, welche die Klonierung des Luciferase-Reportergens ermöglicht. Der Austausch von EGFP gegen die Luciferase, wurde über die Restriktionsschnittstellen KpnI und NotI vorgenommen (Quelle: Eigene Darstellung).

Für die Umklonierung wurde die CMV-EGFP-Reporterkassette im ersten Schritt mittels einer PCR-Reaktion vervielfältigt und anschließend in den TOPO-XL Vektor subkloniert.

Dieses Verfahren verhindert das Auftreten von Rekombinationsergebnissen, da nur noch eine LTR vorhanden ist. So können mittels Mutagenese-PCR geeignete Restriktionsschnittstellen für KpnI und NotI generiert werden, welche den Austausch von EGFP gegen das Luciferase-Gen (im Subklonierungsvektor TOPO-XL) ermöglichen.

Die gesamte CMV-Luciferase-Reporterkassette wurde anschließend wieder in das Konstrukt HERV-K_{con} CCGBX rückkloniert, welches nun das Luciferase-Gen in der *env*-Region enthält.

4.1.1 PCR-Amplifikation der CMV-EGFP-Reporterkassette und Subklonierung in den pCR4-TOPO XL Vektor

Für die Amplifikation der EGFP-Reporterkassette wurde die Primerkombination Adel-For und NheI-Rev verwendet. Das PCR-Amplifikat umfasst nur eine LTR und beinhaltet neben dem auszutauschenden Reporter-gen (EGFP) auch die Restriktionsschnittstellen für Adel und NheI, welche nach einer erfolgreichen Ligation des Luciferase-Gens eine Rückklonierung in das Vektorkonstrukt HERV-K_{con} CCGBX erlauben.

Das generierte PCR-Produkt wurde mit einer Gelelektrophorese auf die richtige Länge (3,4kb) überprüft und anschließend in einen geeigneten Vektor subkloniert. Für dieses Vorhaben wurde der TOPO-XL Vektor verwendet, da dieser insbesondere für die Insertion großer PCR-Produkte (3-10kb) geeignet ist.

Die Ligation des PCR-Produkts findet entsprechend Abbildung 6 zwischen den M13 Priming sites statt, weshalb die Insertion des PCR-Produktes unter Verwendung der im Kit bereitgestellten M13-Primer untersucht wurde. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse nach der M13-PCR dargestellt.

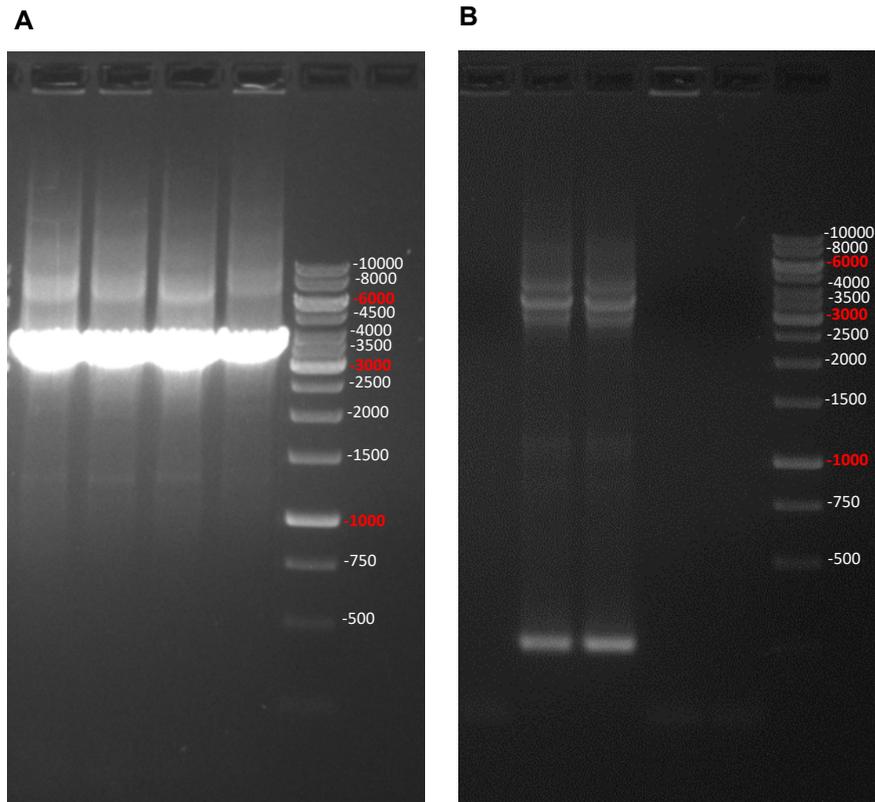


Abbildung 7: Kontroll-PCR nach Subklonierung der Reporter-kassette.

Abbildung A: Positivbeispiel für eine erfolgreiche Subklonierung. Durch die M13-PCR wird ein Amplifikat generiert, welches der Größe des subklonierten DNA-Fragmentes entspricht (3,4kb).

Abbildung B: Negativbeispiel für die Subklonierung. Das inserierte PCR-Produkt kann nicht nachgewiesen werden.

Marker: GeneRuler 1kb Ladder

Anschließend wurden mittels einer Mutagenese-PCR geeignete Restriktionsschnittstellen für KpnI und NotI generiert, welche den Austausch von EGFP gegen die Luciferase ermöglichen.

4.1.2 Mutagenese-PCR zur Generierung von Restriktionsschnittstellen für KpnI und NotI

Um EGFP gegen das Luciferase-Gen auszutauschen, wurde die KpnI-Schnittstelle zwischen dem CMV und EGFP generiert, sowie die NotI-Schnittstelle nach dem EGFP-Gen. Hierfür wurde das QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent verwendet. In Abbildung 8 ist das Ergebnis nach der Durchführung der Mutagenese-PCR dargestellt.

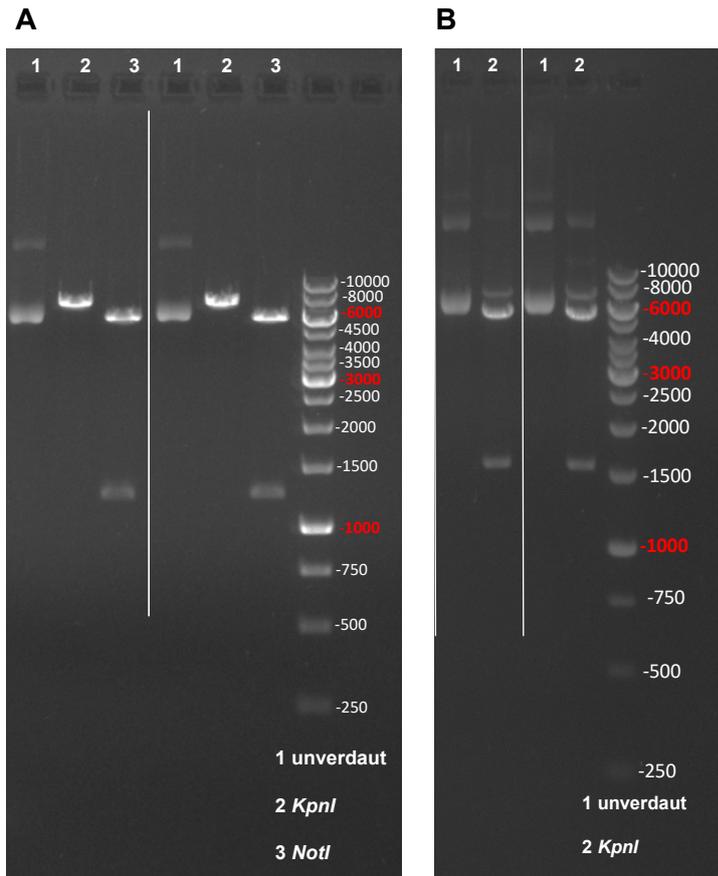


Abbildung 8: Restriktionsverdau des TOPO-XL Vektors nach der Mutagenese.

1.) unverdautes Plasmid 2.) Restriktionsverdau mit *KpnI* 3.) Restriktionsverdau mit *NotI*

Abbildung A: Kontrollverdau nach erfolgreicher Mutagenese zur Generierung der *NotI*-Restriktionsschnittstelle (Spur 3). **Abbildung B:** Kontrollverdau nach erfolgreicher Mutagenese zur Generierung der *KpnI*-Restriktionsschnittstelle (Spur 2).

Marker: *GeneRuler 1kb DNA Ladder*

Die Restriktionsschnittstellen für *KpnI* und *NotI* konnten im Rahmen von zwei aufeinanderfolgenden Mutagenese-Reaktionen generiert werden. Im Rahmen der ersten Mutagenese-PCR wurde die *NotI*-Schnittstelle nach dem EGFP-Gen erzeugt (Abbildung 8A, Spur 3). Die Positivklone wurden verwendet, um im Rahmen einer zweiten Mutagenese-PCR auch die *KpnI*-Restriktionsschnittstelle zwischen dem CMV-Promotor und dem Reportergen zu generieren (Abbildung 8B, Spur 2).

Bei erfolgreicher Mutagenese wurden zwei DNA-Banden detektiert. Dies liegt daran, dass die Restriktionsschnittstellen für *KpnI* und *NotI* im TOPOXL-Vektor schon an anderen Positionen vorhanden waren. Diese Restriktionsschnittstellen wurden mit Hilfe einer erneuten Mutagenese-PCR ausgelöscht, um anschließend den Austausch gegen die Luciferase durchzuführen.

4.1.3 Austausch von EGFP gegen Luciferase im TOPO-XL Vektor

Durch die Restriktionsschnittstellen für KpnI und NotI konnte die CMV-EGFP Kasette gegen die neu generierte CMV-Luciferase Kasette ausgetauscht werden. Hierfür wurde der TOPO-XL Vektor im Doppelverdau mit KpnI und NotI geschnitten und das Luciferase-Gen mithilfe der QuickLigase hineinkloniert. Die Sequenz für das Luciferase-Gen entstammt dem Vektorkonstrukt CMVoriLuc. Die Gensequenz wurde mithilfe einer PCR durch geeignete Primer vervielfältigt und anschließend mit denselben Enzymen (*KpnI/NotI*) verdaut. Nach dem Austausch von EGFP gegen die Luciferase wurde ein Doppelverdau mit KpnI und NotI durchgeführt, um das klonierte Reporter-gen auf die richtige Größe zu überprüfen. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.

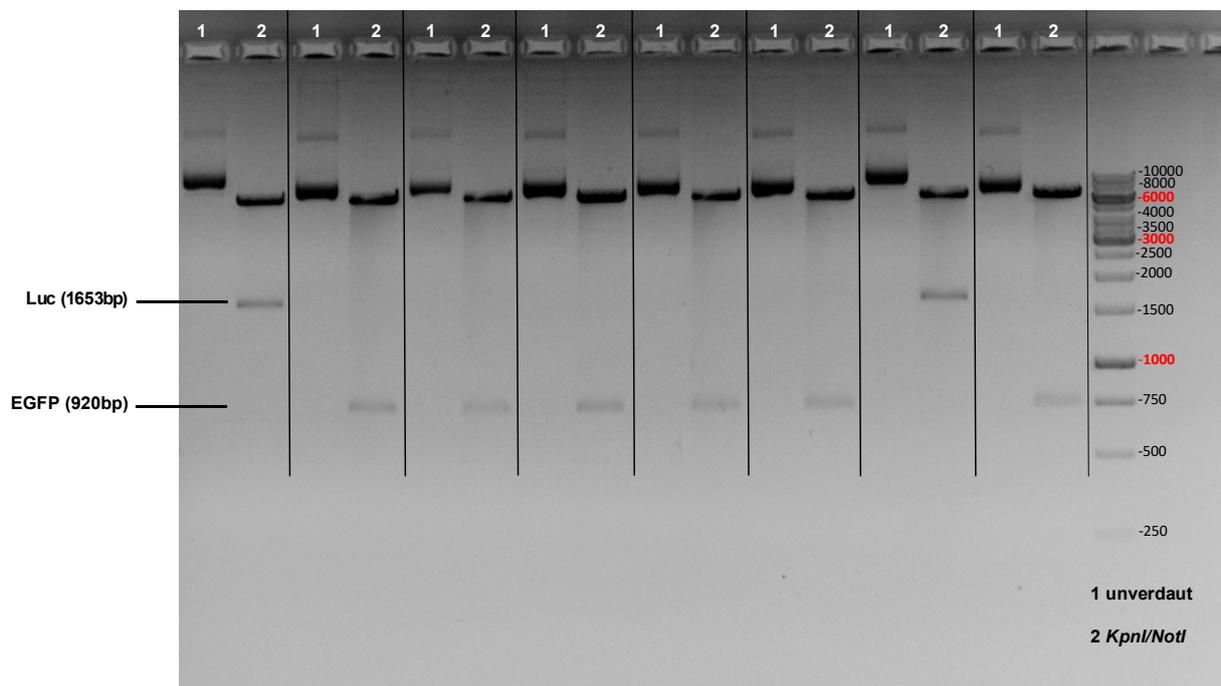


Abbildung 9: Kontrollverdau des TOPO-XL Vektors nach dem Austausch des EGFP-Reportergens gegen die Luciferase.

1.) unverdautes Plasmid; 2.) Restriktionsverdau mit KpnI und NotI, um die Größe des Reportergens zu ermitteln. Erwartete DNA-Bande bei Klonierung des Luciferase-Reportergens: 1653bp. Erwartete DNA-Bande bei EGFP-Reportergen: 920bp. Klon 1 und 7 sind positiv für die Insertion des Luciferase-Gens (siehe Pfeil). Die restlichen Klone tragen das EGFP Reporter-gen.

Marker: GeneRuler 1kb DNA Ladder

Die Positivklone (Ansatz 1 und 7) wurden anschließend für die Rückklonierung der CMV-Luciferase-Reporterkasette in HERV-K_{con} verwendet. Da die Restriktionsschnittstelle für *Adel* im TOPO-XL Vektor bereits an anderer Position vorhanden war, wurde die CMV-Luciferase Reporterkasette zunächst über eine M13-PCR amplifiziert und anschließend über den Verdau mit *Adel* und *NheI* in HERV-K_{con} rückkloniert. Das Endergebnis ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

4.1.4 Rückklonierung der Luc-Reporterkassette in *HERV-K_{con}* über *Adel/NheI*

Die CMV-Luc-Reporterkassette wurde über *Adel* und *NheI* in *HERV-K_{con}* CCGBX rückkloniert. Der Kontrollverdau von *HERV-K_{con}Luc* ist in der folgenden Abbildung 10 dargestellt. Zum Vergleich wurde der Verdau mit *HERV-K_{con}* EGFP ebenfalls auf das Gel aufgetragen.



Abbildung 10: Kontrollverdau nach Rückklonierung der CMV-Reporterkassette in *HERV-K_{con}*.

1.) unverdautes Plasmid; 2.) Restriktionsverdau mit *Adel* und *NheI*, um die Länge der CMV-Reporterkassette zu bestimmen; 3.) Restriktionsverdau mit *KpnI* und *NotI*, um die Länge des Reportergens zu erfassen.

Erwartete DNA Bande für die CMV-Luciferase-Reporterkassette: 4172bp/ CMV-EGFP-Reporterkassette: 3439bp. Länge des Luciferase-Reportergens: 1653bp/ EGFP-Reportergens: 920bp.

Marker: *GeneRuler 1kb DNA Ladder*

Um genauere Informationen zur Basenabfolge des generierten Konstruktes zu erhalten, wurde anschließend eine Sequenzierung durchgeführt.

4.2 Funktionalität von HERV-K_{con} Luciferase *in-vitro*

Das in HERV-K_{con} klonierte Luciferase-Reportergen wird unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Um nach der Klonierung die Promotoraktivität, sowie die Funktionalität des Reportergens zu überprüfen, wurde HERV-K_{con}Luc als serielle Verdünnungsreihe (100ng-12,5ng) in HEK293T transfiziert.

Zur Validierung der Ergebnisse wurde als Positivkontrolle das Plasmidkonstrukt CMVoriLuc eingesetzt, welches das Luciferase-Gen unter Kontrolle des E1 α -Promotors exprimiert. Der Leervektor pcDNA4 diente als Negativkontrolle. Beide Konstrukte wurden mit einer Einsatzkonzentration von 100ng transfiziert.

Nach der Transfektion wurde die Luciferase-Reporteraktivität nach 24h und 48h im Luminometer gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 für beide Zeitpunkte dargestellt.

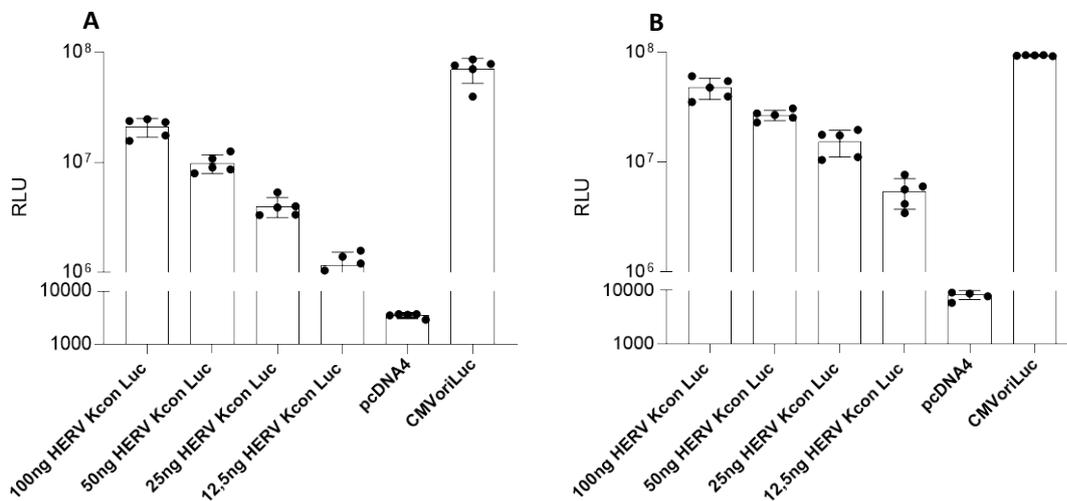


Abbildung 11: Bestimmung der Luciferase-Aktivität nach 24h (Abbildung A) und 48h (Abbildung B).

Jeweils 24h und 48h nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität ermittelt. Das höchste Signal wurde bei der Positivkontrolle CMVoriLuc gemessen. Bei Transfektion von HERV-K_{con} Luciferase ist sowohl nach 24h, als auch nach 48h ein konzentrationsabhängiger Effekt zu beobachten. Alle Werte entsprechen dem Mittelwert aus fünf Einzelmessungen.

Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass das Luciferase-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors *in-vitro* exprimiert wird. Erwartungsgemäß korreliert die Menge an transfiziertem HERV-K_{con} mit dem Luciferase-Reportersignal, was bedeutet, dass eine höhere Konzentration an transfiziertem HERV-K_{con}Luc in einem Anstieg des Reportersignals resultiert. Dieser Effekt ist sowohl zum Messzeitpunkt nach 24h, als auch nach 48h erkennbar.

Das niedrigste Signal wurde erwartungsgemäß zu beiden Messzeitpunkten bei der Negativkontrolle gemessen. Unter Kontrolle des E1 α -Promotors konnte bei der Positivkontrolle das höchste Reportersignal bestimmt werden.

4.3 Vergleich der Partikelproduktion mit dem EGFP- und Luciferase-Reportersystem

Aufgrund der Länge des Luciferase-Gens, wurde die Sequenz von HERV-K_{con} bei der Klonierung artifiziell vergrößert. Bekannterweise können solche Veränderungen zu instabilen Viruspartikeln und einer signifikanten Reduktion des Virustiters führen. Dies liegt daran, dass es verschiedene Limitierungen, wie die Capsidgröße, die RNA-Stabilität oder die Genauigkeit der Polymerase gibt. Diese Faktoren schränken die Menge der genetischen Information und damit die Größe der Gene ein, die in einen Viruspartikel verpackt werden können (Kräusslich 2007; Takara Bio).

Von besonderem Interesse war deshalb, ob die Größe des Luciferase-Gens negative Auswirkungen auf die Partikelproduktion hat. Um dies zu quantifizieren, wurde die Virusproduktion mit dem Ursprungsplasmid HERV-K_{con}EGFP verglichen.

Für die Virusproduktion wurden HEK293T Zellen in einem 6-well Format ausgesät und für die Virusproduktion mit je 2µg DNA/well transfiziert (siehe Tabelle 25). Um die Virusproduktion zu quantifizieren, wurden die Anzahl der Viruskopien, die RT-Aktivität (PERT) und der p27-Gehalt (ELISA) gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 12 für beide Reportersysteme vergleichend gegenübergestellt.

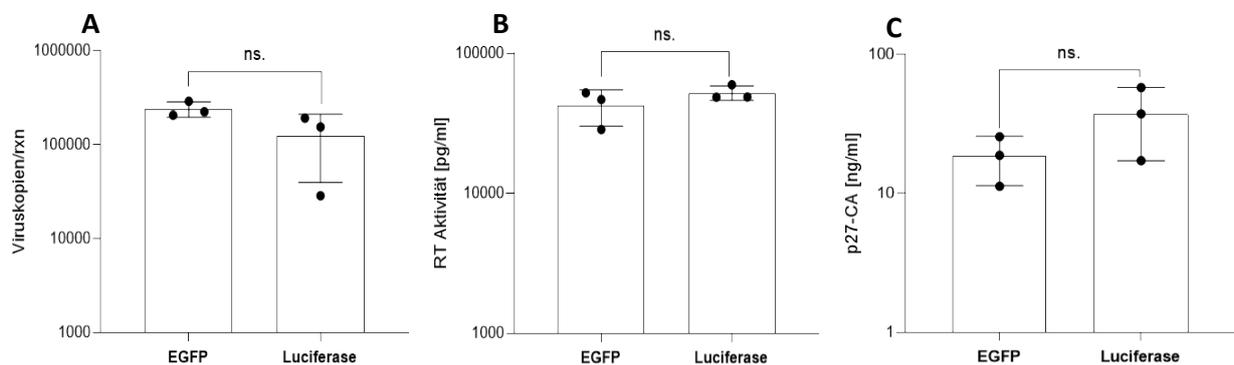


Abbildung 12: Vergleich der Virusproduktion mit dem Luciferase- bzw. EGFP-Reportergen.

Logarithmische Darstellung der Messergebnisse mit der qRT-PCR (A), dem PERT-Assay (B) und p27-ELISA (C). Die einzelnen Mittelwerte gehen aus der Messung von drei Einzelwerten hervor.

Signifikanztest: ungepaarter t-test bzw. Mann-Whitney-U Test; ns.: nicht signifikant

Anhand der Ergebnisse in Abbildung 12 geht für alle drei Quantifizierungssysteme eine vergleichbare Virusproduktion hervor.

Entsprechend der Quantifizierung mit der qRT-PCR, dem PERT-Assay und dem p27-ELISA konnte gezeigt werden, dass mit dem Luciferase-Gen eine vergleichbare Partikelproduktion erreicht wird. In Anbetracht der Standardabweichung und auf der Grundlage eines t-tests kann im Vergleich zu der Partikelproduktion mit EGFP kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

4.4 Infektionsexperiment zur Quantifizierung von Infektions- und Integrationsereignissen

Es ist bekannt, dass HERV-K_{con} basierte Reporterviren eine schwache Infektion und Integration bestimmter Zelllinien ermöglichen (Lee und Bieniasz 2007; Brady et al. 2009). Diese Prozesse sollten mit dem Reportersystem für EGFP und Luciferase nachgewiesen und untersucht werden.

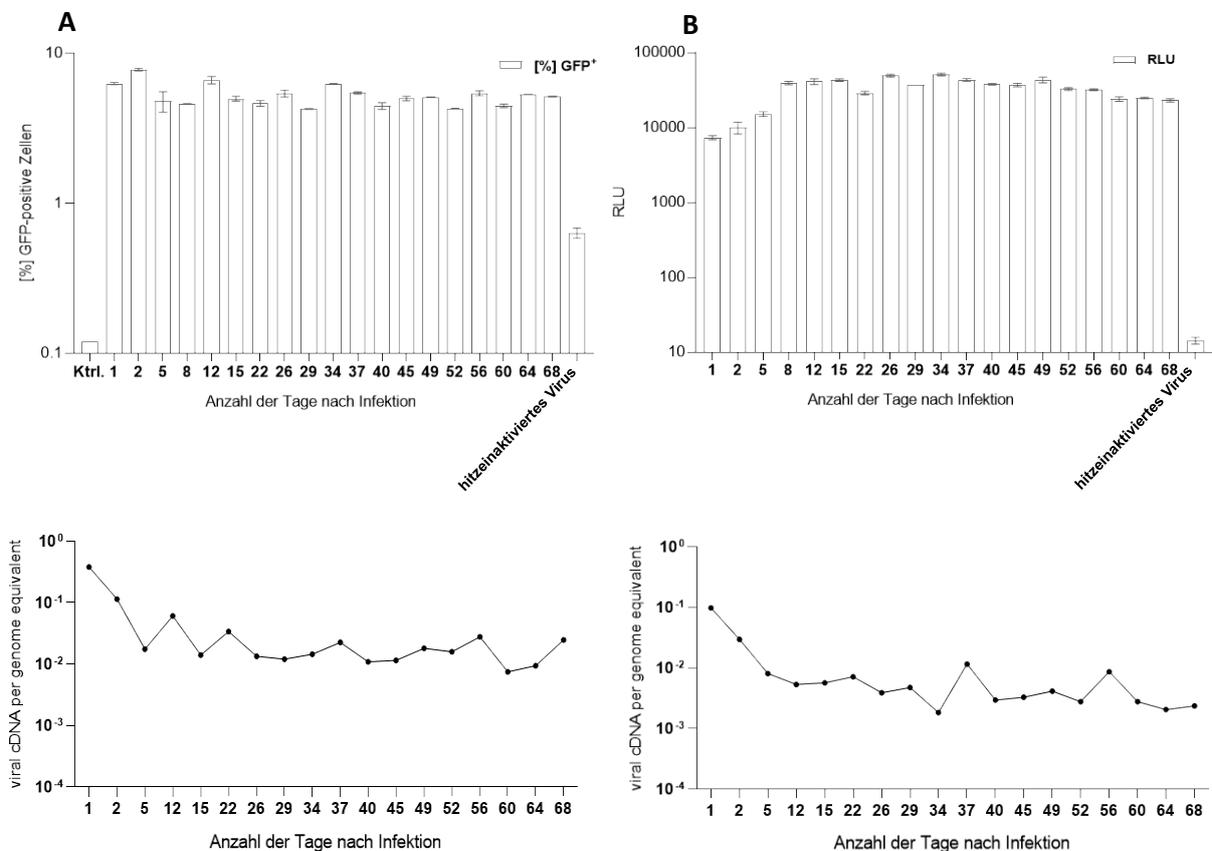
Für das Infektionsexperiment wurden zwei humane und eine nicht-humane Zelllinie mit HERV-K_{con}Luc- und HERV-K_{con} EGFP-basierten Reporterviren infiziert. Die Reporteraktivität wurde jeweils nach 24h bzw. 48h quantifiziert. Hierzu wurden die infizierten Zellen aus dem Kultivierungsformat gewonnen und die Zellzahl/ml bestimmt. Jeweils 650.000 Zellen wurden für die FACS-Messung bzw. den Luciferase-Assay verwendet. Für den Luciferase-Assay wurde das Zellpellet in 200µl 1xReporter Lysis Buffer aufgenommen. Um die Reporteraktivität auch für nachfolgende Zeitpunkte bestimmen zu können, wurde ein Teil der Zellen 48h nach Infektion subkultiviert. Nach diesem Prinzip konnten jede 3-5 Tage Messergebnisse gewonnen werden. Zu jedem Messzeitpunkt wurde eine definierte Zellzahl für die Messung genutzt und ein weiterer Anteil der Zellen subkultiviert.

Die restlichen Zellen wurden zu jedem Messzeitpunkt pelletiert und bei -20°C eingefroren. Aus diesen Zellen wurde die genomische DNA isoliert, um mithilfe einer qPCR die Menge viraler DNA nachzuweisen.

Im folgenden Abschnitt ist die Reporteraktivität zu jedem Messzeitpunkt für beide Systeme dargestellt.

Neben dem Reportersignal wurde für jeden Messzeitpunkt die virale DNA pro zellulärem Genom quantifiziert. Hierzu wurde die DNA nach der Isolation normalisiert und als Template in der Real-Time PCR eingesetzt. Der verwendeten Primer und die Sonden dienten der Detektion des jeweiligen Reportergens. Anhand einer Standardkurve basierend auf einer seriellen Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA, konnte die Menge viraler DNA pro zellulärem Genom in einer definierten Menge genomischer DNA (400ng) ermittelt werden.

4.4.1 Vergleich der beiden Reportersysteme anhand von humanen Zelllinie HEK293T



Aus dem Vergleich der Reportersysteme (Abbildung 13A bzw. 13B, obere Reihe) ist ersichtlich, dass die maximale Reporteraktivität nach unterschiedlichen Messzeitpunkten erreicht wird. Das maximale Signal an GFP-positiven Zellen wird bereits nach 48h gemessen (7,78%), während das Luciferase-Reportersignal erst 8 Tage nach Infektion dessen maximalen Wert erreicht (39351RLU). Für beide Reportersysteme kann jedoch im Laufe der Messreihe ein stabiles Reportersignal bestimmt werden. Es können durchschnittlich 5,1% GFP-positiv Zellen und eine RLU von 41184 gemessen werden. Während das Signal für die GFP-positiven Zellen bis Messende stabil bleibt, so fällt das Luciferase-Reportersignal ab Tag 49 kontinuierlich ab. Zum Messzeitpunkt an Tag 68 werden nur noch 23161RLU gemessen, was einem Abfall des durchschnittlichen Reportersignals um 44% entspricht.

Bei der Quantifizierung viraler DNA pro zellulärem Genom konnte für beide Reportersysteme ein ähnlicher Verlauf beobachtet werden (Abbildung 13A bzw. 13B, untere Reihe). Entsprechend Abbildung 13 wird der höchste Wert am ersten Tag nach Infektion bestimmt und stabilisiert sich für GFP ab Tag 15 auf einen Wert von 0,0169 Kopien virale cDNA pro zellulärem Genom. Beim Luciferase-Reportersignal beträgt der durchschnittliche Wert 0,0054. Auf DNA-Ebene kann für die Luciferase-Viren ebenfalls bestätigt werden, dass die Menge viraler DNA zum Messzeitpunkt nach 60 Tagen deutlich abfällt. An Messtag 68 werden durchschnittlich nur noch 0,0023 Kopien virale DNA pro zellulärem Genom gemessen. Dies entspricht einem Abfall des Signals um 58%.

4.4.2 Vergleich der beiden Reportersysteme anhand von humanen Zelllinie HeLa

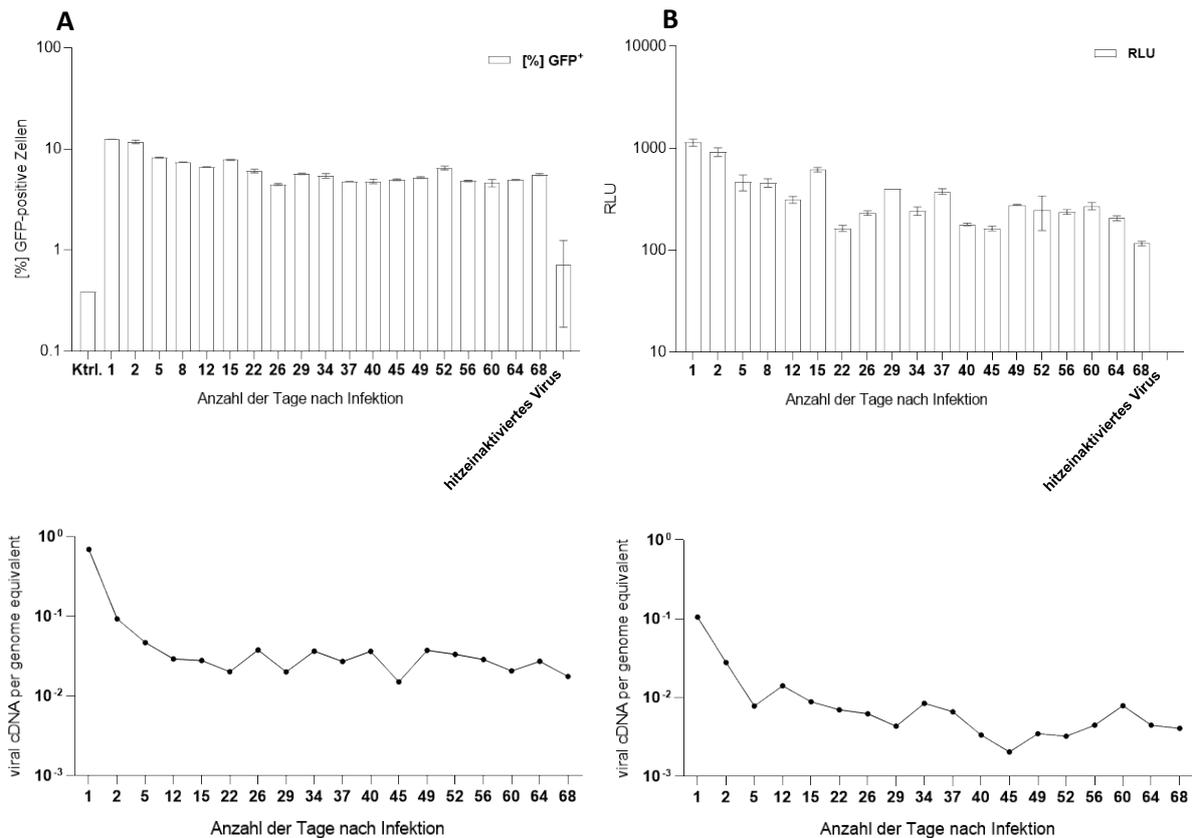


Abbildung 14: HeLa - Vergleich der Reporteraktivität und Quantifizierung der viralen cDNA per genome equivalent.

Abbildung A - GFP Reportersystem: Die Reporteraktivität wurde für jeden Messzeitpunkt aus zwei Einzelmessungen bestimmt. **Abbildung B- Luciferase Reportersystem:** Der dargestellte Messwert entspricht dem Mittelwert aus sieben Einzelmessungen.

Für die Quantifizierung der viralen DNA per genome equivalent wurde die Probe in der qPCR jeweils als Duplikat getestet.

Für beide Systeme (Abbildung 14A bzw. 14B, obere Reihe) wird die maximale Reporteraktivität am ersten Tag nach Infektion bestimmt. Es werden durchschnittlich 12,5% GFP-positive Zellen bzw. eine RLU von 1141 gemessen. Dieser Wert bleibt nicht stabil, sondern fällt im Laufe der Messreihe ab. Nach Messtag 8 pendelt sich die Menge an GFP-positiven Zellen auf durchschnittlich 5,6% ein. Im Vergleich zum maximalen Reportersignal nach Infektion, entspricht dies einer Reduktion des Signals um rund 55%. Bei dem Luciferase-Reportersystem pendelt sich das Signal von Messtag 5-15 auf 465 RLU ein und fällt anschließend nochmals bis Ende der Versuchsreihe auf durchschnittlich 241 RLU ab.

Bei Quantifizierung der viralen DNA pro zellulärem Genom (Abbildung 14A bzw. 14B, untere Reihe) wird der maximale Wert für beide Reportersysteme ebenfalls an dem ersten Tag nach Infektion bestimmt. Für EGFP werden 0,69 Kopien virale DNA pro zellulärem Genom gemessen. Dieser Wert sinkt auf einen durchschnittlichen Wert von 0,027, welcher bis zum

Ende der Messreihe stabil bleibt. Für die Luciferase wird ein maximaler Wert von 0,106 Kopien cDNA pro zellulärem Genom bestimmt. Dieser Wert sinkt bis einschließlich Tag 12 auf 0,014. Von Tag 15 -37 werden durchschnittliche Werte von 0,0069 bestimmt. Anschließend sinkt der Wert nochmals und erreicht von Tag 40-68 Werte von 0,0041.

4.4.3 Vergleich der beiden Reportersysteme anhand der nicht-humanen Zelllinie CrfK

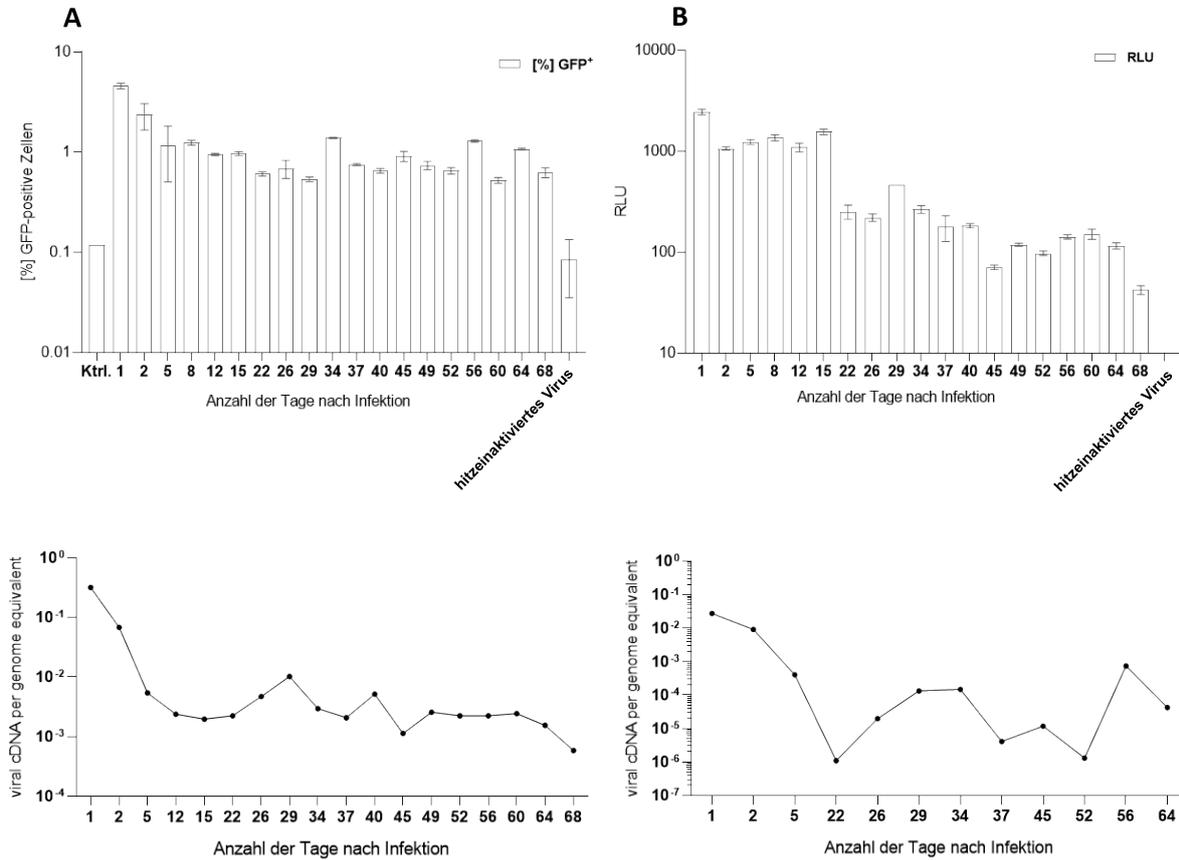


Abbildung 15: CrfK - Vergleich der Reporteraktivität und Quantifizierung der viralen cDNA per genome equivalent.

Abbildung A - GFP Reportersystem: Die Reporteraktivität wurde für jeden Messzeitpunkt aus zwei Einzelmessungen bestimmt. **Abbildung B- Luciferase Reportersystem:** Der dargestellte Messwert entspricht dem Mittelwert aus acht Einzelmessungen.

Für die Quantifizierung der viralen DNA per genome equivalent wurde die Probe in der qPCR jeweils als Duplikat getestet. Für das Luciferase-Reportersystem wurden mehrere Messzeitpunkte aus der Graphik ausgeschlossen, aufgrund von Plasmid-Kontaminationen.

Der Höchstwert wird für beide Reportersysteme (Abbildung 15A bzw. 15B, obere Reihe) am ersten Tag nach Infektion gemessen. Es werden 4,6% GFP-positive Zellen und eine RLU von 2464 bestimmt. Das EGFP-Signal fällt innerhalb der darauffolgenden Messzeitpunkte stetig ab. Von Messtag 12-68 können in der FACS-Messung allerdings stabile Signale mit durchschnittlich 0,82% GFP-infizierten Zellen gemessen werden. Das Luciferase-Reportersignal halbiert sich nach Infektion innerhalb der darauffolgenden Messzeitpunkte (Tag 2-15) auf durchschnittlich 1566RLU. Nach Messtag 15 fällt das Reportersignal nochmals ab und erreicht nur noch durchschnittliche Werte von 157RLU.

Der höchste Wert viraler cDNA pro zellulärem Genom (Abbildung 15A bzw. 15B, untere Reihe) wird am ersten Tag nach Infektion gemessen und beträgt für EGFP 0,317. Dieser Wert fällt in den darauffolgenden Messzeitpunkten ab und erreicht ab Messtag 8 stabile Werte von durchschnittlich 0,0029. Für das Luciferase-Reportersystem können am Tag nach der Infektion 0,027 Kopien virale cDNA pro zellulärem Genom nachgewiesen werden. Im Vergleich zu EGFP kann über die Zeit allerdings keine stabile Menge viraler cDNA pro zellulärem Genom nachgewiesen werden. Die Messwerte schwanken hierbei in einem Bereich von 0,000001-0,009 Kopien virale cDNA pro zellulärem Genom.

4.5 Differenzierung zwischen viraler cDNA und Plasmid-DNA/ ankommenden Viruspartikeln durch den Einsatz von Stavudin

Aus dem vorangegangenen Infektionsexperiment (Abbildung 13-15) ist ersichtlich, dass anfänglich hohe Reportersignale für das Luciferasesystem und EGFP gemessen werden. Die Signale bleiben allerdings nicht stabil, sondern fallen im Laufe der Messreihe ab, was darauf hindeuten könnte, dass es sich um ankommende Viruspartikel handelt, welche die in der Produzentenzelle hergestellten Proteine für EGFP und Luciferase mitbringen oder um Plasmid-DNA, welche aus dem Transfektionsexperiment in die Infektion getragen wurde. Um dies zu verifizieren, wurde Stavudin eingesetzt, ein Arzneistoff aus der Gruppe der nukleosidischen RT-Inhibitoren, welcher die Integration viraler cDNA hemmt (Moyle und Gazzard 1997). Der Arzneistoff Stavudin wurde bereits in vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe genutzt und spricht gut auf die humanen Zelllinien HeLa und HEK293T an. Bei einer Einsatzkonzentration von 50mM sind keine cytotoxischen Effekte zu erwarten. Erwartungsgemäß kommt es durch Stavudin zur Reduktion des Reportersignals, sofern dieses durch virale cDNA zustande kommt. Falls das Signal auf kontaminierende Plasmid-DNA oder ankommende Viruspartikel zurückzuführen ist, so ergibt sich durch die Behandlung mit Stavudin kein Unterschied in der Reporteraktivität.

Für den Versuch wurden humane und nicht-humane Zelllinien mit einer definierten Menge an EGFP- bzw. Luciferase-Reporterviren infiziert. Um die RT-Aktivität zu hemmen, wurde zum Infektionsansatz jeweils 50mM Stavudin zugegeben. Zur Normalisierung der Messergebnisse wurde parallel ein Infektionsansatz mit unbehandelten Zellen (ohne Stavudin) mitgeführt. Das Reportersignal wurde jeweils 24h und 48h nach Infektion gemessen. Das Ergebnis für beide Reportersysteme ist in Abbildung 16 dargestellt.

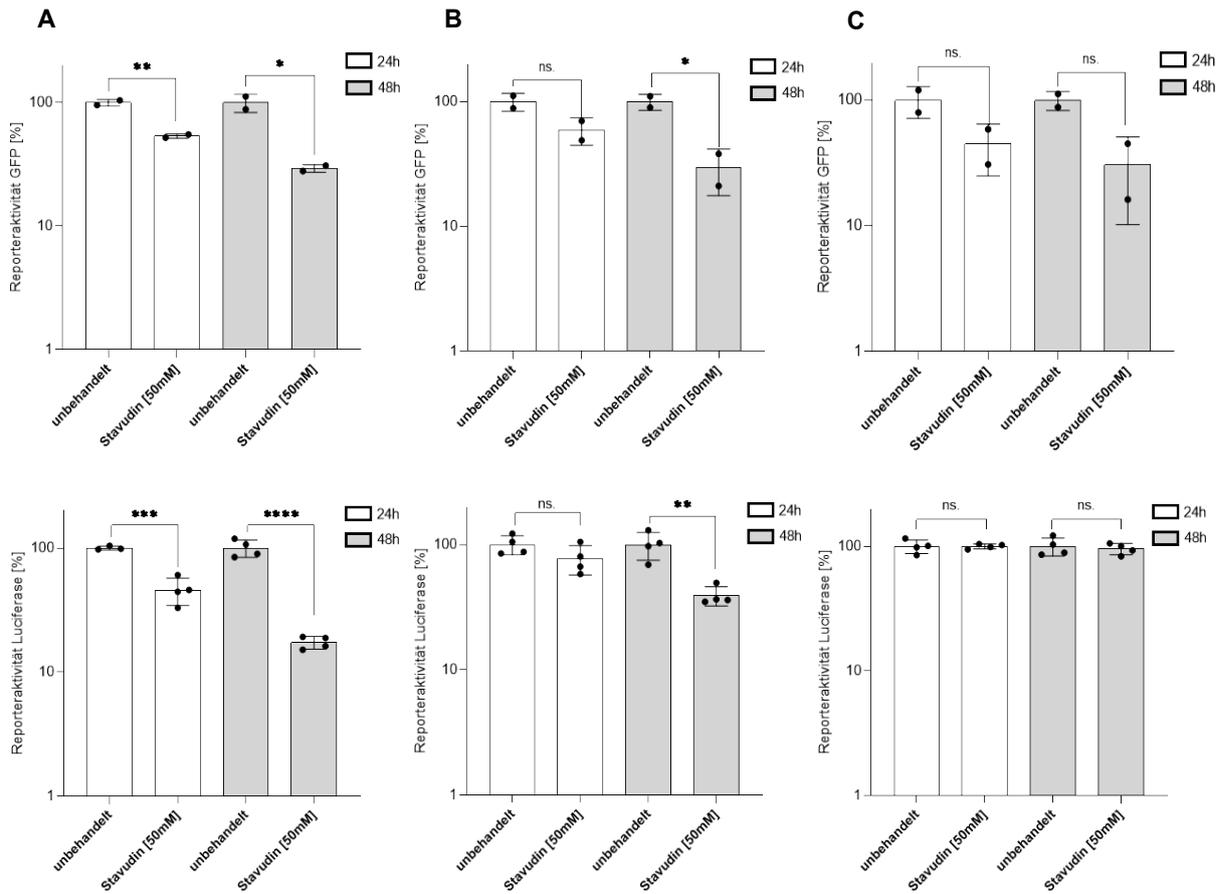


Abbildung 16: Logarithmische Darstellung der Reporteraktivität in % mit bzw. ohne den Zusatz von Stavudin [50mM] (A: HEK293T, B: HeLa, C: CrfK).

Die Reporteraktivität der unbehandelten und Stavudin-behandelten Zellen wurde nach jeweils 24h bzw. 48h p.i. miteinander verglichen. Die messbare Reporteraktivität der unbehandelten Kontrolle wurde als 100% gesetzt. In der oberen Reihe sind die Ergebnisse für EGFP-Reportersystem dargestellt. Die Werte setzen sich aus jeweils zwei Einzelmessungen zusammen. Die Ergebnisse für das Luciferase-Reportersystem sind der unteren Reihe der Abbildung zu entnehmen. Gemessen wurde hierfür in Vierfachbestimmung. *Signifikanztest: ungepaarter t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns.: nicht signifikant*

Die Behandlung mit 50mM Stavudin zeigte bei den Zelllinien HeLa und CrfK (Abbildung 16B und 16C) zum Messzeitpunkt nach 24h keinen Effekt. Ausschließlich bei der humanen Zelllinie HEK293T konnte durch den Einsatz von Stavudin eine signifikante Reduktion des Reportersignals nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (ohne Stavudin) wurde im Luciferase-Assay ein um 54,1% geringeres Reportersignal bestimmt. In der FACS-Analyse wurden im Mittel 46,4% weniger GFP-positive Zellen charakterisiert.

Zum Messzeitpunkt nach 48h konnte bei beiden humanen Zelllinien, HEK293T und HeLa, ein signifikanter Unterschied durch die Behandlung mit Stavudin gemessen werden. Bei der Zelllinie HeLa sinkt das Luciferase-Reportersignal durch 50mM Stavudin im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um durchschnittlich 60,7%. In der FACS-Analyse beträgt dieser Unterschied 70,4%.

Bei HEK293T führte die Behandlung mit Stavudin nach 48h zu einer durchschnittlichen Reduktion des Luciferase-Reportersignals um 82,7%. Im FACS konnten durch Stavudin im Mittel 70,6% weniger GFP-positive Zellen bestimmt werden. Für die nicht-humane Zelllinie CrfK konnte auch nach 48h kein signifikanter Unterschied der Reporteraktivität durch die Behandlung mit Stavudin detektiert werden.

4.6 Quantifizierung der Post-entry, pre-integration Inhibition von $\text{HERV-K}_{\text{con}}$

Das Wirtsspektrum von Retroviren wird neben dem Tropismus der Hüllproteine auch durch die Expression von antiviralen Inhibitoren bestimmt, welche Prozesse im Post-Entry- und Pre-Integrationschritt beeinflussen. Zu den Restriktionsfaktoren gehören beispielsweise das Fv1-Protein, APOBEC-Proteine und Trim5 α , deren Wirkung und Expression mit Ausnahme von APOBEC auf die infizierte Zelle beschränkt ist. Die Aktivität solcher Inhibitoren kann möglicherweise behindert werden, sofern es einen Überschuss an viralen Zielstrukturen gibt, welche die Inhibitoren binden und deren Wirkung damit abschwächen (Kramer et al. 2016; Lee 2010).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Zellen mit einer Standardmenge HERV-K(HML-2) basierter Luciferase-Reporterviren, sowie gleichzeitig mit einer steigenden Konzentration GFP-Reporterviren infiziert. Kann die Hypothese bestätigt werden, so sollte der Überschuss an GFP-Reporterviren zur Sättigung der Restriktionsfaktoren führen und somit den Eintritt des Luciferase-Virus begünstigen (Hatzioannou et al. 2004; Kramer et al. 2016). Das Prinzip dazu ist in Abbildung 17 dargestellt.

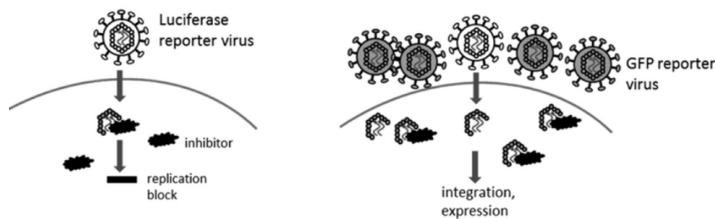


Abbildung 17: Effekt der Inhibitorsättigung durch den Überschuss an EGFP-Reporterviren.

Durch den Überschuss an EGFP-Reporterviren in der Co-Infektion können die Restriktionsfaktoren gebunden und der Entry des Luciferase-Reportervirus begünstigt werden (Übernommen aus Kramer et al. 2016)

Um die geeignete Menge an HERV-K(HML-2) basierten Luciferaseviren zu bestimmen, wurden humane und nicht-humaner Zelllinien mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:5, 1:25, 1:125) des Virus infiziert. Das Reportersignal, welches in Abbildung 18 für alle drei Zelllinien dargestellt ist, wurde 48h nach Infektion im Luminometer bestimmt.

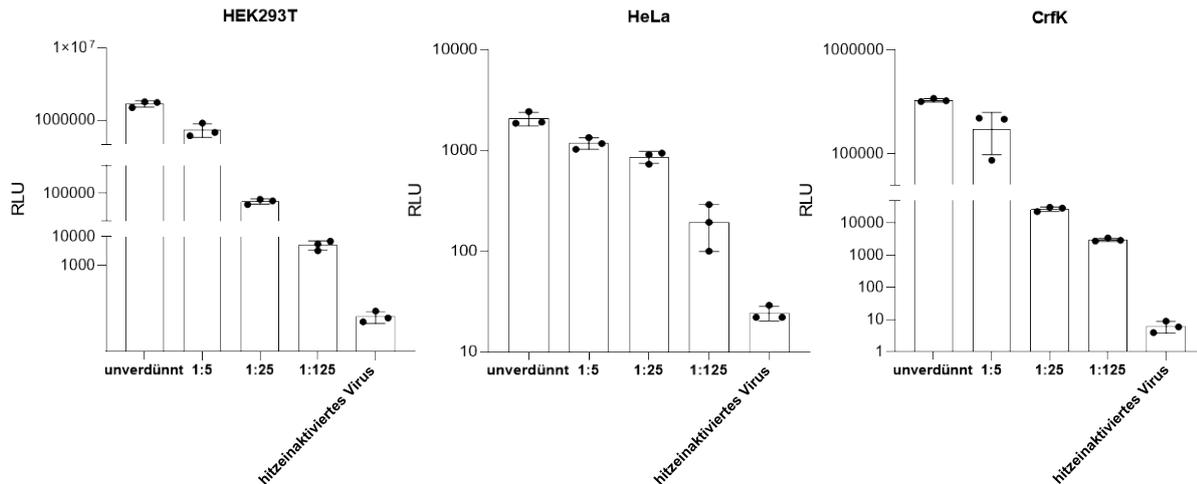


Abbildung 18: Vorversuch zur Bestimmung der Standardmenge an Luciferase-Virus für die Coinfektion mit GFP-Reporterviren.

Logarithmisch dargestellt ist das Luciferase-Reportersignal welches nach 48h für alle Virusverdünnungen gemessen wurde. Die Werte ergeben sich aus drei Einzelmessungen.

Entsprechend der Messergebnisse in Abbildung 18 wurde die Virusverdünnung 1:125 als Standardmenge für alle Zelllinien ausgewählt, da das korrespondierende Reportersignal über dem Hintergrund liegt.

Im weiterführenden Experiment wurde das Luciferase-Reportervirus allein und zusammen mit einem 1-, 2-, 5-, 20- und 200-fachen Überschuss an GFP-Reporterviren infiziert. Das Luciferase-Reportersignal wurde entsprechend Abbildung 19 ebenfalls 48h nach Infektion im Luminometer gemessen.

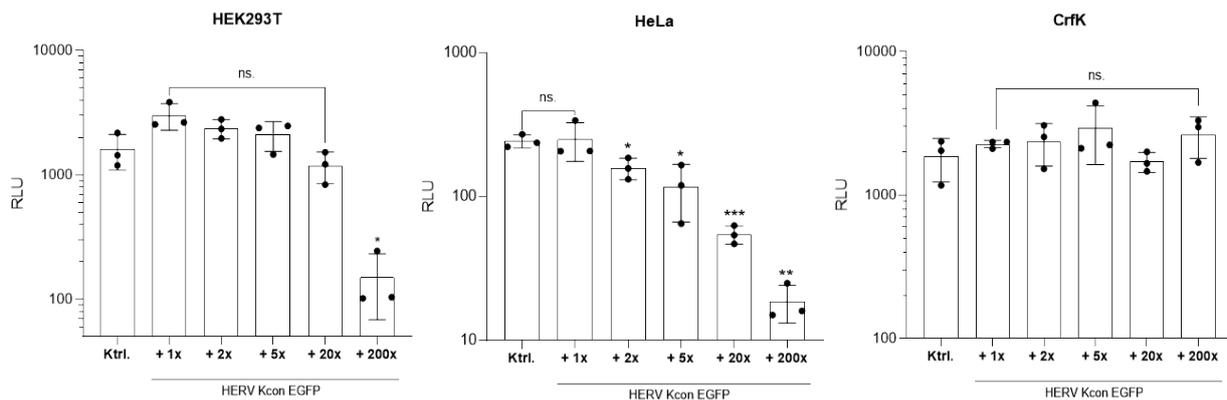


Abbildung 19: Coinfektion mit EGFP-Reporterviren zur Detektion antiviraler Restriktionsfaktoren.

Dargestellt ist das Titrationsexperiment mit HERV-K(HML-2) basierten GFP-Reporterviren zur Sättigung der antiviralen Restriktionsfaktoren. Alle drei Zelllinien wurden mit VSV-G pseudotypisierten Luciferase-Reporterviren und steigenden Konzentrationen von VSV-G pseudotypisierten GFP-Partikeln infiziert (Kontrolle, 1x, 2x, 5x, 20x oder 200x). Dargestellt ist der Mittelwert von drei Einzelmessungen. Signifikanz: *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ns. = nicht signifikant.

Durch die Co-Infektion mit VSV-G pseudotypisierten GFP-Partikeln, konnte bei keiner Zelllinie ein Anstieg der Luciferase-Reporteraktivität gemessen werden. Entsprechend Abbildung 19 führt der 200-fache Überschuss an EGFP-Viren bei der Zelllinie HEK293T sogar zu einem signifikanten Abfall des Luciferase-Reportersignals. Dieser Effekt wird bei der Zelllinie HeLa bereits ab 2x mehr EGFP-Virus beobachtet. Bei der nicht-humanen Zelllinie CrfK ist das Luciferase-Reportersignal bei allen Konzentrationen an EGFP-Virus unverändert.

4.7 Detektion viraler cDNA durch Mutagenese der U3-Region der 3'LTR

Im Rahmen der Forschungsarbeit sollte der Prozess der reversen Transkription näher analysiert werden. Hierzu galt der erfolgreiche Nachweis viraler cDNA als Hinweis für den vollendeten Ablauf der Reverse Transkription in den infizierten Zellen. In der Vergangenheit wurden schon mehrfach Infektionsexperimente durchgeführt, mit dem Ziel Produkte der Reversen Transkription im Cytoplasma oder Zellkern nachzuweisen. Dennoch bestand die Problematik darin, dass die virale cDNA durch den starken Background an Plasmid-DNA nicht detektiert werden konnte.

Plasmid-DNA gilt als eine der Hauptkontaminanten in Viruspräparaten. Da die Herstellung von Reporterviren auf der Transfektion von Plasmid-DNA basiert, werden diese trotz DNase Behandlung der Virus-Präparationen aus der Transfektion in die Infektion getragen, wodurch diese anstatt der viralen cDNA detektiert wird.

Um diesem Problem zu entgehen, wurden die HERV-K113 Molekularklone pBSKoriST und CMV-oriST verwendet und mittels Mutagenese durch einen SacI-Taq in der U3-Region der 3'LTR verändert. Das Ziel dabei ist es, eine kurze Sequenz so zu verändern, dass ein Primer spezifisch auf dieser Sequenz in der modifizierten U3-Region binden kann, nicht aber an die Original-Sequenz. Die Modifikation wurde so gewählt, dass eine SacI-Schnittstelle entsteht mit welcher die modifizierten Molekularklone leichter, d.h. nicht nur durch Sequenzierung zu identifizieren sind. Werden mit diesen mutierten Molekularklonen Reporterviren hergestellt und Zielzellen infiziert, so wird diese Mutation während der reversen Transkription durch intramolekulare Umlagerungen verdoppelt. Auf diese Weise ist die Mutation in der cDNA zweimal vorzufinden - die mutierte U3-Region ist nicht nur in der 3'-LTR, sondern auch in der 5'LTR vorhanden. Durch die relokalisierte Mutation unterscheidet sich die Sequenz der cDNA vom Plasmidhintergrund und kann so durch eine Real-time-PCR nachgewiesen werden. Dieses Prinzip ist in der folgenden Abbildung 20 dargestellt.

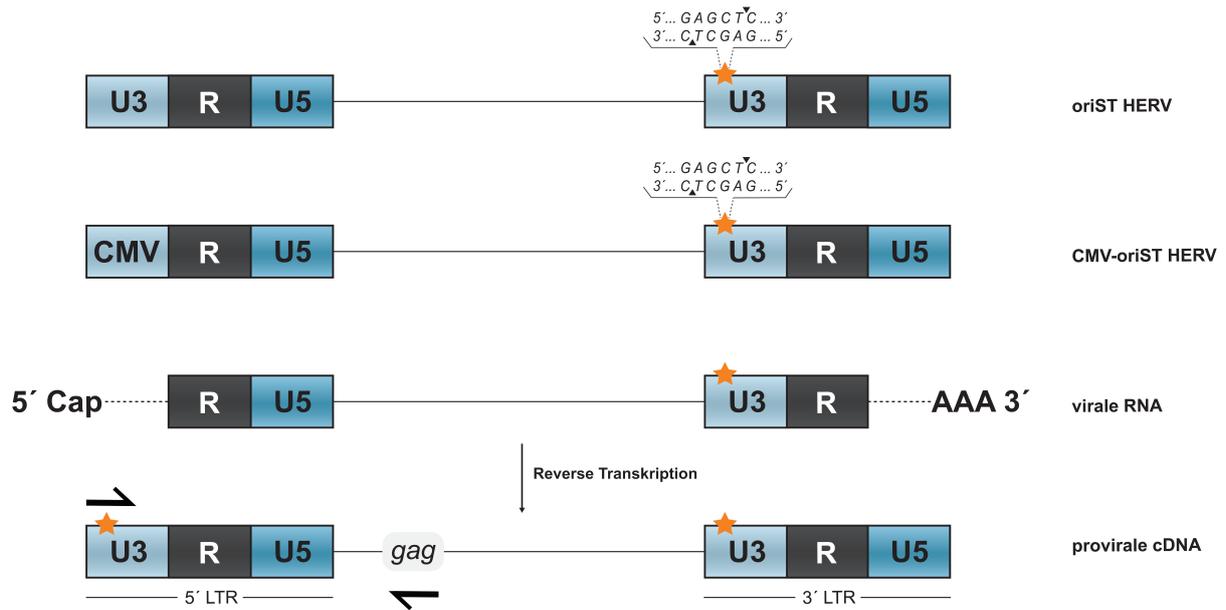


Abbildung 20: Schematische Darstellung zur Verdopplung der mutierten U3-Region während der reversen Transkription.

In der Plasmid-DNA ist die Mutation ausschließlich in der U3-Region der 3'LTR vorhanden. Während der reversen Transkription wird die Mutation durch intramolekulare Umlagerungen verdoppelt, weshalb die Mutation auch in der 5'LTR vorzufinden ist. Durch diesen Mechanismus unterscheidet sich die Sequenz viraler cDNA von der Plasmid-DNA (Quelle: Eigene Darstellung).

4.7.1 Generierung des *SacI*-Taq's der U3-Region der 3'LTR

Um die *SacI*-Mutation in der U3-Region der 3'LTR zu generieren, wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Die Problematik bestand auch bei diesem Vorhaben in der Anwesenheit von zwei LTRs bzw. R-U5 Regionen in der Plasmidsequenz von pBSKoriST bzw. CMV-oriST. Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine Subklonierung durchgeführt. Die zu mutierende 3'LTR Sequenz der Moleklarklone wurde mit einer PCR vervielfältigt und in den TOPO-XL Vektor subkloniert. Das Amplifikat enthält neben der zu mutierenden Sequenz auch die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *NotI*, welche später dazu dienen sollen, die mutierte 3'LTR wieder in den Ursprungsvektor rückzuklonieren.

Um den Erfolg der Mutagenese zu maximieren, wurden drei verschiedene Primer designt und für die Mutagenese getestet. Die folgende Abbildung 21 zeigt das Ergebnis des Kontrollverdau mit *SacI* zur Überprüfung der Mutagenese. Da der TOPO-XL Subklonierungsvektor bereits an anderer Position eine Restriktionsschnittstelle für *SacI* besitzt, sind bei erfolgreicher Mutagenese entsprechend durch den Kontrollverdau mit *SacI* zwei DNA-Banden zu erwarten.

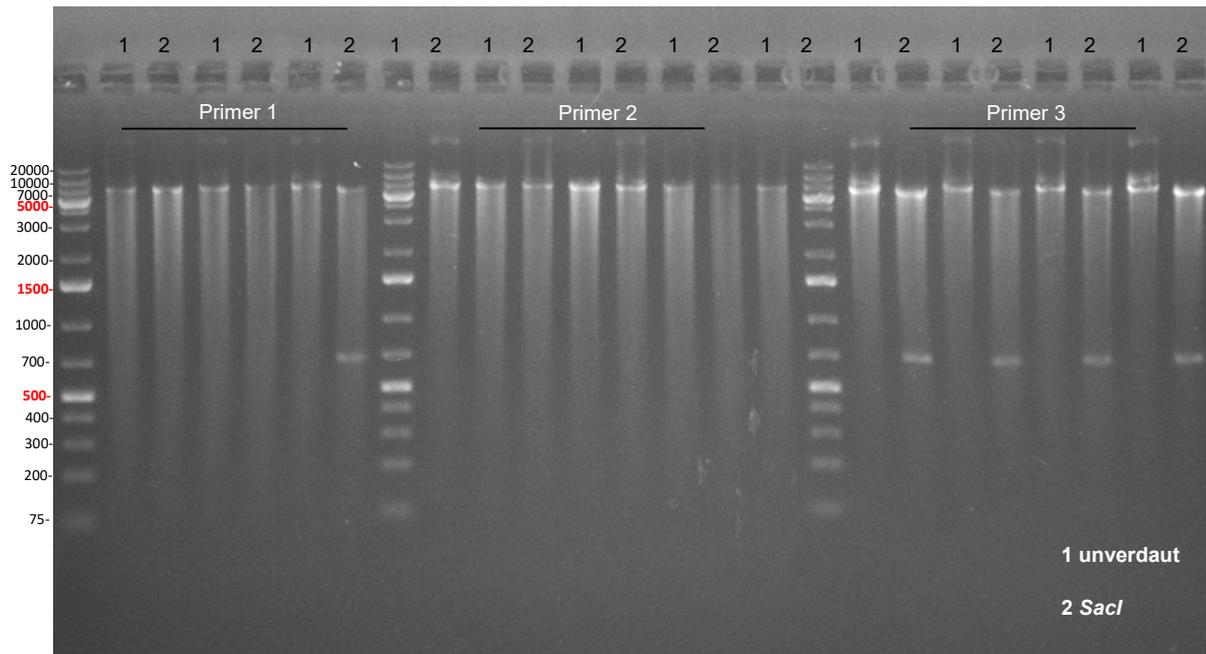


Abbildung 21: Kontrollverdau mit *SacI* zur Überprüfung der Mutagenese-PCR in dem TOPO-XL Vektor.

1.) unverdautes Plasmid 2.) Restriktionsverdau mit *SacI*, um die Mutation nachzuweisen. Dargestellt ist der Verdau von jeweils drei bzw. vier Klonen nach Mutagenese mit dem jeweiligen Primer. Das unverdaute Plasmid wurde als Kontrolle mitgeführt.

Marker: *GeneRuler 1kb plus DNA Ladder*

Ein positiver Klon, welcher mit Primerset 3 generiert wurde, diente für die Rückklonierung der mutierten 3'LTR. Hierfür wurden die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *NotI* verwendet. Das Ergebnis der Rückklonierung ist in Abbildung 22 dargestellt.

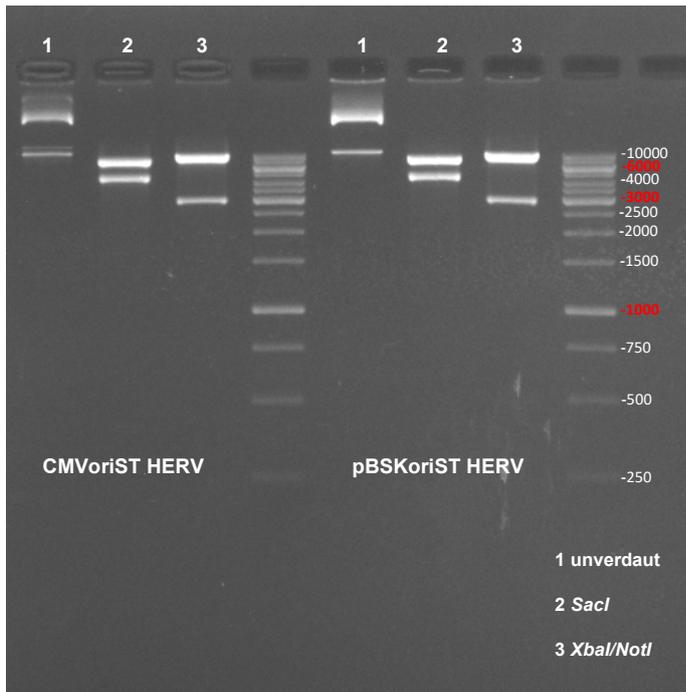


Abbildung 22: Kontrollverdau nach Rückklonierung der mutierten 3'LTR in die Moleklarklone pBSKoriST bzw. CMVoriST.

1.) unverdautes Plasmid; 2.) Restriktionsverdau mit *SacI*, um die Anwesenheit des Tags nachzuweisen; 3.) Restriktionsverdau mit *XbaI* und *NotI*, um die Länge des subklonierten PCR-Fragments zu bestimmen. Erwartete DNA-Bande für *SacI*: 4,5kb und 8,1kb. Erwartete DNA-Banden für den Doppelverdau mit *XbaI* und *NotI*: Insert 2,9kb/ resultierender Vektor: 9,8kb
 Marker: *GeneRuler 1kb DNA Ladder*

4.8 Einfluss des U3-Taqs auf die Partikelproduktion

Mit der U3-Region hängen bekannterweise wichtige genregulatorische Funktionen zusammen. Um zu überprüfen, ob diese durch den U3-Taq beeinflusst werden, wurde die Partikelproduktion mit nicht mutierten Reporterviren anhand einer qRT-PCR und einem PERT-Assay verglichen. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung 23 dargestellt.

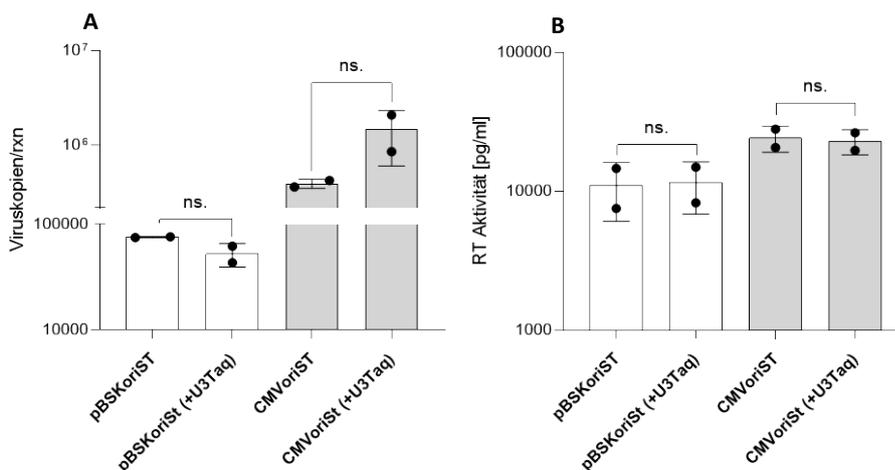


Abbildung 23: Vergleich der Virusproduktion mit bzw. ohne U3-Taq.

qRT-PCR (A) und PERT (B). Die einzelnen Mittelwerte gehen aus der Messung von zwei Einzelwerten hervor. *Signifikanztest: ungepaarter t-test; ns.: nicht signifikant*

Aus den Ergebnissen mit der qRT-PCR, als auch dem PERT-Assay geht hervor, dass die Partikelproduktion durch die Anwesenheit des U3-Taqs nicht beeinflusst wird. Dies gilt sowohl für den Moleklarklon pBSKorist als auch CMVoriST. In Anbracht der Standardabweichung und einer Datenanalyse mit dem t-test konnte durch den U3-Taq kein signifikanter Unterschied in der Partikelproduktion detektiert werden.

4.9 Real-time PCR zum Nachweis viraler DNA

Die relokalisierte Mutation in der 5'LTR dient zur Detektion viraler cDNA und sollte mithilfe einer Real-time-Duplex-qPCR nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein Forward-Primer generiert, welcher mit dem 3'Ende genau auf der Mutation (*SacI*-Taq) liegt. Damit ausschließlich die Mutation der 5'LTR exponentiell amplifiziert wird, wurde der Reverse-Primer so erstellt, dass dieser in der *gag*-Region downstream der 5'LTR bindet.

4.9.1 Etablierung des Testsystems anhand einer Positivkontrolle

Um sicherzustellen, dass die zum Nachweis der Mutation verwendeten Primer zuverlässig sind, wurde eine Positivkontrolle (PTC) generiert. Hierzu wurde ein Konstrukt zur Verfügung gestellt, welches durch Fusions-PCR generiert wurde und die 5'LTR und das *gag*-Gen im pCR₄TOPO Vektor enthält. Um dieses Konstrukt im Rahmen der Arbeit als Positivkontrolle nutzen zu können, wurde mithilfe des zuvor verwendeten Mutagenese-Primers (Abbildung 21, Primer 3) die Restriktionsschnittstelle für *SacI* in der U3-Region der 5'LTR generiert. Durch Sequenzierung wurde die Mutagenese verifiziert. Das Design der Positivkontrolle ist in Abbildung 24 dargestellt.

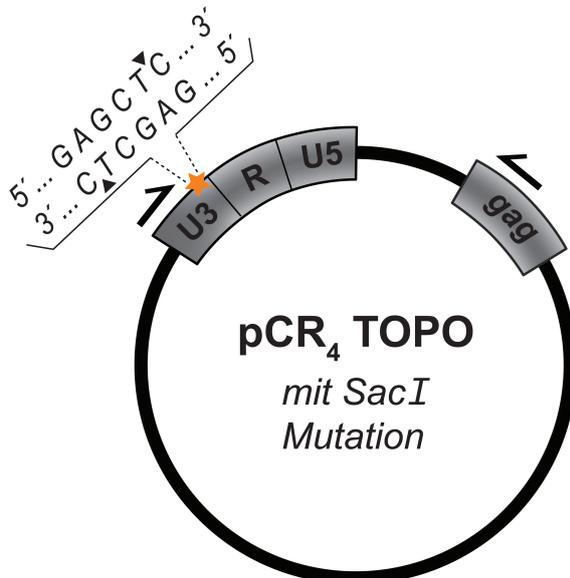


Abbildung 24: Positivkontrolle zur Etablierung des PCR-Systems.

Schematische Darstellung der Positivkontrolle, welche für die Etablierung der PCR genutzt wurde. Dargestellt sind die Bindungsstellen der genutzten Primer, sowie die Lokalisation der *SacI*-Mutation in der 5'LTR, welche in der PCR detektiert werden soll (Quelle: Eigene Darstellung).

Um die Sensitivität der Primer in der Real-Time-Duplex-PCR zu überprüfen, wurde die PTC als serielle Verdünnungsreihe von $5 \cdot 10^7$ bis 5 Kopien getestet. Um die Versuchsbedingungen für das Infektionsexperiment widerzuspiegeln, wurde die PTC in Anwesenheit humaner und nicht-humaner genomischer DNA (gDNA) [100ng] pro Ansatz gemessen. Die Titration der PTC konnte entsprechend Abbildung 25, sowohl im Hintergrund humaner, als auch nicht-humaner DNA bis zu einem Limit von 5000 Kopien quantifiziert werden.

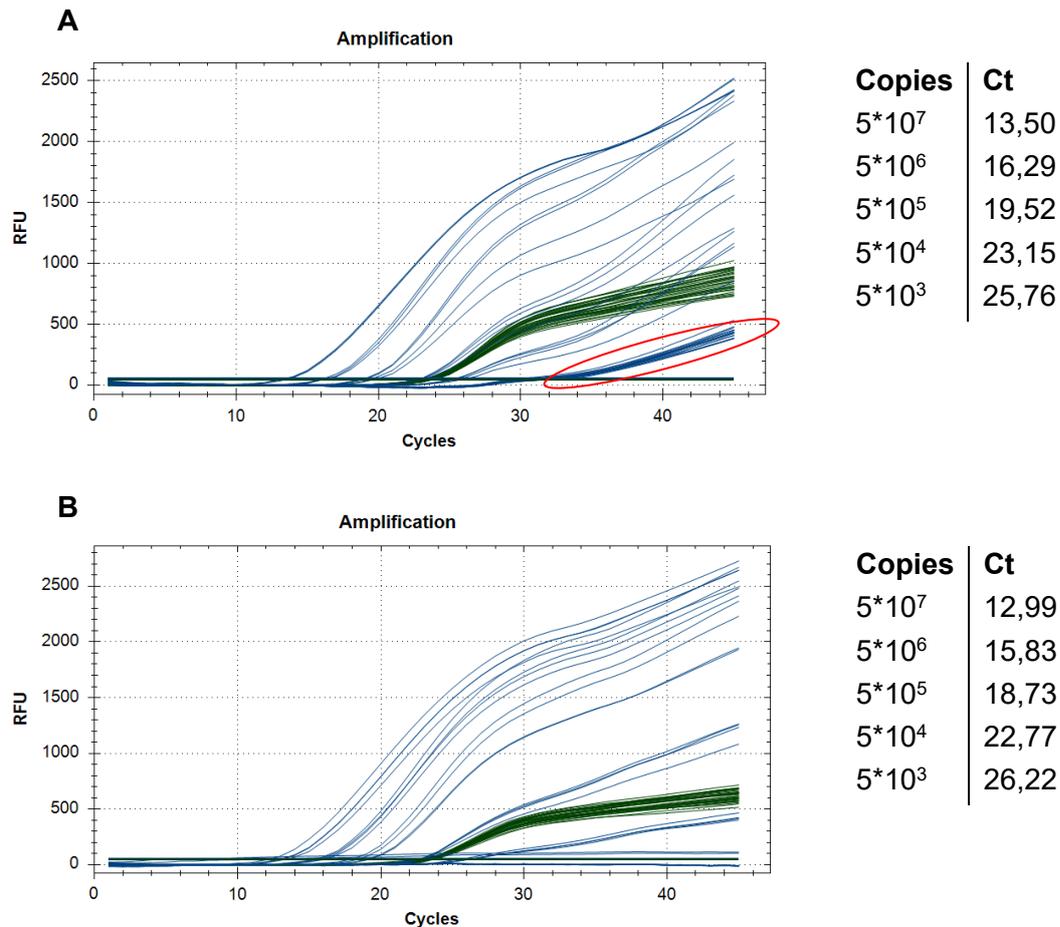


Abbildung 25: Ermittlung der Detektionslimits im Hintergrund genomischer DNA humaner (A) bzw. nicht-humaner Zellen (B) [100ng] pro Ansatz.

Die Titration konnte spezifisch bis zu einem Limit von 5000 Kopien pro Probe bestimmt werden. GAPDH wurde in jeder Probe gemessen, um den Gehalt an genomischer DNA zu kontrollieren. Bei weniger als 5000 Kopien/Reaktion werden im Hintergrund humaner gDNA gleichbleibend hohe Ct-Werte ermittelt (siehe rote Markierung).

Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Überprüfung des PCR-Produktes auf dem Agarosegel. Das PCR-Amplifikat, welches 544bp umfasst, konnte sowohl im Hintergrund humaner-, als auch nicht-humaner DNA bis zu einer Verdünnung von 5000Kopien/Probe nachgewiesen werden.

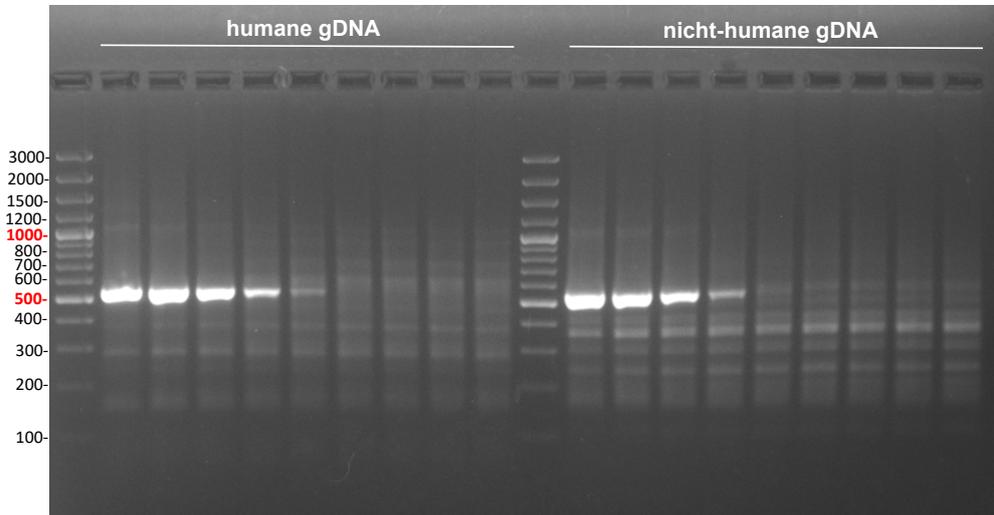


Abbildung 26: Kontrolle des PCR-Produktes.

Sowohl im Hintergrund humaner, als auch nicht-humaner DNA konnte die Positivkontrolle bis zu 5000 Kopien/Probe nachgewiesen werden. Das PCR-Produkt entspricht erwartungsgemäß der richtigen Länge von 544bp.

4.9.2 Nachweis der verlagerten Mutation in der 5'LTR durch eine Real-time-duplex-PCR

Nach Etablierung der PCR, wurden die U3-mutierten Reporterviren für ein Infektionsexperiment an HEK293T verwendet, um virale cDNA in der Real-time PCR nachzuweisen. Nicht mutierte Reporterviren wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Für eine vergleichbare Infektion wurde die Menge an Reporterviren mit dem PERT-Assay auf einen Wert von 15000 Kopien/ Ansatz normalisiert. Ein DNase-Verdau der Virus-Präparation wurde vor der Infektion durchgeführt, um ein Überführen von DNA zu vermeiden.

Jeweils 24h und 48h nach Infektion wurde die genomische DNA isoliert und in der Real-time-duplex-PCR auf die Mutation in der 5'LTR getestet, welche dem Nachweis der viralen cDNA dient. Die Konzentration genomischer DNA wurde für die Real-time PCR auf 65ng/ μ l angepasst.

Entsprechend der Ergebnisse der Real-time PCR konnte erwartungsgemäß ohne die Anwesenheit des U3-Taqs keine virale cDNA detektiert werden. Zu beiden Messzeitpunkten liegen die Ct-Werte außerhalb des Detektionslimits.

Bei den mutierten Reporterviren konnte jedoch sowohl nach 24h, als auch nach 48h virale cDNA nachgewiesen werden.

Mithilfe der PTC, welche als Standardreihe von $5 \cdot 10^7$ bis 5 Kopien gemessen wurde, konnte die Menge viraler cDNA pro zellulärem Genom in einer definierten Menge gDNA (330ng) quantifiziert werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 dargestellt.

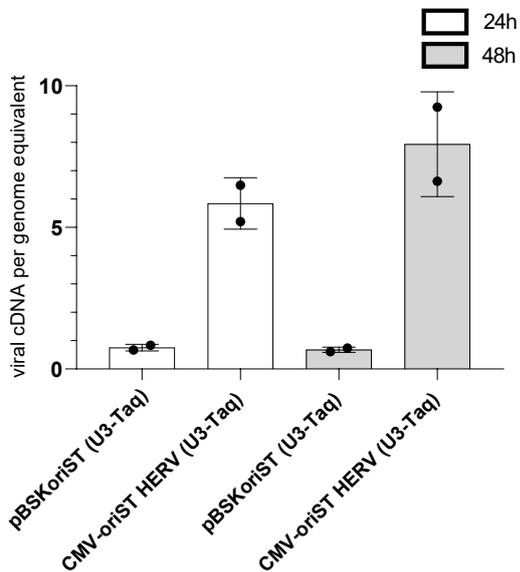


Abbildung 27: Virale cDNA per genome equivalent (24h und 48h nach Infektion).

Sowohl nach 24h, als auch 48h kann virale cDNA durch die Mutation in der 5'LTR nachgewiesen werden.

Für pBSKoriST konnten 0,75 Kopien (nach 24h) bzw. 0,68 Kopien (nach 48h) virale cDNA pro zellulärem Genom bestimmt werden. Mit CMVoriST konnte im Vergleich durchschnittlich die zehnfache Menge viraler cDNA pro zellulärem Genom nachgewiesen werden (5,84 Kopien nach 24h und 7,93 Kopien nach 48h), was vermutlich auf eine unterschiedliche Infektionsdosis zurückzuführen ist.

Im Anschluss an die Real-time wurde das PCR-Produkt auf das Gel aufgetragen, um die richtige Länge des PCR-Amplifikats zu überprüfen. Aus Abbildung 28 geht hervor, dass virale cDNA nur durch die Anwesenheit des Taqs detektiert werden kann. Das resultierende PCR-Produkt entspricht erwartungsgemäß der Länge von 544bp. Die Ergebnisse für die Negativkontrolle sind in Übereinstimmung mit den PCR-Daten und zeigen, dass kein Amplifikat generiert wurde.

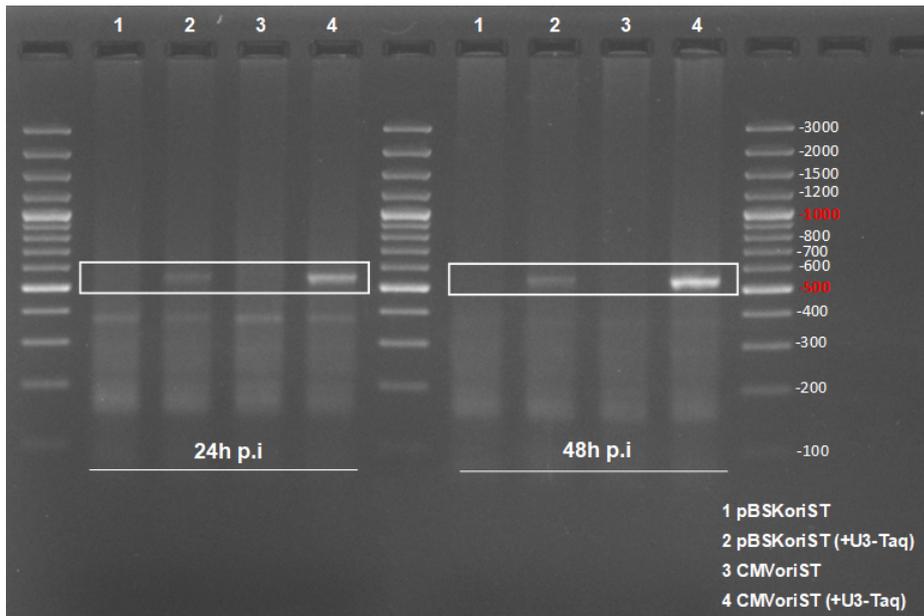


Abbildung 28: Gelelektrophorese zur Überprüfung des PCR-Produktes.

Erwartetes PCR Produkt bei Amplifikation der Mutation in der 5'LTR: 544bp. Die Mutation kann ausschließlich bei den mutierten Reporterviren nachgewiesen werden und entspricht der erwarteten Länge von 544bp. Die Proben ohne Markersequenz sind negativ für den Nachweis der Mutation in der 5'LTR.

5 Diskussion

Die Arbeit mit humanen endogenen Retroviren steht vor der Schwierigkeit, dass keine ehemals exogenen Formen mehr bekannt sind. Verschiedene Mutationen haben zur Replikationsunfähigkeit geführt, was bedeutet, dass aus den HERV-Sequenzen keine funktionalen Viruspartikel mehr gebildet werden können. Dieses Problem konnte umgangen werden, indem es drei Forschungsgruppen unabhängig voneinander gelungen ist, eine Konsensussequenz von HERV-K abzuleiten, welche die ungefähre Sequenz des ursprünglich, entstemten Retrovirus widerspiegelt (Lee und Bieniasz 2007; Chudak et al. 2013; Dewannieux et al. 2006). Diese Idee hierzu basiert auf der Annahme, dass alle angesammelten Replikationsdefekte, die in den HERV-K-Proviren codiert und in der menschlichen DNA vorhanden sind, entweder einzigartig für jedes Provirus sind oder nur von einer Minderheit der kürzlich integrierten Proviren geteilt werden. Stimmt diese Annahme, so sollte es durch Korrektur der Mutationen möglich sein, eine funktionelle Ursprungssequenz von HERV-K herzuleiten (Lee und Bieniasz 2007; Lee 2010).

Durch den Moleklarklon („HERV-K_{con}“), welcher die rekonstituierte Konsensussequenz besitzt, können erfolgreich Reporterviren generiert werden, welche eine schwache Infektion und Integration bestimmter Zelllinien ermöglichen (Lee und Bieniasz 2007).

Die Klonierung der Luciferase in HERV-K_{con} erhöht die Sensitivität für nachfolgende Infektionsexperimente

Das auf dem HERV-K_{con} codierte EGFP-Reportergen wurde bislang dazu genutzt, um Infektions- und Integrationsereignisse mit den HERV-basierten Reporterviren zu quantifizieren. Obwohl das EGFP-Reportergen ein weit verbreitetes Tool für die Abbildung molekularer Prozesse darstellt, so kann bei der Quantifizierung der Reporteraktivität oft keine ausreichende Sensitivität erreicht werden. Dies liegt daran, dass in der FACS-Messung zwar die Anwesenheit von GFP in einer Zelle, nicht aber die relative Proteinmenge quantifiziert wird. Letzteres ist gerade deshalb entscheidend, um Unterschiede in der Reporteraktivität sensitiv detektieren zu können. Diese ergeben sich im Laufe eines Infektionsexperimentes beispielsweise, wenn sich die Menge an Proviren verändert oder die Aktivität des Promotors beeinflusst wird. Mit dem FACS ist diese Quantifizierung nicht möglich, da dies voraussetzen würde, dass man Unterschiede in der Fluoreszenzintensität infizierter Zellen detektieren kann. Aufgrund dessen wurde die Luciferase als neues Reportersystem in HERV-K_{con} etabliert, mit dem Ziel, die Sensitivität für nachfolgende Infektionsexperimente zu verstärken. Bei der Messung der Luciferaseaktivität wird im Vergleich zur FACS-Analyse nicht nur die Anwesenheit des Reportergens, sondern auch die Stärke der Reporterexpression berücksichtigt. Es handelt sich um eine relative Quantifizierung, mit welcher Anhand der Menge des Enzyms eine Aussage über die Stärke der Infektion getroffen werden kann.

Veränderungen in der Reporterexpression und der Promotoraktivität können durch diese Art der Quantifizierung sensitiv detektiert werden (Solberg und Krauss 2013).

Die Klonierung des Luciferase-Gens resultiert in einem funktionellen Konstrukt (HERV-K_{con}Luc) mit welchem erfolgreich Reporterviren generiert werden können

Entsprechend der Strategie in Abbildung 6, konnte das Verfahren der Subklonierung erfolgreich dazu angewandt werden, um das EGFP-Gen in HERV-K_{con} gegen das Luciferase-Gen auszutauschen. Um das resultierende Vektorkonstrukt HERV-K_{con}Luc für die Produktion von Reporterviren nutzen zu können, musste dennoch zuerst die Funktionalität des Luciferase-Gens *in-vitro* überprüft werden. Die Transfektion des Plasmidkonstrukts in HEK293T konnte erfolgreich zeigen, dass das Reporter gen unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wird. Ebenso konnte durch weiterführende Ergebnisse bestätigt werden, dass mit HERV-K_{con}Luc infektiöse Viruspartikel generiert werden können. Obwohl HERV-K_{con} durch die Klonierung der Luciferase artifiziell vergrößert wurde, konnte im Vergleich zur Virusproduktion mit dem Ursprungsplasmid HERV-K_{con}EGFP kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

Nach Infektion mit HERV-K_{con} können stabile Reportersignale nachgewiesen werden

Anhand eines Infektionsversuches wurden die beiden Reportersysteme EGFP und Luciferase direkt miteinander verglichen. Aus dem Infektionsexperiment sollte die Frage geklärt werden, ob das Reporter gen stabil in das Genom der infizierten Zielzelle integriert wird. Dies setzt voraus, dass das Reportersignal stabil über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden kann. Aus diesem Grund wurde das Experiment über einen Zeitraum von 68 Tagen durchgeführt. Gleichzeitig sollte die Gegenüberstellung dazu dienen, die Reportersysteme zu vergleichen und die Vorteile des Luciferase-Reporters zu verdeutlichen.

Die Forschungsgruppe Konstantoulas und Indik konnte bereits zeigen, dass in HeLa-Zellen, die mit pseudo-Betaretroviren infiziert werden für mindestens sieben Wochen ein EGFP-positives Signal gemessen werden kann (Konstantoulas und Indik 2014). Diese Beobachtung spiegelt sich auch im Infektionsexperiment wider, bei dem das die Reportersignale für EGFP und Luciferase bei der Zelllinie HEK293T über einen langen Zeitraum stabil nachweisbar sind (Abbildung 13). In Übereinstimmung damit ist auch die DNA-Analyse, mit welcher für beide Reportersysteme nach rund 15 Tagen eine relativ stabile Menge viraler cDNA pro zellulärem Genom nachgewiesen werden kann. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine stabile Integration des Reporter gens stattgefunden hat. Im Gegensatz zu EGFP fällt das Luciferase-Reportersignal nach rund 60 Tagen kontinuierlich ab. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Menge viraler cDNA pro zellulärem Genom wider und deutet darauf hin, dass vermutlich die Menge an Zellen mit dem integrierten Provirus abgenommen hat.

Bei der Zelllinie HeLa werden anfänglich hohe Reportersignale gemessen, die sich erst zu einem späteren Zeitpunkt stabilisieren (Abbildung 14). Durch einen parallelen Infektionsversuch mit Stavudin konnte für beide Reportersysteme gezeigt werden, dass das Reportersignal nach 24h durch die Anwesenheit von Plasmid-DNA oder ankommende Viruspartikel zustande kommt. Erst nach 48h ist nachweislich cDNA vorhanden. Rund 60,7% (Luciferase) und 70,4% (GFP) des Reportersignals sind nach diesem Messzeitpunkt auf virale cDNA zurückzuführen (Abbildung 16). Während sich die Anzahl an GFP-positiven Zellen bereits nach Tag 8 auf einen Wert von 5,6% stabilisiert, so sind im Luciferase-Assay deutlich mehr Abstufungen in der Reporteraktivität erkennbar. Sowohl nach Messtag 5, als auch Messtag 22 sinkt das Luciferase-Reportersignal. Auf DNA-Ebene (virale cDNA pro zellulärem Genom) ist dies teilweise schon früher zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Menge an Zellen mit integriertem Provirus oder die Aktivität des CMV-Promotors abgenommen hat, wodurch folglich weniger Reporter gene exprimiert wird. Möglich wäre auch, dass die Reporterexpression eingestellt wurde, da die Zellen im Kultivierungsformat zu dicht gewachsen sind.

Interessanterweise werden für EGFP bei den Zelllinien HEK293T und HeLa ähnliche Werte an GFP-positiven Zellen ermittelt (\approx 5%-6%). Dennoch weichen die Messwerte, welche mit dem Luciferase-Assay ermittelt wurden, für beide Zelllinien stark voneinander ab. Diese Beobachtung deutet auf eine unterschiedliche Expression des Reportergens hin. Es ist bekannt, dass die Aktivität des CMV-Promotors, unter welchem die Reportergene exprimiert werden, von Zelltyp zu Zelltyp erheblich variieren kann (Schlabach et al. 2010; Qin et al. 2010).

Bei der Zelllinie CrfK (Abbildung 15) werden sowohl nach 24h, als auch 48h hohe Reportersignale bestimmt. Durch einen parallelen Versuch mit Stavudin konnte gezeigt werden, dass die anfänglichen Signale nach 24h und 48h auf Plasmid-DNA oder die ankommenden Viruspartikel zurückzuführen sind (Abbildung 16). Für das EGFP Reportersystem sinkt die Anzahl GFP-positiver Zellen bis Messtag 12, stabilisiert sich dann aber auf einen Wert von 0,82%. An dieser Stelle könnte man eine schwache Integration der Reportergens vermuten, da ebenfalls stabile Werte viraler cDNA pro zellulärem Genom (0,0029) gemessen werden. Für das Luciferase-Reportersystem können im Vergleich mehr Unterschiede in der Reporteraktivität detektiert werden. Auf DNA-Ebene können keine stabilen Werte für die virale cDNA per zellulärem Genom detektiert werden. Da die Messwerte sehr stark schwanken, könnte es sich hierbei um Plasmid-Kontaminationen handeln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem Luciferase-Reporter im Verlauf des Experiments deutlich mehr Abstufungen in der Reporteraktivität quantifiziert werden konnten. Dies verdeutlicht die Vorteile des Reportersystems, mit welchem Unterschiede in der relativen Enzymmenge und der Promotoraktivität deutlich sensitiver detektiert werden können. Die

stabilen Reportersignale für EGFP und Luciferase sprechen dafür, dass vermutlich eine stabile Integration des Reportergens stattgefunden hat. Möglicherweise können die Signale aber auch aus nicht integrierter HERV-DNA resultieren (LTR-circles), welche als Nebenprodukt bei der reversen Transkription entsteht (Butler et al. 2001).

Der Effekt der Inhibitorsättigung kann durch die Coinfektion mit HERV-K_{con}EGFP basierten Reporterviren nicht beobachtet werden

Zelluläre Restriktionsfaktoren gegen Retroviren, insbesondere MLV (Murine leukemia virus), wurden schon Ende der 60er Jahre entdeckt. Fv-1 (Friend virus susceptibility gene 1) wurde als dominantes Gen identifiziert, welches Mäuse vor einer letalen Dosis MLV schützen kann (Frank 1970; Sanz-Ramos und Stoye 2013). Fv-1 hemmt die Virusreplikation nach der reversen Transkription und vor allem die Integration des viralen Genoms (Jolicoeur und Baltimore 1976). Es konnte ebenso beobachtet werden, dass die Aktivität des Restriktionsfaktors gesättigt werden kann, was darauf hinweist, dass es in begrenzten Mengen in der Zelle vorhanden ist (Duran-Troise et al. 1977).

Die Beobachtung, dass Restriktionsfaktoren gesättigt werden können, konnte auch in einer vorangegangenen Arbeit von Kramer et al. mit oriHERV basierten Reporterviren gezeigt werden. Sie konnten beobachten, dass die Resistenz gegen ein Retrovirus aufgehoben werden kann, wenn ein Überschuss eines anderen Retrovirus vorhanden ist (Kramer et al. 2016).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei humane und eine nicht-humane Zelllinie auf die Sättigung antiviraler Faktoren durch HERV-K(HML-2) basierte EGFP-Reporterviren untersucht. Hierzu wurde über ein Infektionsexperiment zunächst die Standardmenge von HERV-K(HML-2) basierten Luciferase-Reporterviren bestimmt. Die Standardmenge leitet sich aus dem korrespondierenden Luciferase-Reportersignal ab, welches 48h nach Infektion knapp über dem Backgroundsignal liegt (Abbildung 18). Bei einem geringen Signal für die Luciferase können mögliche Veränderungen des Reportersignals, die aus der Coinfektion mit EGFP-Reporterviren hervorgehen, leichter identifiziert werden.

Die Standardmenge an Luciferase-Reporterviren wurde in einem zweiten Infektionsversuch zusammen mit einer ansteigenden Menge GFP-Reporterviren infiziert. Die EGFP-Reporterviren sollten im Überschuss dazu dienen die antiviralen Restriktionsfaktoren abzusättigen, wodurch der Eintritt der Luciferase-Viren begünstigt wird.

Entsprechend der Abbildung 19, konnte der Effekt der Inhibitorsättigung in keinem der drei Zelllinien nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die erhöhte Expression von Inhibitoren darstellen, deren Aktivität durch das EGFP-Reportervirus in der Coinfektion

nicht gesättigt werden konnte. Des Weiteren könnte man vermuten, dass keine ausreichende Wechselwirkung zwischen dem Reportervirus und den Restriktionsfaktoren stattgefunden hat. Die Abnahme des Luciferase-Reportersignals bei HEK293T und HeLa lässt schlussfolgern, dass es zu cytotoxischen Effekten kam, welche auf den Überschuss an GFP-Viren zurückzuführen sind.

Es kommen zwei mögliche Gründe in Frage, weshalb dieser Effekt zwar in der vorangegangenen Arbeit von Kramer et. al, nicht aber im Rahmen dieses Infektionsversuches nachgewiesen werden konnte. Deren Infektionsversuch wurde im Vergleich zu diesem Experiment mit nicht-integrationsfähigen Viruspartikeln durchgeführt. Möglich wäre, dass bei deren Versuch keine Effekte basierend auf einer Inhibitorsättigung gemessen wurden, sondern Signale die auf die ankommenden Viruspartikel zurückzuführen sind (Kramer et al. 2016; Lausch 2013). Des Weiteren gibt es auf Nukleotidebene insgesamt 34 Sequenzunterschiede zwischen der ori-Sequenz und HERV-K_{con}. Diese führen zu zwei Aminosäureaustauschen im Matrixprotein und zu einem Aminosäureaustausch in der *pol*-Sequenz. Diese Veränderungen könnten die Wechselwirkung zwischen dem Reportervirus und den Restriktionsfaktoren negativ beeinflussen.

Eine Markersequenz in der 3'LTR kann als mögliches Tool zur Detektion viraler cDNA genutzt werden

Mit der Konsensussequenz können HERV-K(HML-2) basierte Reporterviren generiert werden, die eine schwache Infektion bestimmter Zelllinien ermöglichen. Trotz allem sind die Reporterviren nicht replikationskompetent, was darauf schließen lässt, dass zelluläre Restriktionsprozesse auf Ebene des Postentrys stattfinden. Um dies genauer zu untersuchen, galt es mithilfe eines Infektionsexperimentes virale cDNA als Produkt der reversen Transkription nachzuweisen.

Während dem Prozess der reversen Transkription kommt es zur Verdopplung der LTRs. Dieser Mechanismus befähigt das Virus die Integration zum Provirus zu vermitteln. Für die Arbeit wurde dieser Mechanismus dazu genutzt, um virale cDNA nachzuweisen.

Die Markersequenz wurde in die U3-Region der Vollängenmolekularklone pBSKoriST und CMV-oriST eingefügt. Beide Konstrukte enthalten einen vollständigen Molekularklon des HERV-K(HML2). Um HERV-K in einem möglichst originalen Zustand zu untersuchen, wurden die stillen Mutationen rückgängig gemacht. Im Vergleich zu dem Molekularklon pBSKoriST, besitzt CMV-oriST einen CMV-Promotor statt der U3-Region in der 5'LTR.

Für die Gestaltung der Markersequenz, mussten ausreichend DNA-Basen in der U3-Region verändert werden, damit eine Detektion des Taq durch einen geeigneten Primer in der Real-time PCR möglich ist. Gleichzeitig galt es die Funktion der U3-Region zu erhalten, da mit der

Gensequenz bekannterweise wichtige regulatorische Funktionen zusammenhängen (Mold et al. 1997). Um dies umzusetzen, wurden Mutagenese-Primer designt, welche einen SacI-Taq in der U3-Region generieren. Mit dieser Mutation wurden insgesamt drei Basenpaare gegenüber der ursprünglichen pBSKoriST bzw. CMV-oriST Sequenz verändert.

Erwartungsgemäß konnte der U3-Taq im Rahmen einer Mutagenese-PCR generiert und durch einen Kontrollverdau mit SacI nachgewiesen werden (Abbildung 21 und 22).

Die Promotoraktivität bleibt durch den U3-Taq erhalten

Die U3-Region (als Komponente der 3´LTR) erfüllt eine wichtige Funktion als Promotor. Einzelne Variationen innerhalb der Sequenz können zu einem signifikanten Unterschied in der Promotoraktivität führen. Zu diesem Ergebnis kamen Mold et al., die anhand eines *in-vitro* Transkriptionsassays verschiedene Klassen von HERV-K Proviren verglichen, welche einzelne Unterschiede in der U3-Sequenz aufzeigten (Mold et al. 1997).

Im Rahmen der Arbeit konnte diese Beobachtung für die Mutation in der U3-Region nicht bestätigt werden. Beim Vergleich der Virusproduktion ohne den U3-Taq, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dieser Befund stützt sich auf die Durchführung eines PERT-Assays und einer qRT-PCR. In Anbetracht der Standardabweichung und unter Anwendung eines t-tests ergibt sich durch den U3-Taq kein signifikanter Unterschied, sowohl in der RT-Aktivität, als auch in der Anzahl der Viruskopien (Abbildung 23).

Auf die Durchführung eines p27-ELISAs wurde bei der Quantifizierung der Partikelproduktion verzichtet, da die Virusproduktion mit den Moleklarklonen im Allgemeinen als sehr niedrig einzustufen ist. Die Quantifizierung mit einem ELISA, ist im Vergleich zum PERT-Assay oder der qRT-PCR deutlich weniger sensitiv und ist aufgrund der Nachweisgrenze nicht geeignet, um einen geringen Titer an Reporterviren nachzuweisen.

Auch in die Anwesenheit genomischer DNA können geringe Mengen viraler cDNA spezifisch detektiert werden

Für den Nachweis des U3-Taq ist ein sehr sensitives Detektionssystem erforderlich. Geringe Ausgangsmengen viraler cDNA müssen auch in einem hohen Background genomischer DNA detektiert werden können. Um dies umzusetzen wurde eine Real-time PCR eingesetzt, da es damit möglich ist, Stadien des reversen Transkriptionsprozesses zu verfolgen und zu quantifizieren (Mbisa et al. 2009). Das Primerdesign wurde so gewählt, dass der Forward-Primer mit dessen 3´Ende exklusiv auf der mutierten Sequenz bindet. Dieses Design erhöht die Sensitivität zum Nachweis des Taqs und minimiert gleichzeitig falsch-positive Ergebnisse. Es ist nämlich bekannt, dass die Templatespezifität durch die Komplementarität des Primers am 3´Ende determiniert wird (Stadhouders et al. 2010). Untersuchungen zur Auswirkung von

Mismatches am 3'-Ende der Primer-Sequenz konnten zeigen, dass die PCR durch eine einzige Fehlpaarung am 3'-Ende verhindert wird (Bru et al. 2008).

Das Design des Reverse-Primers sollte sicherstellen, dass ausschließlich die Mutation in der 5'LTR (aber nicht in der 3'LTR) exponentiell amplifiziert wird. Hierfür wurde das Design so gewählt, dass dieser in der *gag*-Region downstream der 5'LTR bindet.

Erwartungsgemäß konnte durch Vorversuche gezeigt werden, dass die Primerkombination erfolgreich bei Positivkontrolle (PTC) funktioniert. Im Hintergrund humaner und nicht-humaner gDNA [100ng] konnte ein Detektionslimit von 5000 Kopien/Probe bestimmt werden (Abbildung 25). Dennoch fällt beim Vergleich der Ct-Werte auf, dass die PTC im Hintergrund nicht-humaner gDNA unterhalb von 5000 Kopien nicht mehr amplifiziert wird. In Anwesenheit humaner gDNA hingegen können unterhalb des Detektionslimits von 5000 Kopien gleichbleibend hohe Ct-Werte ermittelt werden. Dies spricht dafür, dass auf Ebene humaner DNA ähnliche Sequenzen anderer HERV-Elemente existieren, die aufgrund der Homologie eine potentielle Bindungsstelle für die verwendeten Primer darstellen. Dieses Phänomen kann im Hintergrund nicht-humaner DNA ausgeschlossen werden, da dort keine HERV Sequenzen vorkommen.

Die Marker-Sequenz ermöglicht den Nachweis viraler cDNA und widerlegt die Vermutung zu Restriktionen auf Ebene der Reversen Transkription

Die Infektion von HEK293T mit U3-mutierten Reporterviren konnte zeigen, dass die Mutation in der 5'LTR (zum Nachweis viraler cDNA) erfolgreich in der Real-time duplex qPCR detektiert werden kann. Die Ct-Werte für die DNA-Proben waren sowohl für nach 24h, als auch 48h positiv für die Detektion der Mutation und lagen innerhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 27). Dieser Befund deutet darauf hin, dass virale cDNA in HEK293T gebildet wird und die PCR als geeignetes Tool verwendet werden kann, um auch geringe Mengen cDNA im Hintergrund von genomischer DNA zu detektieren. Die Vermutung über zelluläre Restriktionen auf Ebene der reversen Transkription können damit für die Zelllinie HEK293T widerlegt werden.

Erwartungsgemäß konnte sowohl zu dem Messzeitpunkt nach 24h, als auch nach 48h kein Signal für die Negativkontrolle (ohne U3-Taq) bestimmt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass der U3-Tag entscheidend für den Nachweis der viralen cDNA ist und ohne die exakte Sequenzhomologie am 3' Ende des Forward-Primers, keine Amplifikation die Templates stattfindet. Ein U3-Taq wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit von Brady et al. zur spezifischen PCR-Amplifikation neu-integrierter Proviren genutzt. Hierzu wurde eine von HIV-abgeleitete LTR Sequenz in die U3-Region inseriert (Brady et al. 2009).

6 Ausblick

Die Ergebnisse des Infektionsexperimentes deuten darauf hin, dass die Reportergene EGFP und Luciferase stabil in das Genom der Zielzelle integriert werden. Um Integrationsereignisse alternativ zu quantifizieren, könnte man auch einen Infektionsversuch mit Raltegravir durchführen, einem Arzneistoff, der selektiv die Integration der viralen cDNA blockiert.

Um die Integrationsereignisse auf DNA-Ebene zu bestätigen, müsste eine PCR etabliert werden, mit welcher zwischen Proviren und episomaler DNA (LTR-circles) differenziert werden kann. Entsprechend dem Protokoll von Mbisa et. al können integrierte Proviren amplifiziert werden, indem man einen spezifischen U5- Forward-Primer und eine Sonde mit einem Reverse-Primer verwendet, der an die nächstgelegene Alu-Sequenz bindet (Mbisa et al. 2009). Um den genauen Integrationsort zu bestimmen, könnte man ebenso eine Adaptor-Ligation durchführen. Hierbei wird die genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend werden Adapter an die Fragmente angefügt und diese dadurch in der PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte können anschließend in der Sequenzierung analysiert werden, um den Integrationsort im Genom zu bestimmen (Brady et al. 2009)

Ebenso müsste überprüft werden, warum das Luciferase-Reportergen in der Zelllinien HeLa und HEK293T unterschiedlich stark exprimiert wird, obwohl ähnlich viele GFP-positive Zellen im FACS charakterisiert werden können. Hierzu könnte man ein Experiment durchführen, bei welchem die Plasmide HERV-K_{con}Luc und CMVoriGFP in beide Zelllinien transfiziert werden (Kramer et al. 2016). Durch die Quantifizierung des GFP-Signals im FACS kann die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Damit kann für jede Zelllinie auf die Transfektionseffizienz normalisiert werden und die Menge an RLU (produzierte Luciferase pro positiv transfizierter Zelle) gemessen werden. So kann überprüft werden, ob das Luciferase-Gen in der Zelllinie HeLa tatsächlich schwächer exprimiert wird.

Bislang konnte virale cDNA, als Hinweis für die Reverse Transkription, nur bei HEK293T nachgewiesen werden. Um weitere Aussagen treffen zu können, wäre es deshalb sinnvoll, dass Experiment auch mit anderen Zelllinien zu wiederholen. Hierzu würde sich die nicht-humane Zelllinie CrfK eignen, bei welcher Hintergrundsignale durch HERV-Elemente auf dem Genom ausgeschlossen werden können.

Literaturverzeichnis

- Arendt, C. W.; Littman, D. R. (2001): HIV: master of the host cell. In: *Genome biology* 2 (11). DOI: 10.1186/gb-2001-2-11-reviews1030.
- Arnemann, J. (2019): DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In: Axel M. Gressner und Torsten Arndt (Hg.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer Reference Medizin), S. 719.
- Balvay, Laurent; Lopez Lastra, Marcelo; Sargueil, Bruno; Darlix, Jean-Luc; Ohlmann, Théophile (2007): Translational control of retroviruses. In: *Nature reviews. Microbiology* 5 (2), S. 128–140. DOI: 10.1038/nrmicro1599.
- Belshaw, Robert; Tristem, Michael (2009): Do humans have replication-competent endogenous retroviruses? In: *Retrovirology* 6 (S2). DOI: 10.1186/1742-4690-6-S2-P10.
- Berger, Kurt (1987): *AIDS und Nervensystem*. Hg. v. Peter-Alexander Fischer. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Boso, Guney; Kozak, Christine A. (2020): Retroviral Restriction Factors and Their Viral Targets: Restriction Strategies and Evolutionary Adaptations. In: *Microorganisms*. DOI: 10.3390/microorganisms8121965.
- Boujard, Daniel; Anselme, Bruno; Cullin, Christophe; Raguénès-Nicol, Céline (2014): *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. Unter Mitarbeit von Daniel Boujard. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum (OnlinePlus).
- Brady, Troy; Lee, Young Nam; Ronen, Keshet; Malani, Nirav; Berry, Charles C.; Bieniasz, Paul D.; Bushman, Frederic D. (2009): Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus. In: *Genes & development* 23 (5), S. 633–642. DOI: 10.1101/gad.1762309.
- Bru, D.; Martin-Laurent, F.; Philippot, L. (2008): Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (5), S. 1660–1663. DOI: 10.1128/AEM.02403-07.
- Bukrinsky, Michael (2004): A hard way to the nucleus. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 10 (1-6), S. 1–5.
- Buselmaier, Werner (2015): *Biologie für Mediziner*. 13. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Butler, S. L.; Hansen, M. S.; Bushman, F. D. (2001): A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. In: *Nature medicine* 7 (5), S. 631–634. DOI: 10.1038/87979.
- Chudak, Claudia (2012): *Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von L-Domänen des humanen endogenen Retrovirus K*. Dissertation. Freien Universität Berlin.
- Chudak, Claudia; Beimforde, Nadine; George, Maja; Zimmermann, Anja; Lausch, Veronika; Hanke, Kirsten; Bannert, Norbert (2013): Identification of late assembly domains of the human endogenous retrovirus-K(HML-2). In: *Retrovirology* 10, S. 140. DOI: 10.1186/1742-4690-10-140.
- Coffin, John M.; Hughes, Stephen H.; Varmus, Harold E. (1997): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Contreras-Galindo, Rafael; Kaplan, Mark H.; Dube, Derek; Gonzalez-Hernandez, Marta J.; Chan, Susana; Meng, Fan et al. (2015): Human Endogenous Retrovirus Type K (HERV-K) Particles Package and Transmit HERV-K-Related Sequences. In: *Journal of virology* 89 (14), S. 7187–7201. DOI: 10.1128/JVI.00544-15.
- Dewannieux, Marie; Harper, Francis; Richaud, Aurélien; Letzelter, Claire; Ribet, David; Pierron, Gérard; Heidmann, Thierry (2006): Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. In: *Genome research* 16 (12), S. 1548–1556. DOI: 10.1101/gr.5565706.
- Dudley, Jaquelin (2011): *Retroviruses and Insights into Cancer*. New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC.
- Duran-Troise, Graciela; Bassin, Robert H.; Rein, Alan; Gerwin, Brenda I. (1977): Loss of Fv-1 restriction in Balb/3T3 cells following infection with a single N tropic murine leukemia virus particle. In: *Cell* 10 (3), S. 479–488. DOI: 10.1016/0092-8674(77)90035-6.
- Frank, Lilly (1970): Fv-2: Identification and Location of a Second Gene Governing the Spleen Focus Response to Friend Leukemia Virus in Mice. In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. DOI: 10.1093/jnci/45.1.163.
- Gallo, Robert C.; Montagnier, Luc (2003): The discovery of HIV as the cause of AIDS. In: *The New England journal of medicine* 349 (24), S. 2283–2285. DOI: 10.1056/NEJMp038194.
- Ganten, Detlev (Hg.) (1999): *Immunsystem und Infektiologie*. Unter Mitarbeit von Claus R. Bartram. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Handbuch der Molekularen Medizin, 4).
- Gifford, Robert; Tristem, Michael (2003): The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. In: *Virus genes* 26 (3), S. 291–315. DOI: 10.1023/A:1024455415443.
- Gori, G. B. (1964): Trypsinization of animal tissues for Cell culture: Theoretical considerations and automatic apparatus. In: *Applied microbiology* 12, S. 115–121.
- Greenwood, Alex D.; Ishida, Yasuko; O'Brien, Sean P.; Roca, Alfred L.; Eiden, Maribeth V. (2018): Transmission, Evolution, and Endogenization: Lessons Learned from Recent Retroviral Invasions. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 82 (1). DOI: 10.1128/MMBR.00044-17.
- Gressner, A. M.; Arndt, T.; Baum, H. (2007): *Klinische Chemie*. 1. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag (Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, Bd. 1).
- Hanke, Kirsten; Hohn, Oliver; Liedgens, Linda; Fidgeke, Katharina; Wamara, Julia; Kurth, Reinhard; Bannert, Norbert (2013): Staufeu-1 interacts with the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) rec and gag proteins and increases virion production. In: *Journal of virology* 87 (20), S. 11019–11030. DOI: 10.1128/JVI.03031-12.
- Hatzioannou, Theodora; Cowan, Simone; Schwedler, Uta K. von; Sundquist, Wesley I.; Bieniasz, Paul D. (2004): Species-specific tropism determinants in the human immunodeficiency virus type 1 capsid. In: *Journal of virology* 78 (11), S. 6005–6012. DOI: 10.1128/JVI.78.11.6005-6012.2004.
- Hohn, Oliver; Hanke, Kirsten; Bannert, Norbert (2013): HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease. In: *Frontiers in oncology*, S. 246. DOI: 10.3389/fonc.2013.00246.

- Hotter, Dominik; Sauter, Daniel; Kirchhoff, Frank (2013): Emerging role of the host restriction factor tetherin in viral immune sensing. In: *Journal of molecular biology*, S. 4956–4964. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.09.029.
- Javier, Ronald T.; Butel, Janet S. (2008): The history of tumor virology. In: *Cancer research* 68 (19), S. 7693–7706. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3301.
- Jolicoeur, P.; Baltimore, D. (1976): Effect of Fv-1 gene product on proviral DNA formation and integration in cells infected with murine leukemia viruses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (7), S. 2236–2240. DOI: 10.1073/pnas.73.7.2236.
- Knippers, Rolf (2006): Molekulare Genetik. 68 Tabellen. 9., komplett überarb. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- Kobiler, Oren; Drayman, Nir; Butin-Israeli, Veronika; Oppenheim, Ariella (2012): Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. In: *Nucleus (Austin, Tex.)*, S. 526–539. DOI: 10.4161/nucl.21979.
- Konstantoulas, Constantine James; Indik, Stanislav (2014): Mouse mammary tumor virus-based vector transduces non-dividing cells, enters the nucleus via a TNPO3-independent pathway and integrates in a less biased fashion than other retroviruses. In: *Retrovirology* 11, S. 34. DOI: 10.1186/1742-4690-11-34.
- Kramer, Philipp; Lausch, Veronika; Volkwein, Alexander; Hanke, Kirsten; Hohn, Oliver; Bannert, Norbert (2016): 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. In: *Virology*, S. 121–128. DOI: 10.1016/j.virol.2015.10.014.
- Kräusslich, Hans-Georg (2007): Virusgenome und virale Replikationsstrategien. Institut für Virologie. Heidelberg, 24.07.2007. Online verfügbar unter www.virology-heidelberg.de.
- Kruse, Christoph (2013): Hemmung der Expression von porzinen endogenen Retroviren (PERVs) mittels RNA-Interferenz. 1. Aufl. Norderstedt: Grin Verlag.
- Lausch, Veronika (2013): Etablierung eines Verfahrens zur Kombination der Elektronenmikroskopie (EM) mit der Spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (TERS) sowie Untersuchungen zum Infektionsprozess und der Ultrastruktur des Humanen Endogenen Retrovirus K (HERV-K). Dissertation.
- Lee, Young Nam (2010): Reconstitution and Characterization of Human Endogenous Retrovirus-K. Dissertation. Rockefeller University.
- Lee, Young Nam; Bieniasz, Paul D. (2007): Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. In: *PLoS pathogens* 3 (1), e10. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030010.
- Lesbats, Paul; Engelman, Alan N.; Cherepanov, Peter (2016): Retroviral DNA Integration. In: *Chemical reviews* 116 (20), S. 12730–12757. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00125.
- Li, F.; Liu, S. L.; Mullins, J. I. (1999): Site-directed mutagenesis using uracil-containing double-stranded DNA templates and DpnI digestion. In: *BioTechniques* 27 (4), S. 734–738. DOI: 10.2144/99274st03.
- Lindemann, Dirk; Steffen, Imke; Pöhlmann, Stefan (2013): Cellular entry of retroviruses. In: *Advances in experimental medicine and biology* 790, S. 128–149. DOI: 10.1007/978-1-4614-7651-1_7.

Maclachlan, Nigel James; Dubovi, Edward J. (Hg.) (2017): Fenner's veterinary virology. Fifth edition. London, U.K.: Academic Press is an imprint of Elsevier.

Maclachlan, Nigel James; Fenner, Frank; Dubovi, Edward J. (2009): Fenner's Veterinary Virology (4th ed.): Academic Press.

Mager, D. L.; Goodchild, N. L. (1989): Homologous recombination between the LTRs of a human retrovirus-like element causes a 5-kb deletion in two siblings. In: *American journal of human genetics* 45 (6), S. 848–854.

Mayr, Anton (Hg.) (2007): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 127 Tabellen. Unter Mitarbeit von Michael Rolle. 8., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke.

Mbisa, Jean L.; Delviks-Frankenberry, Krista A.; Thomas, James A.; Gorelick, Robert J.; Pathak, Vinay K. (2009): Real-time PCR analysis of HIV-1 replication post-entry events. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 485, S. 55–72. DOI: 10.1007/978-1-59745-170-3_5.

McLaughlin-Drubin, Margaret E.; Munger, Karl (2008): Viruses associated with human cancer. In: *Biochimica et biophysica acta*, S. 127–150. DOI: 10.1016/j.bbadis.2007.12.005.

Modrow, Susanne (2010): Molekulare Virologie. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10403692>.

Mold, D. E.; Wu, T.-C.; Askin, F.; Huang, R.C.C. (1997): Four Classes of HERV-K Long Terminal Repeats and Their Relative Promoter Strengths for Transcription. In: *Journal of biomedical science* 4 (2-3), S. 78–82. DOI: 10.1007/BF02255597.

Moyle, G. J.; Gazzard, B. G. (1997): The role of stavudine in the management of adults with HIV infection. In: *Antiviral therapy* 2 (4), S. 207–218.

Nisole, Sébastien; Saïb, Ali (2004): Early steps of retrovirus replicative cycle. In: *Retrovirology* 1, S. 9. DOI: 10.1186/1742-4690-1-9.

Paillart, J. C.; Berthoux, L.; Ottmann, M.; Darlix, J. L.; Marquet, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C. (1996): A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. In: *Journal of virology* 70 (12), S. 8348–8354. DOI: 10.1128/JVI.70.12.8348-8354.1996.

Panja, Subrata; Aich, Pulakesh; Jana, Bimal; Basu, Tarakdas (2008): How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli? In: *Molecular membrane biology* 25 (5), S. 411–422. DOI: 10.1080/09687680802187765.

Payne, Susan (2017): Viruses. From Understanding to Investigation. Saint Louis: Elsevier Science. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=4946562>.

Promega (2017): Biolumineszente Reporterassays. Hg. v. Promega. Online verfügbar unter https://www.promega.de/-/media/files/resources/product-guides/germany-brochures/br_biolumineszente-reporterassays_promega_2017.pdf?la=en, zuletzt geprüft am 04.02.2021.

Qin, Jane Yuxia; Zhang, Li; Clift, Kayla L.; Hukur, Imge; Xiang, Andy Peng; Ren, Bing-Zhong; Lahn, Bruce T. (2010): Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. In: *PloS one* 5 (5), e10611. DOI: 10.1371/journal.pone.0010611.

- Reinard, Thomas (2018): Molekularbiologische Methoden 2.0. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer (UTB, UTB-Band-Nr. 8449. Biologie, Molekularbiologie, Biochemie).
- René, Brigitte; Mauffret, Olivier; Fossé, Philippe (2018): Retroviral nucleocapsid proteins and DNA strand transfers. In: *Biochimie open* 7, S. 10–25. DOI: 10.1016/j.biopen.2018.07.001.
- Sack, Ulrich; Tárnok, Attila; Rothe, Gregor (2007): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger.
- Sanz-Ramos, Marta; Stoye, Jonathan P. (2013): Capsid-binding retrovirus restriction factors: discovery, restriction specificity and implications for the development of novel therapeutics. In: *The Journal of general virology* 94 (Pt 12), S. 2587–2598. DOI: 10.1099/vir.0.058180-0.
- Schedel, Fiona (2011): Inhibition des mammalian target of Rapamycin (mTOR) als mögliches Therapiekonzept des Urothelkarzinoms der Harnblase und der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches. Dissertation. Universität zu Lübeck, Lübeck, zuletzt geprüft am 17.01.2021.
- Schlabach, Michael R.; Hu, Jimmy K.; Li, Mamie; Elledge, Stephen J. (2010): Synthetic design of strong promoters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (6), S. 2538–2543. DOI: 10.1073/pnas.0914803107.
- Seitz, Reiner (2016): Human Immunodeficiency Virus (HIV). In: *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 43 (3), S. 203–222. DOI: 10.1159/000445852.
- Simon, Viviana; Bloch, Nicolin; Landau, Nathaniel R. (2015): Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. In: *Nature immunology* 16 (6), S. 546–553. DOI: 10.1038/ni.3156.
- Smale, Stephen T. (2010): Luciferase assay. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2010 (5), pdb.prot5421. DOI: 10.1101/pdb.prot5421.
- Solberg, Nina; Krauss, Stefan (2013): Luciferase assay to study the activity of a cloned promoter DNA fragment. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 977, S. 65–78. DOI: 10.1007/978-1-62703-284-1_6.
- Stadhouders, Ralph; Pas, Suzan D.; Anber, Jeer; Voermans, Jolanda; Mes, Ted H. M.; Schutten, Martin (2010): The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 12 (1), S. 109–117. DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090035.
- Stavrou, Spyridon; Ross, Susan R. (2015): APOBEC3 Proteins in Viral Immunity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (10), S. 4565–4570. DOI: 10.4049/jimmunol.1501504.
- Stöcker, W.; Schlumberger, W. (2019): Sandwich-Assay. In: Axel M. Gressner und Torsten Arndt (Hg.): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer Reference Medizin), S. 2094.
- Subramanian, Ravi P.; Wildschutte, Julia H.; Russo, Crystal; Coffin, John M. (2011): Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. In: *Retrovirology* 8, S. 90. DOI: 10.1186/1742-4690-8-90.

Suzuki, Yasutsugu; Chew, Mun Lok; Suzuki, Youichi (2012): Role of host-encoded proteins in restriction of retroviral integration. In: *Frontiers in microbiology* 3, S. 227. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00227.

Takara Bio: Fourth-generation lentiviral packaging overview. Hg. v. Takara Bio. Online verfügbar unter <https://www.takarabio.com/learning-centers/gene-function/viral-transduction/lentivirus/lenti-x-packaging>, zuletzt geprüft am 01.02.2021.

Temin, H. M. (1993): Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (15), S. 6900–6903. DOI: 10.1073/pnas.90.15.6900.

Trono, Didier (2002): *Lentiviral Vectors*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Current Topics in Microbiology and Immunology).

Xue, Bei; Sechi, Leonardo A.; Kelvin, David J. (2020): Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) in Health and Disease. In: *Frontiers in microbiology*, S. 1690. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01690.

Yamada, K.; Morozumi, H.; Okamoto, T. (1995): LTR-directed homologous recombination of full-length HIV-1 provirus clone in recA(-) bacteria. In: *Archives of virology* 140 (6), S. 1007–1014. DOI: 10.1007/BF01315411.

Young Nam Lee (2010): *Reconstitution and Characterization of Human Endogenous Retrovirus-K*. Hg. v. Faculty of The Rockefeller University.

Zhang, Wei; Cao, Sheng; Martin, Jessica L.; Mueller, Joachim D.; Mansky, Louis M. (2015): Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. In: *AIMS biophysics* 2 (3), S. 343–369. DOI: 10.3934/biophy.2015.3.343.

Zhang, Xing-Jie; Wang, Rui-Rui; Chen, Huan; Luo, Rong-Hua; Yang, Liu-Meng; Liu, Jing-Ping et al. (2018): SJP-L-5 inhibits HIV-1 polypurine tract primed plus-strand DNA elongation, indicating viral DNA synthesis initiation at multiple sites under drug pressure. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 2574. DOI: 10.1038/s41598-018-20954-5.